



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III - Paul Sabatier
Discipline ou spécialité : *Biophysique*

Présentée et soutenue par *Thomas Portet*
Le 24 septembre 2010

Titre : *Électroperméabilisation de Systèmes Modèles*

JURY

Lluis Mir
Françoise Brochard-Wyart
Justin Teissié
Marie-Pierre Rols
David S. Dean

président du jury
rapporteur
membre invité
directeur de thèse
directeur de thèse

Ecole doctorale : *Biologie - Santé - Biotechnologies*
Unité de recherche : *Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale*
Laboratoire de Physique Théorique
Directeur(s) de Thèse : *Marie-Pierre Rols et David S. Dean*
Rapporteurs : *Françoise Brochard-Wyart et Mathias Winterhalter*

Avant-propos

Organisation du document Cette thèse est organisée en trois parties. La première est une introduction générale aux membranes lipidiques, à l'électroperméabilisation, ainsi qu'aux GUVs et à leur comportement dans des champs électriques (chapitres 1, 2 et 3). Les travaux de recherche réalisés sont décrits et discutés dans la partie II : les chapitres 4, 5, 6 et 7 présentent des études distinctes et peuvent être abordés de manière indépendante. Chacun comporte une brève introduction, les résultats obtenus et une discussion. Ils correspondent aux manuscrits acceptés, soumis ou en préparation figurant dans les annexes D, E, F et G respectivement. Les principaux résultats sont récapitulés dans la partie III au chapitre 8, et quelques perspectives sont données au chapitre 9. Les méthodes expérimentales et numériques employées sont décrites dans les annexes A et B. Des détails supplémentaires figurent aussi dans les copies des manuscrits fournies dans les annexes D à G. L'annexe C décrit l'étude de l'influence d'impulsions de quelques nanosecondes sur des GUVs.

Quelques remarques linguistiques Si pendant ces trois années j'ai appris beaucoup de choses en biophysique, j'en ai oublié bien d'autres en grammaire, orthographe ou langue française en général. Je crains qu'il ne reste quelques fautes d'orthographe et vraisemblablement aussi des fautes de frappe. J'ai essayé de faire la chasse aux anglicismes, et je suis désolé s'il en reste ou si j'ai fait quelques traductions peu orthodoxes. J'ai utilisé allègrement bon nombre de néologismes couramment employés dans la communauté de l'électroperméabilisation. Ces mots (électrotransfert, poration...) ont toutefois une signification évidente. J'ai utilisé "GUV" au masculin même si on dit "une vésicule", mais je me suis normalement tenu à ce genre. Par souci de concision, l'expression "différence de potentiel à travers la membrane" est souvent abrégée en "potentiel transmembranaire". La "différence" ou la "chute" de potentiel est sous-entendue.

Remerciements

Merci à Mathias Winterhalter pour son rôle de rapporteur, et à Françoise Brochard-Wyart (rapporteur), Justin Teissié (membre invité) et Lluís Mir (président) d'avoir assisté à ma soutenance et fait partie de mon jury de thèse.

Merci à Clément Sire, directeur du Laboratoire de Physique Théorique, et à François Amalric puis Jean-Philippe Girard, directeurs successifs de l'Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, de m'avoir accepté en tant que doctorant dans leurs laboratoires respectifs.

Merci à Rumiana Dimova de l'Institut Max Planck pour les Colloïdes et Interfaces à Potsdam, Allemagne, et à Tom Vernier de l'Université de Sud Californie à Los Angeles, États-Unis, pour leur accueil lors de mes séjours de recherche dans leur laboratoires.

Merci à tous les membres de l'IPBS et du LPT que j'ai côtoyés, et particulièrement aux autres thésards qui pour certains sont maintenant bien plus que de simples collègues.

Merci à Marie-Pierre Rols et David S. Dean pour avoir encadré mes travaux pendant trois années. Vous savez combien je vous suis reconnaissant et à quel point j'ai apprécié le temps passé en votre compagnie. Du fond du cœur, merci.

Merci enfin à ma famille et à mes amis pour leur présence et leur soutien précieux et quotidien.

Abbréviations

GUV : vésicule unilamellaire géante (diamètre ~ 20 μm)

LUV : grande vésicule unilamellaire (diamètre ~ 500 nm)

PC : phosphatidylcholine

EggPC : L- α -phosphatidylcholine (Egg, Chicken)

DOPC : 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

SOPC : 1-stearoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

POPC : 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

DPPC : 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

DMPC : 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine

PE : phosphatidylethanolamine

EggPE : L- α -phosphatidylethanolamine (Egg, Chicken)

DOPE : 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine

DOTAP : 1,2-dioleoyl-3-triméthylammonium-propane

DiIC₁₈ : 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tétraméthylindocarbocyanine perchlorate

Rhodamine PE : L- α -Phosphatidylethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (Ammonium Salt) (Egg-Transphosphatidylated, Chicken)

TOTO-1 : Quinolinium, 1-1'-[1,3-propanediylbis[(diméthyliminio)-3,1-propanediyl]]bis[4-[(3-méthyl-2(3H)-benzothiazolylidene)méthyl]]-, tétraiodide

BE : bromure d'éthidium

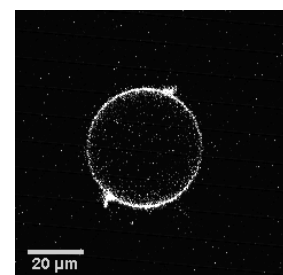
PI : iodure de propidium

cellules CHO : cellules d'ovaire de hamster chinois

FRAP : récupération de fluorescence après photoblanchiment

Table des matières

Avant-propos	1
Remerciements	3
Abbréviations	5
I Introduction générale	11
1 Membranes biologiques et électroperméabilisation	13
1.1 Les membranes biologiques	13
1.2 L'électroperméabilisation	18
1.2.1 Principe	18
1.2.2 Applications	19
1.2.3 Développements récents et questions en suspens	19
2 GUVs et champs électriques	23
2.1 Effets connus de champs électriques sur des GUVs	23
2.1.1 Déformation	24
2.1.2 Électroperméabilisation	25
2.1.3 Mouvement de domaines	26
2.1.4 Fusion	27
2.2 Applications	28
2.2.1 Mesure de rigidités de courbure	29
2.2.2 Chargement de vésicules	30
2.2.3 Applications de la fusion membranaire	31
2.2.4 Mesure de tensions de bord	32
3 Quelques relations utiles pour la suite	35
3.1 Différence de potentiel transmembranaire	35
3.2 Tension de surface	37



II	Travaux de recherche réalisés pendant la thèse	39
4	Diminution de taille de GUVs soumis à des impulsions électriques	41
4.1	Protocole	42
4.2	Théorie	43
4.3	Résultats	45
4.3.1	Observations	45
4.3.2	Mécanismes de perte de lipides	46
4.3.3	Analyse quantitative des données	48
4.4	Discussion	49
4.5	Figures du chapitre 4	53
5	Une nouvelle méthode pour mesurer la tension de bord et la stabilité de bicouches lipidiques	63
5.1	Introduction aux tensions de bord	64
5.2	Description de la méthode	66
5.2.1	Considérations théoriques sur la dynamique des pores	66
5.2.2	Caractéristiques de la formation de macropores par électropulsation	68
5.2.3	Potentiel transmembranaire critique et tension de lyse	71
5.3	Résultats	72
5.3.1	Tension de bord dans des membranes d'EggPC	72
5.3.2	Effet de la composition lipidique de la membrane	75
5.3.3	Seuils d'électroporation et stabilité des bicouches	76
5.4	Discussion	77
5.5	Figures et tables du chapitre 5	81
6	Étude de l'électrotransfert d'ADN dans des GUVs	87
6.1	Introduction	88
6.2	Protocole	89
6.3	Résultats	89
6.4	Considérations théoriques sur les incréments de concentration relative d'ADN	93
6.5	Discussion	97
6.6	Figures du chapitre 6	101
7	Modélisation de l'entrée de molécules chargées dans des cellules vivantes	107
7.1	Introduction	108
7.2	Résumé des résultats expérimentaux	109
7.2.1	Expériences d'électropulsation	109

7.2.2	Expériences d'électropulsation en présence de PI	109
7.2.3	Expériences d'électropulsation en présence d'ADN	110
7.3	Analyse théorique	111
7.3.1	Modèle	111
7.3.2	Modélisation des pores	113
7.3.3	Estimation des paramètres théoriques	113
7.3.4	Résultats théoriques et comparaison avec les expériences	114
7.3.5	Nombre constant de sites d'interaction	115
7.4	Discussion	115
7.5	Figures du chapitre 7	118
III	Conclusions	123
8	Bilan	125
9	Perspectives	129
	Bibliographie	131
	Annexes	153
A	Méthodes expérimentales	153
A.1	Produits	153
A.2	Solutions	153
A.3	Électroformation des GUVs	154
A.4	ADN	154
A.5	Microscopie	155
A.6	Électropulsation	155
B	Méthodes numériques	157
B.1	Traitement des images pour la mesure des tensions de bord .	157
B.2	Traitement des images pour l'analyse d'électrotransfert d'ADN dans des GUVs	158
B.3	Calcul du flux du champ électrique à travers une surface perméabilisée	159
C	Travaux réalisés lors de mon séjour à Los Angeles	161
D	Publication sur la décroissance de taille	177

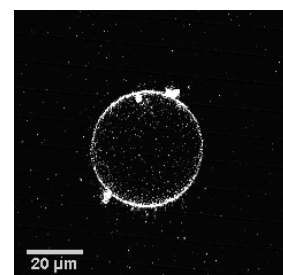
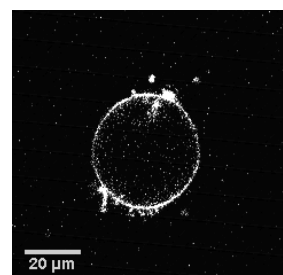


Table des matières

E	Manuscrit accepté sur la méthode de mesure des tensions de bord	191
F	Manuscrit en préparation sur l'électrotransfert d'ADN dans des GUVs	207
G	Manuscrit soumis sur la modélisation de l'entrée de molécules chargées dans des cellules vivantes	221

Première partie

Introduction générale



Chapitre 1

Membranes biologiques et électroperméabilisation

1.1 Les membranes biologiques

Les organismes vivants, du plus simple au plus complexe, ont besoin d'être organisés dans l'espace, délimités, compartimentés. Ceci est d'autant plus vrai dans la classe des eucaryotes, où les cellules sont constituées de plusieurs organelles distinctes. Ce rôle de compartimentation est assuré par les membranes biologiques [Shechter 00].

Les constituants primordiaux des membranes des cellules eucaryotes sont des phospholipides. Ces molécules sont amphiphiles : elles possèdent une partie polaire hydrophile (la tête lipidique) et une partie apolaire hydrophobe (les chaînes hydrocarbonées). La figure 1.1 montre un phospholipide typique, le POPC.

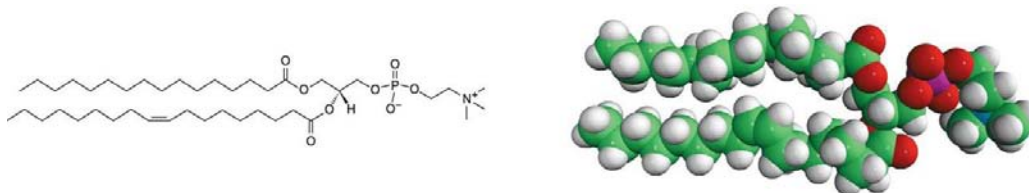
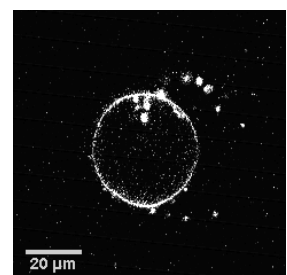


FIGURE 1.1: Deux représentations d'un phospholipide commun, le POPC. On peut voir les chaînes hydrophobes à gauche et la tête polaire à droite. Images d'après *avantlipids.com* .



De par leurs propriétés physicochimiques et leur nature amphiphile, les phospholipides en solution aqueuse s'agencent spontanément en structures organisées [Israelachvili 80]. Cet auto-assemblage est causé par l'effet hydrophobe, et demeure crucial et essentiel pour la cohésion des membranes. Selon la concentration et la forme des lipides mis en jeu, on peut assister par exemple à la formation de micelles, de bicouches (cf figure 1.2), ou de liposomes (cf figure 1.3). D'autres arrangements plus exotiques, comme les phases hexagonale ou hexagonale inversée, peuvent aussi être rencontrés [Mouritsen 05]. De telles structures apparaîtraient éventuellement dans le voisinage de certaines protéines transmembranaires [Piknova 93].

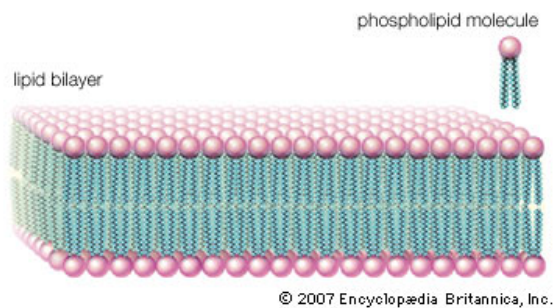


FIGURE 1.2: Représentation d'un phospholipide et d'une bicouche lipidique.

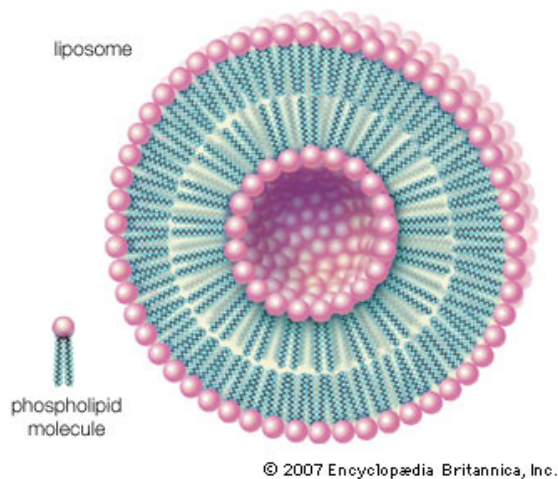


FIGURE 1.3: Représentation d'un phospholipide et d'un liposome.

En effet, les membranes biologiques ne sont pas uniquement composées de phospholipides, comme illustré dans la figure 1.4. Elles contiennent aussi d'autres types de lipides (sphingolipides, cholestérol...) et surtout des protéines. Le paradigme des membranes biologiques est le modèle de *mosaïque fluide*, introduit par Singer et Nicolson [Singer 72]. On peut résumer ce modèle ainsi. Les membranes sont constituées de lipides et de protéines membranaires. Les protéines membranaires sont divisées en deux classes : les protéines transmembranaires ou intégrales, et les protéines périphériques, faiblement attachées à la bicouche. La bicouche lipidique constitue une simple matrice dans laquelle baignent les protéines, une sorte de fluide à deux dimensions sans organisation particulière, dans lequel les protéines diffusent librement. Ce modèle continue toutefois à être raffiné. En effet, il a été observé que les membranes plasmiques contenaient des microdomaines enrichis en cholestérol, sphingomyéline et certaines protéines membranaires [Simons 97]. Les lipides dans les membranes biologiques comportent donc un certain ordre et ne sont pas organisés complètement au hasard. Ces microdomaines lipidiques pourraient intervenir dans certains phénomènes biologiques, par exemple dans les processus de signalisation. Les lipides sont donc bien plus qu'un simple substrat pour les protéines et qu'une enveloppe externe pour les cellules, et par l'effet du mésappariement hydrophobe jouent un rôle fondamental dans l'organisation des membranes biologiques.

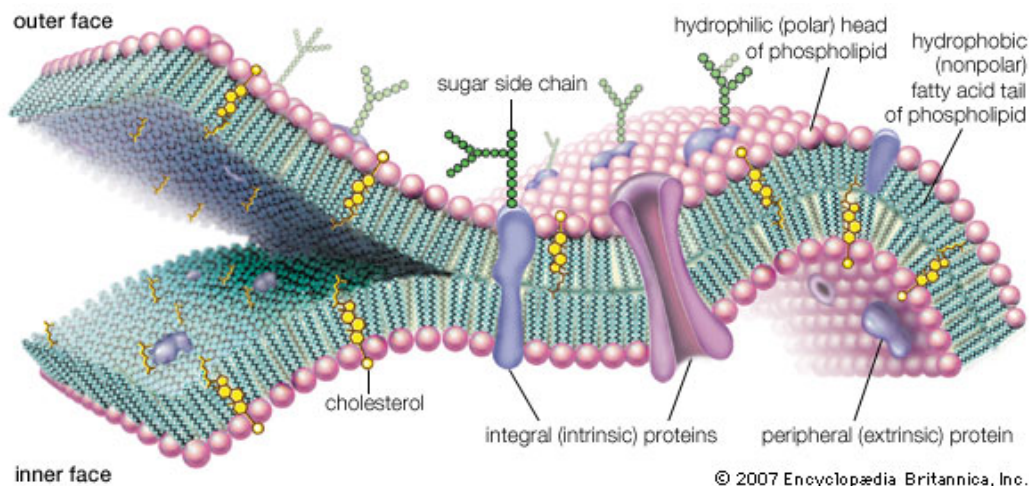
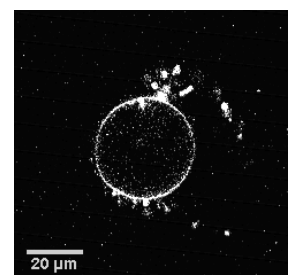


FIGURE 1.4: Représentation d'une membrane plasmique.



Les membranes biologiques sont en réalité des systèmes extrêmement complexes, renfermant une multitude de molécules différentes. L'étude des membranes est par conséquent souvent menée sur des systèmes modèles de composition simple et contrôlée. Ceci permet d'isoler l'effet des différents constituants. Les systèmes modèles de membrane contiennent typiquement un seul ou au plus quelques types de lipides, et peuvent avoir diverses tailles ou diverses géométries. On peut par exemple s'intéresser à des monocouches de lipides à l'interface air/eau, ou à des bicouches planes couvrant une ouverture dans une plaque mince de téflon (films lipidiques noirs). Des systèmes encore plus stables sont les bicouches supportées : une ou plusieurs bicouches sont empilées sur un substrat. On peut aussi étudier les propriétés des membranes lipidiques sur des vésicules multilamellaires, des petites vésicules unilamellaires (SUVs, ~ 50 nm), des grandes vésicules unilamellaires (LUVs, ~ 500 nm), ou des vésicules unilamellaires géantes (GUVs, ~ 5 μm). Les GUVs présentent de nombreux avantages. Leur composition est contrôlable à souhait (ou presque), et leur taille comparable à celle des cellules eucaryotes autorise une observation directe en microscopie optique (cf figure 1.5). En outre, l'absence d'organelles et de cytosquelette permet de se concentrer sur les phénomènes à l'œuvre au niveau de la bicouche lipidique. Ces objets sont très populaires dans les laboratoires de chimie, physique ou biologie, probablement en partie grâce à leur fabrication aisée. On peut notamment citer la méthode d'électroformation développée par Angelova et Dimitrov [Angelova 86], qui produit effectivement des vésicules *unilamellaires* dans la plupart des cas [Rodriguez 05]. L'utilisation de GUVs va vraisemblablement devenir encore plus populaire en raison de nouvelles méthodes de production permettant maintenant d'obtenir des liposomes à partir de membranes cellulaires, et/ou dans des conditions physiologiques (*i.e.* dans des solutions riches en sel) [Estes 05, Montes 07, Pott 08, Horger 09].

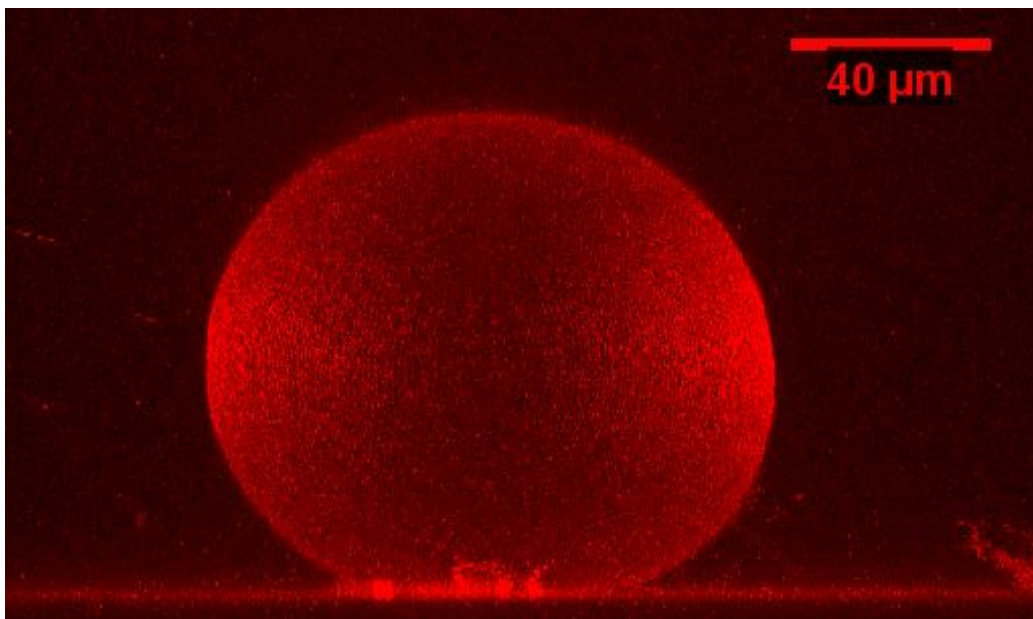
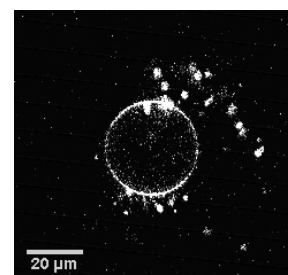


FIGURE 1.5: Reconstitution 3D d'un GUV de DOPC marqué à la Rhodamine PE reposant sur une lamelle de verre. La vésicule contient du saccharose et est observée dans une solution de glucose, ce qui explique la sédimentation et le léger aplatissement du liposome.



1.2 L'électroperméabilisation

1.2.1 Principe

L'électroperméabilisation est un procédé physique fondé sur l'application d'impulsions électriques pouvant induire une perméabilisation temporaire de la membrane cellulaire [Neumann 89]. Si l'amplitude [Teissié 93] et la durée [Rols 98] des impulsions sont judicieusement choisies, l'édifice membranaire peut suffisamment être perturbé pour autoriser le passage de molécules autrement non perméantes, et ce sans affecter la viabilité cellulaire.

Ce phénomène est observé depuis quelques dizaines d'années. Les premiers rapports parlaient de la mort de cellules causée par la perméabilisation irréversible de leur membrane. Dans les années 70, des études révélèrent que des impulsions électriques brèves mais intenses (quelques kV/cm et quelques μ s) pouvaient être à l'origine de la perméabilisation de membranes de cellules ou de vésicules, permettant ainsi le transport de petites molécules [Neumann 72]. Par la suite, d'autres travaux montrèrent que des cellules exposées à des impulsions électriques plus longues (quelques ms) pouvaient être transfectées¹ (voir par exemple les articles de revues [Teissié 05, Rols 06] et les références qui y sont mentionnées).

Quand un champ électrique est appliqué à une solution de cellules ou de vésicules, le potentiel électrique ψ dans le système est modifié ; les espèces ioniques en solution et contenues dans le cytoplasme se redistribuent au sein de l'échantillon. Les anions se déplacent vers l'anode et les cations vers la cathode. Ceci a pour conséquence l'établissement d'une différence de potentiel $\Delta\psi$ à travers la membrane. Cette différence de potentiel transmembranaire est le paramètre clé déclenchant la perméabilisation. Il est globalement admis par la communauté scientifique que la perméabilisation apparaît quand $\Delta\psi$ excède une valeur critique appelée seuil de perméabilisation $\Delta\psi_c$, de l'ordre de quelques centaines de mV [Teissié 93]. Les valeurs de $\Delta\psi_c$ dépendent du type de membrane et du système considéré.

1. On appelle transfection le processus de transfert de gène, *i.e.* l'introduction d'ADN exogène dans des cellules eucaryotes et son expression.

1.2.2 Applications

Le processus d'électroperméabilisation a connu un intérêt grandissant car il permet notamment d'introduire dans le cytoplasme des molécules thérapeutiques. Une application d'importance fondamentale est le transfert de petites molécules anticancéreuses comme la bléomycine ou le cisplatine [Sersa 95, Glass 96]. Ce procédé nommé électrochimiothérapie permet d'augmenter de manière importante la cytotoxicité de ces molécules [Mir 91] et a été utilisé avec succès dans des essais cliniques pour le traitement de cancers de la peau [Belehradek 93, Glass 97]. Il a aussi donné de bons résultats pour le traitement de sarcomes chez le chat [Mir 97] ou de sarcoïdes chez le cheval [Rols 02]. Il est actuellement utilisé comme soin palliatif dans plus de cinquante centres hospitaliers en Europe.

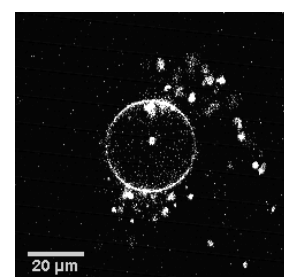
L'électroperméabilisation a aussi des applications prometteuses dans le cadre des thérapies géniques. De l'ADN plasmidique (des macromolécules de plusieurs millions de Daltons) peut être introduit avec succès dans de nombreux tissus : peau [Heller 07], muscle [Mir 99], cerveau [Akaneya 05], poumons [Pringle 07]... Cette méthode dispose de nombreux avantages par rapport à d'autres méthodes de transfection. Elle est simple, rapide, peu onéreuse, et plus sûre que les méthodes chimiques ou virales par exemple. Elle offre en outre d'intéressantes perspectives pour la vaccination génétique et l'immunothérapie anticancéreuse [Ugen 06, Peng 07, Daud 08].

1.2.3 Développements récents et questions en suspens

Des avancées récentes, rendues possibles par le développement de nouvelles technologies en électronique, indiquent que des impulsions très courtes (quelques nanosecondes ou dizaines de nanosecondes) et très intenses (jusqu'à 30 MV/m) ont des effets qui touchent les structures et fonctions intracellulaires [Vernier 03], et provoquent aussi l'externalisation de phosphatidylserines [Vernier 04].

L'augmentation des capacités de calcul des ordinateurs offre aussi la possibilité d'étudier les mécanismes de l'électroperméabilisation par des simulations de dynamique moléculaire [Tieleman 04, Tarek 05]. Bien que les systèmes étudiés et les échelles de temps explorées soient très petits, on arrive parfois à faire le lien entre ces simulations et les expériences en laboratoire. L'externalisation des phosphatidylserines est aussi observée *in silico* [Vernier 06], et on parvient à comparer la cinétique de formation des pores avec les données expérimentales [Böckmann 08].

Le scénario émergent de ces travaux est que des pores apparaissent dans les membranes pendant l'application du champ électrique. Peu après



le début de l'impulsion, on observe la formation d'une colonne de molécules d'eau à travers la bicouche, alors que les lipides ont encore approximativement la même orientation que pour une membrane intacte. On nomme ces structures que l'on peut voir dans les figures 1.6 et 1.7 des pores hydrophobes car les molécules d'eau sont en contact avec les chaînes hydrocarbonées des lipides. L'exposition à l'eau des queues hydrophobes des lipides est énergétiquement défavorable, ainsi les lipides se réorientent-ils de manière à ce que leurs têtes polaires tapissent les parois des pores. On appelle ces arrangements montrés dans les figures 1.6 et 1.8 des pores hydrophiles. Les pores hydrophobes peuvent être interprétés comme une sorte de pré-pores, des précurseurs des pores hydrophiles. Les diamètres de pores observés sont de l'ordre du nanomètre, mais les durées de simulation étant usuellement limitées à quelques nanosecondes, le devenir de ces structures reste peu clair pour le moment. Les pores grossissent-ils encore ? Se stabilisent-ils ? Se rassemblent-ils pour former des pores de taille plus importante ? Si l'on souhaite répondre à ces questions à l'aide de simulations de dynamique moléculaire, il faudra encore attendre quelque temps.

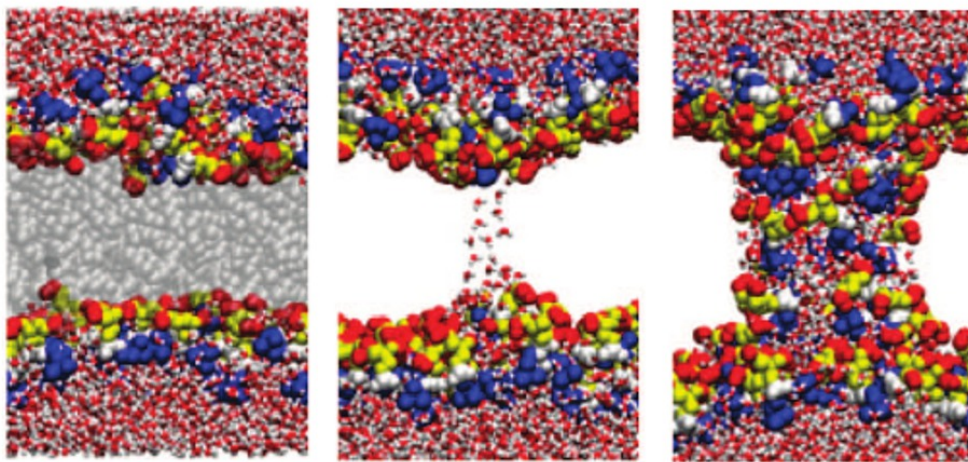


FIGURE 1.6: Images de dynamique moléculaire d'une bicouche lipidique intacte (gauche), comportant un pore hydrophobe (milieu) et un pore hydrophile (droite). Adapté d'après [Ziegler 08].

Malgré les nouveaux indices apportés par les simulations de dynamique moléculaire, la nature des structures de perméabilisation créées dans les membranes de cellules reste grandement sujette à débat. En effet, à ce

jour personne n'a observé de pores sur des cellules vivantes. Ce pourrait être à cause de leur taille trop petite, ou bien car d'autres types de défauts membranaires sont créés. Rappelons que les membranes plasmiques sont des objets extrêmement plus complexes, hétérogènes et étendus que les systèmes simulés. La prudence doit donc être de mise quand on tente d'extrapoler les résultats de dynamique moléculaire vers le monde vivant. L'état microscopique d'une membrane électroperméabilisée est pour l'instant encore l'objet de nombre de spéculations.

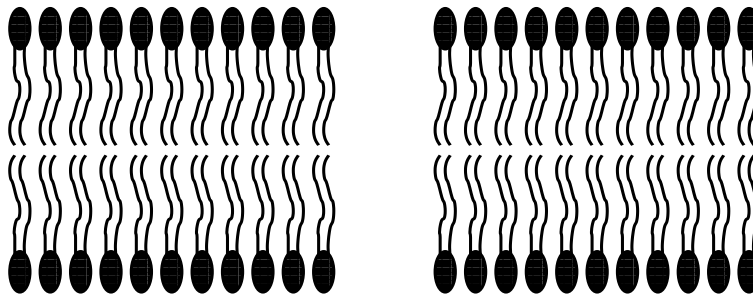


FIGURE 1.7: Représentation d'un pore hydrophobe.

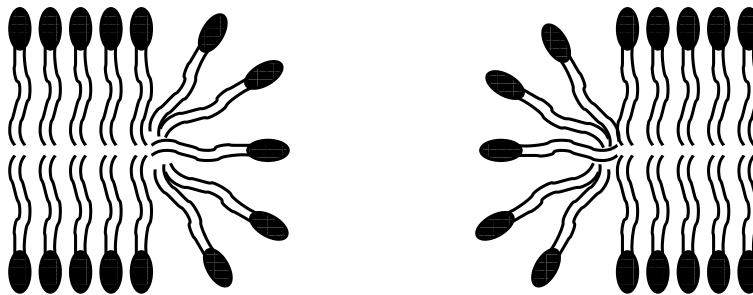
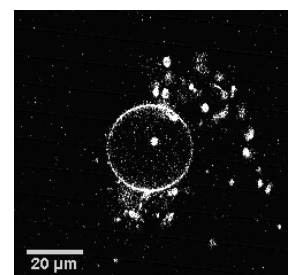


FIGURE 1.8: Représentation d'un pore hydrophile.

Un autre phénomène mal compris, mais que l'on tentera d'expliquer au chapitre 7 est dépeint à la figure 1.9. Alors que des petites molécules comme l'iodure de propidium ou des drogues anticancéreuses traversent librement la membrane électroperméabilisée, une macromolécule comme de l'ADN plasmidique subit tout d'abord une étape d'interaction avec la membrane. Des amas locaux d'ADN se forment dans le voisinage immédiat de la membrane, face à la cathode [Golzio 02]. La formation de ces spots



discrets est intimement corrélée avec l'efficacité ultime de la transfection, observée grâce à l'expression d'une protéine codée par le plasmide.

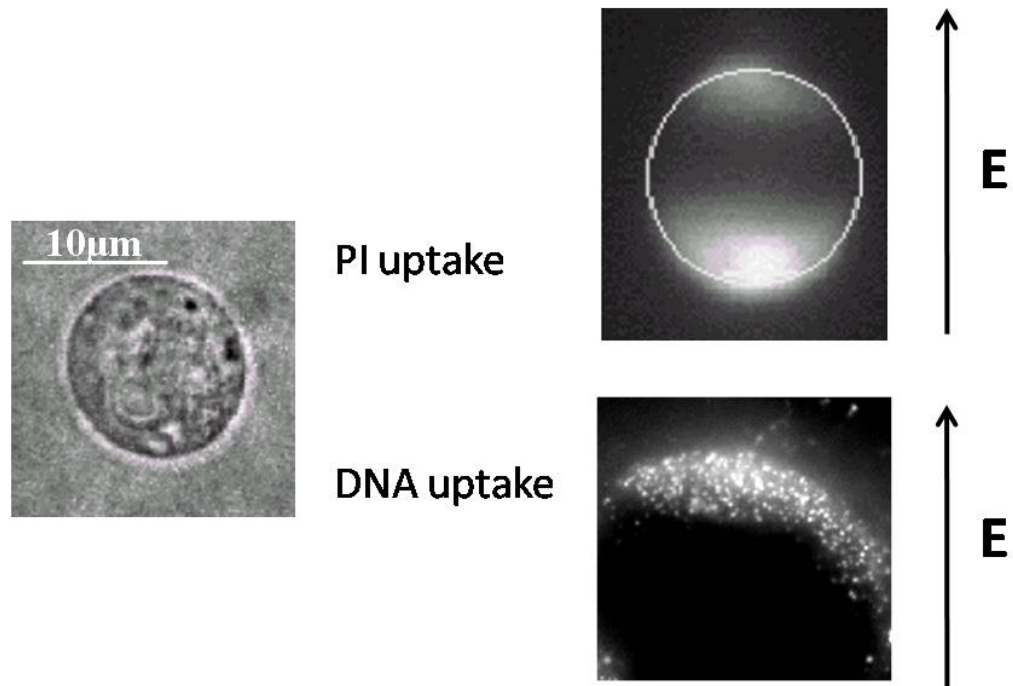


FIGURE 1.9: Illustration des différents mode d'entrée, entre une petite molécule (iodure de propidium, en haut à droite) et une macromolécule (ADN plasmidique, en bas à droite) dans une cellule CHO (à gauche). Photos prises une dizaine de secondes après le traitement électrique.

Chapitre 2

GUVs et champs électriques

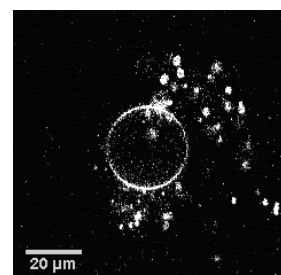
Dans ce chapitre, nous allons présenter les effets que peuvent avoir les champs électriques sur des GUVs. Nous considérerons des champs alternatifs sinusoïdaux, et des champs pulsés comme ceux utilisés dans le domaine de l'électroperméabilisation. Nous allons voir que l'application de tels champs sur des liposomes géants donne lieu à trois grandes classes de phénomènes :

- des changements de forme du GUV,
- un bouleversement de l'édifice membranaire,
- une entrée de molécules dans la vésicule.

Nous verrons comment ces phénomènes peuvent être utilisés pour mesurer diverses caractéristiques de la membrane lipidique, ou comment ils peuvent aider à améliorer notre compréhension de l'électroperméabilisation. Ce chapitre est adapté d'un article de revue rédigé par notre équipe actuellement sous presse [Portet 10], et est organisé de la manière suivante. Nous récapitulons tout d'abord les observations des effets de champs électriques sur des vésicules géantes, ainsi que leur explication théorique, quand elle existe. Dans un second temps, nous décrivons les applications issues de ces comportements.

2.1 Effets connus de champs électriques sur des GUVs

Des champs électriques pulsés ou sinusoïdaux peuvent déstabiliser des vésicules géantes et influencer leur comportement. Selon les caractéristiques du champ électrique appliqué, les liposomes peuvent fusionner, se déformer, abriter des pores, ou même être le siège de mouvements de domaines dans le cas de vésicules à plusieurs constituants. Nous allons



présenter maintenant ces phénomènes.

2.1.1 Déformation

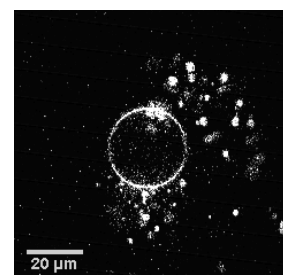
À notre connaissance, la déformation de vésicules géantes par des champs électriques (électrodéformation) fut étudiée en détail pour la première fois par Kummrow et Helfrich [Kummrow 91]. Les auteurs appliquaient des champs alternatifs de fréquence ~ 1 kHz et d'amplitude jusqu'à 10 kV/m, et trouvèrent que des liposomes sphériques se déformaient en des ellipsoïdes allongés dans la direction du champ, le degré de déformation augmentant avec l'intensité du champ appliqué. Ce type de déformation avait déjà été prédit auparavant [Winterhalter 88]. Le suivi de la dilatation d'aire relative peut donner une estimation de la rigidité de courbure k_c de bicouches lipidiques (voir sous-section 2.2.1). Quelques années plus tard, Mitov *et al.* ont observé et expliqué l'apparition, en augmentant la fréquence du champ au-delà de quelques kHz, d'une transition entre une forme d'ellipsoïde allongé selon la direction du champ (prolate), et une forme d'ellipsoïde allongé perpendiculairement au champ (oblate) [Mitov 93]. Les expériences étaient cependant limitées à des vésicules dans de l'eau pure (rapport des conductivités électriques interne et externe $x = \hat{\rho}_{in}/\hat{\rho}_{out} \approx 1$) et à des fréquences de l'ordre de quelques kHz. Une étude approfondie de l'influence des conductivités électriques des solutions ($x > 1$ ou $x < 1$), sur une gamme de fréquences f plus étendue (de 10^2 à 10^8 Hz) fut publiée 15 ans plus tard [Aranda-Espinoza 08]. Aranda *et al.* ont observé que les GUVs pouvaient adopter des formes prolate, oblate ou sphérique en faisant varier x ou f , et sont parvenus à construire un diagramme de phase morphologique comportant 4 transitions distinctes, dont les fréquences caractéristiques dépendent du rapport de conductivités x . À haute fréquence (plusieurs MHz), toutes les vésicules étaient sphériques. À basse fréquence ($f < \text{quelques kHz}$), tous les liposomes adoptaient une forme prolate, comme prédit dans [Winterhalter 88]. La transition prolate/oblate survenait à des fréquences intermédiaires pour $x < 1$, *i.e.* quand la concentration de sel à l'extérieur du GUV était plus élevée que celle à l'intérieur. Une autre transition de ce type pouvait aussi être déclenchée à fréquence constante en variant x , par exemple en ajoutant de l'eau dans l'échantillon et donc en augmentant le rapport de conductivités. Ces comportements peuvent être compris qualitativement si l'on considère le mouvement des ions en solutions et la distance qu'ils parcourent dans un champ alternatif. Quand la fréquence du champ est importante ils sont virtuellement immobiles, alors que pour des fréquences modérées ils peuvent être poussés contre la membrane et ainsi modifier la forme de la

vésicule. Néanmoins, il n’existait pas à ce moment-là de théorie capable de décrire ces 4 transitions en fonction de f et x de manière satisfaisante. La théorie de Winterhalter et Helfrich [Winterhalter 88] ne rendait pas compte du recouvrement de la forme sphérique à haute fréquence, et celle de Mitov non plus [Mitov 93]. Une théorie expliquant toutes les caractéristiques du diagramme morphologique de [Aranda-Espinoza 08] fut finalement développée dans [Vlahovska 09]. La forme de la vésicule était déterminée en équilibrant les contraintes électrique, hydrodynamique, de tension et de courbure exercées sur la membrane. Cette approche d’équilibre des forces en jeu a l’avantage de fournir des informations sur la cinétique de déformation du liposome.

La théorie de Winterhalter et Helfrich prédisait que des impulsions électriques pouvaient aussi déformer des GUVs en prolates [Winterhalter 88]. Cependant, les durées de telles impulsions varient généralement entre quelques dizaines de microsecondes et quelques millisecondes. Si on veut observer la vésicule *pendant* l’impulsion électrique, il faut travailler avec un dispositif d’imagerie rapide capable d’enregistrer plusieurs milliers d’images par seconde. Ceci a été mis en œuvre par Riske et Dimova, qui trouvèrent qu’effectivement des GUVs se déformaient en prolates lors de l’application d’impulsions électriques de durée 50–300 μs et d’amplitude 100–300 kV/m [Riske 05]. Les expériences étaient réalisées avec très peu de sel, mais avec un rapport de conductivités $x \sim 1.3$ signifiant plus de sel à l’intérieur du GUV qu’à l’extérieur. Les auteurs voulurent ensuite travailler dans des conditions proches des conditions physiologiques, et s’intéressèrent au rôle de sels dans les milieux externes. De manière surprenante, il fut observé que des GUVs soumis à des impulsions électriques dans des solutions salées adoptaient toujours une forme cylindrique, peu importe leur contenu en sel et le rapport de conductivités x [Riske 06]. Ce phénomène n’a pas d’explication satisfaisante à ce jour.

2.1.2 Électroperméabilisation

Des impulsions électriques peuvent aussi avoir des effets sur les bicouches lipidiques beaucoup plus dramatiques qu’une simple déformation. Elles peuvent bouleverser l’édifice membranaire, de manière réversible ou permanente [Neumann 89]. Comme nous l’avons vu au chapitre 1, ce procédé appelé électroperméabilisation a des applications thérapeutiques [Belehradek 93, Escoffre 09], et semble déclenché par la différence de potentiel transmembranaire $\Delta\psi$ induite par le champ. Une description précise de la membrane perméabilisée demeure encore un défi, d’où l’intérêt d’étudier le phénomène sur des systèmes modèles. Quelques études ont



été réalisées, et ont montré qu'il était en effet possible de perméabiliser des vésicules géantes par l'application d'impulsions électriques. En combinant électroperméabilisation et aspiration par une micropipette, il a été mesuré dans [Needham 89] que la différence de potentiel critique $\Delta\psi_c$ requise pour perméabiliser la membrane variait entre 1.1 et 1.8 V pour diverses compositions lipidiques. On observa aussi qu'un macropore de plusieurs microns de diamètre pouvait être induit par l'impulsion électrique [Zhelev 93]. Plus tard, il fut mis en évidence que le mécanisme de formation de pores était asymétrique [Tekle 01]. Tekle *et al.* purent détecter la formation d'un macropore sur l'hémisphère du GUV face à la cathode, et ils déduisirent la présence de plusieurs petits pores sur l'autre hémisphère, à partir de la diminution de taille du GUV consécutive à l'impulsion électrique. Nous avons aussi étudié ce phénomène de diminution de taille de GUVs, en les soumettant non pas à une impulsion unique mais à une *séquence* d'une vingtaine d'impulsions. Cette approche nous a permis de déterminer un potentiel critique $\Delta\psi_c$, et est décrite en détail au chapitre 4.

La formation de macropores fut quant à elle aussi étudiée par Riske et Dimova [Riske 05]. Les impulsions électriques utilisées dans cette étude, de durée 50–300 μs et d'amplitude 100–300 kV/m, pouvaient aussi mener à l'apparition de macropores sur les GUVs. Il fut établi que la poration des vésicules affectait la dynamique de relaxation de la membrane, et que la tension de surface initiale du GUV avait une influence importante sur la différence de potentiel transmembranaire critique à appliquer pour assister à la poration du liposome. Une autre étude, plus récente, a rapporté que la présence de lipides chargés négativement peut entraîner la destruction du GUV, alors que des simples membranes de phosphatidylcholines se reconstituent d'ordinaire très efficacement après une impulsion perméabilisante [Riske 09].

2.1.3 Mouvement de domaines

L'augmentation de la complexité membranaire par l'addition de différents phospholipides et de cholestérol conduit à des phénomènes ne pouvant être observés sur des GUVs de composition simple. Staykova *et al.* ont réussi à imager les mouvements de domaines lipidiques dans des vésicules de DOPC:DPPC:cholestérol soumises à des champs alternatifs d'amplitude ~ 50 kV/m et de fréquence de l'ordre de quelques kHz [Staykova 08]. Les auteurs ont rapporté que ces mouvements avaient des caractéristiques dépendant des paramètres du champ électrique, et qu'ils étaient provoqués par la tension de surface inhomogène induite par le champ à cause de la géométrie de la chambre d'observation. Ce fut la première fois que ce phé-

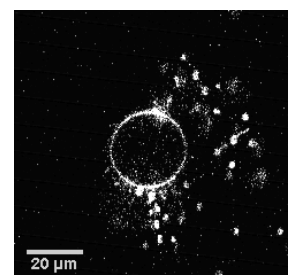
nomène d'ICEO ("induced charge electro-osmosis") fut observé et étudié sur une membrane lipidique.

2.1.4 Fusion

La fusion membranaire est un procédé fondamental dans le monde vivant. C'est une des voies principales permettant à des molécules d'entrer ou de sortir des cellules, qui se manifeste par exemple lors de la transmission de l'influx nerveux, par la fusion de vésicules synaptiques avec la membrane de cellules nerveuses. La fusion membranaire intervient aussi dans le trafic intracellulaire [Eitzen 03, Hay 07] ou dans certaines infections virales [Kielian 06, Weissenhorn 07].

Cependant fusionner deux membranes représente un grand coût en énergie car il faut faire face aux barrières créées par la combinaison des interactions hydrophobe, de van der Waals, et des forces d'hydratation [Helm 92, Kozlovsky 02]. Dans les membranes biologiques, la fusion est facilitée par la présence de protéines de fusion et a lieu en plusieurs étapes [Carr 93, Yu 94]. Pour la plupart des virus, on recense deux étapes. Les protéines de fusion reconnaissent tout d'abord un site de fusion sur la cellule cible. Ensuite, le domaine hydrophobe de la protéine s'insère dans la membrane plasmique de la cellule.

Le mécanisme de fusion membranaire comporte deux types importants de structures intermédiaires : les structures d'hémifusion et les pores de fusion [Lentz 00]. Les structures d'hémifusion sont des connexions entre les feuillettes externes des deux membranes en regard, mais pas entre les feuillettes internes qui demeurent séparés l'un de l'autre. Ces structures apparaissent de manière transitoire, avant soit de disparaître en laissant deux membranes distinctes, soit de se transformer en pores de fusion [Lentz 00]. Les pores de fusion sont des connexions entre les deux feuillettes, et peuvent être vus comme un canal aqueux reliant les deux cytoplasmes. La propension à obtenir ces deux structures intermédiaires varie avec la composition lipidique des bicouches, car de cette composition dépend la capacité des membranes à se courber, et donc leur courbure spontanée ou leur rigidité de courbure [Chernomordik 03]. Une condition nécessaire pour observer la fusion de deux membranes est évidemment leur proximité. Comme les forces d'hydratation tendent à écarter les deux membranes, un état fusogène peut être induit par la déshydratation des bicouches [Lentz 94]. Dans les systèmes biologiques, la déshydratation peut être provoquée par des ions calcium qui neutralisent les têtes lipidiques négativement chargées et/ou favorisent la formation de ponts Ca^{2+} -phosphate entre les bicouches [Jeremic 04]. Elle peut aussi être provoquée par l'ap-



plication d'un champ électrique à travers la membrane et le réarrangement du réseau interfacial de molécules d'eau associé [Lopez 88].

L'électrofusion est une manière très commode de contrôler, spatialement comme temporellement, les événements de fusion. Cette possibilité de les déclencher permet de les observer afin d'en étudier les mécanismes sous-jacents. Pour avoir lieu, l'électrofusion nécessite deux conditions : l'électroperméabilisation et le contact entre les bicouches. Quand les deux membranes sont suffisamment proches et les perturbations suffisamment intenses, la fusion peut avoir lieu ; ce fut mis en évidence avec des cellules dans [Zimmermann 82]. Il fut aussi montré que la fusion membranaire peut aussi être obtenue en rapprochant des cellules *après* leur électroperméabilisation, ce qui indique que les membranes électroperméabilisées demeurent fusogènes pendant un certain temps [Sowers 86, Teissie 86, Rols 89]. Là encore, l'utilisation de vésicules lipidiques comme systèmes modèles est d'un grand intérêt pour la compréhension de ces phénomènes [Tamm 03, Neumann 89]. Un champ électrique alternatif peut être employé afin d'aligner les liposomes dans la direction du champ et de les mettre en contact. Ensuite, l'application d'une impulsion électrique induit la perméabilisation des vésicules, et si cette perméabilisation a lieu au niveau de la zone de contact alors la fusion peut avoir lieu. La fusion membranaire est un procédé rapide, qui a lieu en deux étapes [Haluska 06]. La première est l'ouverture d'un goulot de fusion avec une vitesse moyenne d'expansion d'environ 2 cm/s. La seconde étape est marquée par la diminution de la vitesse d'expansion jusqu'à l'ouverture complète du goulot de fusion. En l'absence de sel, la fusion a typiquement lieu en plusieurs points de contact entre les liposomes, et la coalescence des différents goulots de fusion peut mener à la formation de petites vésicules au niveau de la zone de contact [Haluska 06]. Si des sels sont présents dans le milieu externe, l'impulsion électrique conduit en outre à un aplatissement des liposomes dans la région de contact. Comme l'on n'observe pas dans ce cas l'apparition de petites vésicules, on peut en déduire que seulement un, ou tout au plus un petit nombre de goulots de fusion ont été formés.

2.2 Applications

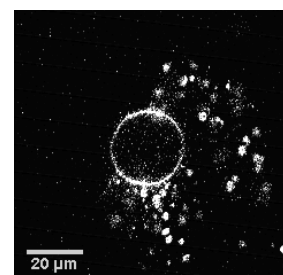
Dans la section précédente, nous avons récapitulé les diverses réponses possibles de GUVs soumis à différents types de champs électriques. Ces comportements ont parfois donné lieu à des applications que nous allons maintenant décrire. Nous allons dans un premier temps expliquer comment l'analyse de l'électrodéformation de GUVs dans un champ alternatif

permet de mesurer la rigidité de courbure k_c d'une bicouche lipidique. Ensuite, nous exposerons comment des impulsions électriques peuvent être utilisées pour charger des liposomes avec des molécules d'intérêt. Nous énoncerons aussi quelques applications de la fusion membranaire, avant de décrire quelques méthodes de mesure de la tension de bord γ de bicouches lipidiques. Un résumé de ces comportements et de ces applications est fourni sous forme de schéma dans la figure 2.1.

2.2.1 Mesure de rigidités de courbure

La rigidité de courbure k_c est une propriété physique des membranes lipidiques, introduite par Helfrich dans sa théorie de l'élasticité des bicouches lipidiques [Helfrich 73]. Cette quantité a la dimension d'une énergie et peut être reliée au prix énergétique à payer pour courber une membrane. Elle joue un rôle dans le maintien de la forme de la membrane, dans la détermination de l'amplitude des fluctuations thermiques, ou dans la modulation de l'activité de protéines membranaires. Pouvoir la mesurer est donc d'un grand intérêt pour tenter de mieux comprendre divers phénomènes biologiques. Nous décrivons ici uniquement la méthode de mesure de k_c basée sur l'analyse de l'électrodéformation de GUVs. D'autres méthodes existent, et sont par exemple listées dans la revue de Marsh [Marsh 06].

La mesure de k_c par analyse de l'électrodéformation fut tout d'abord mise en œuvre par Kummrow et Helfrich [Kummrow 91]. Des vésicules géantes étaient soumises à des champs alternatifs d'environ 10 kV/m à une fréquence de quelques kHz, et les formes de la vésicule étaient enregistrées pour diverses amplitudes. Les liposomes se déformaient en un ellipsoïde prolata de plus en plus allongé avec l'intensité du champ électrique, et changeaient aussi leur surface apparente en raison de l'aplatissement des fluctuations thermiques. L'idée de base de cette méthode est tout d'abord de calculer la tension latérale σ induite par le champ en utilisant la relation $\sigma(c_1 + c_2)_e - (T_{rr})_e = \sigma(c_1 + c_2)_p$, où c_1 et c_2 sont les courbures principales de l'ellipsoïde, T_{rr} est la contrainte exercée par le champ sur la surface externe de la vésicule donnant lieu à la déformation et au lissage des ondulations, et les indices e et p signifient que les quantités associées sont calculées à l'équateur ou au pôle de la vésicule, respectivement. Le changement relatif d'aire a est donné par $(k_B T / 8\pi k_c) \ln(\sigma / \sigma_0)$; on peut donc voir facilement que l'ajustement d'une ligne droite au tracé logarithmique de a en fonction de σ permet d'obtenir la rigidité de courbure k_c , ainsi que la tension initiale de la vésicule σ_0 . Cette méthode fut ensuite appliquée par Gracià *et al.* afin d'étudier l'influence de l'inclusion de cholestérol sur



la rigidité de membranes de compositions variées [Gracia 10]. Les auteurs employèrent aussi une autre méthode de mesure fondée sur l'analyse des fluctuations de la membrane (voir [Schneider 84] par exemple). Ils trouvèrent que la méthode par électrodéformation donnait des valeurs légèrement plus faibles que celles obtenues par analyse des fluctuations, comme déjà rapporté dans [Kummrow 91]. Néanmoins, les deux méthodes donnaient les mêmes tendances et des résultats reproductibles. Les résultats suggèrent que l'effet de l'addition de cholestérol sur la rigidité membranaire dépend non seulement de sa concentration, mais aussi, de manière cruciale, du type de lipide auquel il est ajouté. Un point important à garder à l'esprit est l'impossibilité d'utiliser la méthode d'électrodéformation si l'on travaille dans des solutions salées ou avec des lipides chargés.

2.2.2 Chargement de vésicules

Comme énoncé précédemment, des impulsions électriques permettent d'introduire dans des cellules des macromolécules autrement non perméantes. Elles peuvent donc aussi aider à charger un liposome avec une macromolécule d'intérêt. Ceci peut être utile dans la délivrance de médicaments ou d'ADN où des vésicules jouent le rôle de cargos, dans les recherches visant à produire synthétiquement des protéines ou des cellules artificielles, ou même en recherche fondamentale afin d'essayer de comprendre la nature de l'interaction ADN/membrane observée lors de l'électroperméabilisation de cellules en présence d'ADN plasmidique [Golzio 02]. À notre connaissance, seulement deux études portant sur l'électrotransfert de macromolécules dans des liposomes ont été réalisées à ce jour. Dans [Chernomordik 90], les auteurs appliquèrent une impulsion électrique unique d'amplitude 1250 kV/m et de durée 300 μ s à une suspension de LUVs de DPPC:cholestérol (7:3, mol:mol) d'environ 500 nm de diamètre, en présence d'ADN plasmidique de taille similaire à celle des plasmides utilisés dans les protocoles de transfert de gène. Grâce à l'utilisation de techniques de fluorescence, les auteurs affirmèrent que l'entrée d'ADN avait lieu par le biais de sortes de vésicules d'endocytose protégeant l'ADN d'une exposition au milieu interne des LUVs, plutôt que par des électropores et sous forme libre. Ces conclusions furent remises en cause dix ans plus tard par Lurquin et Athanasiou, qui observèrent que de l'ADN plasmidique pouvait entrer sous forme libre dans des GUVs de DPPC, probablement *via* des pores induits par le champ électrique [Lurquin 00]. Ces auteurs utilisèrent des impulsions plus longues (12 ms) et de moindre amplitude (150 kV/m), mais qui induisaient toutefois des différences de potentiel transmembranaire plus élevées que celles de [Chernomordik 90].

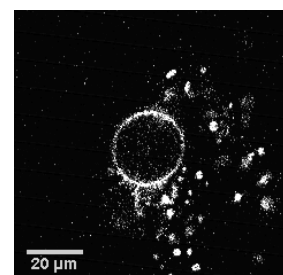
Nous avons nous aussi étudié le chargement de GUVs avec des macromolécules (en l'occurrence de l'ADN plasmidique) par électroperméabilisation. Nous avons réussi à suivre les incréments de concentration d'ADN après chaque impulsion, et nous confirmons le scénario de [Lurquin 00], *i.e.* l'entrée d'ADN sous forme libre *via* des pores. Ces travaux sont décrits en détail au chapitre 6.

2.2.3 Applications de la fusion membranaire

Étant donné que la fusion membranaire provoque un mélange des lipides initialement présents dans les deux membranes ainsi qu'un mélange des deux milieux internes, l'électrofusion peut être utilisée afin d'introduire des molécules dans une membrane ou dans un compartiment aqueux. Dans le cas de la fusion de vésicules ayant différentes compositions lipidiques, il est possible d'obtenir des vésicules de composition rigoureusement contrôlée [Dimova 07]. Ceci offre la possibilité d'étudier la dynamique de formation des domaines et leur stabilité. Quand des GUVs sont préparés directement à partir d'un mélange de lipides, leurs compositions peuvent varier autour de la composition initiale du mélange, alors que la fusion de deux vésicules de compositions simples résulte en l'obtention d'une vésicule de composition très précisément déterminée.

La fusion de deux vésicules de contenus différents permet de réaliser un microréacteur. Il est connu que des vésicules peuvent contenir un ou plusieurs types de réactifs [Chiu 99]. Quand on induit l'électrofusion de deux vésicules aux contenus distincts, les deux contenus se mélangent et la réaction chimique impliquant les divers réactifs peut avoir lieu. Pour que cette méthode soit efficace, il faut que les membranes lipidiques des vésicules soient imperméables aux réactifs. La première utilisation de vésicules comme microréacteurs fut mise en avant dans [Chiu 99] avec une réaction entre les ions Ca^{2+} et la sonde fluorescente fluo-3. Un échantillon de vésicules contenait du fluo-3 et l'autre des ions calcium. Les différents liposomes étaient mélangés, l'électrofusion était mise en œuvre et on pouvait assister à une augmentation de fluorescence grâce à la formation de complexes Ca^{2+} /fluo-3. Cette méthode d'électrofusion est donc un outil prometteur pour l'étude et le suivi de réactions chimiques en microenvironnement contrôlé.

L'électrofusion a aussi été utilisée comme méthode de synthèse de nanoparticules dans des GUVs [Yang 09]. Dans ce cas, une vésicule contenait du Na_2S et l'autre du CdCl_2 . Les vésicules étaient mises en contact par application d'un champ alternatif, puis une impulsion était ensuite appliquée afin d'induire la fusion. La formation de nanoparticules de CdS était



attestée par la fluorescence à l'intérieur de la vésicule résultante. Cette approche permet en effet de réaliser et d'observer la réaction directement sous un microscope. En outre, cette expérience montre que des nanoparticules peuvent être synthétisées dans des compartiments biologiques, et ce sans l'intervention de macromolécules.

2.2.4 Mesure de tensions de bord

Les chaînes hydrocarbonées des lipides sont hydrophobes, et le coût énergétique par unité de longueur pour laisser le cœur d'une membrane lipidique exposé à l'eau est appelée la tension de bord γ . On suppose souvent que pour des bords suffisamment grands les têtes polaires des lipides peuvent tapisser les bords pour les rendre hydrophiles, mais il y a toujours dans ce cas une tension de bord à payer à cause du coût en énergie associé au réarrangement des queues des lipides. La tension de bord est une propriété physique des bicouches lipidiques, qui peut aussi éventuellement dépendre de la composition du milieu externe. C'est cette quantité qui fait qu'un bout de membrane plane plongé dans l'eau a tendance à se courber pour former une vésicule, et qui est à l'origine de la force causant la fermeture de pores dans des bicouches lipidiques [Fromherz 86, Sandre 99]. Pour parler simplement : plus élevée est la tension de ligne, plus élevé sera le coût énergétique pour maintenir un pore ouvert, et donc plus vite le pore se refermera. On comprend donc que la vitesse de fermeture de pores peut *a priori* contenir des informations sur la tension de bord du système étudié.

L'application de champs électriques à des GUVs peut permettre de mesurer cette tension de bord, de différentes manières. Harbich et Helfrich observèrent des vésicules géantes d'EggPC, cylindriques et ouvertes, dans des champs alternatifs, et en déduisirent une valeur pour la tension de bord γ d'environ 20 pN [Harbich 79]. Zhelev et Needham obtinrent des valeurs du même ordre avec des vésicules de SOPC et de SOPC:cholestérol (1:1, mol:mol), en couplant électroperméabilisation et aspiration de la vésicule avec des micropipettes [Zhelev 93]. Cette approche n'était toutefois pas évidente à mettre en œuvre en raison des dispositifs sophistiqués requis pour la micromanipulation. Nous avons développé une méthode de mesure de la tension de bord par l'analyse de la vitesse de fermeture d'un macropore induit dans le GUV par application d'une impulsion électrique, à la lumière de la théorie décrite dans [Brochard-Wyart 00]. Cette méthode présentée en détail au chapitre 5 est une variante de celle utilisée dans [Karatekin 03], mais a l'avantage de ne nécessiter l'utilisation ni de glycérol ni de sonde membranaire fluorescente, composés pouvant éventuellement

avoir une influence sur γ . Elle est en outre facile et rapide à utiliser.

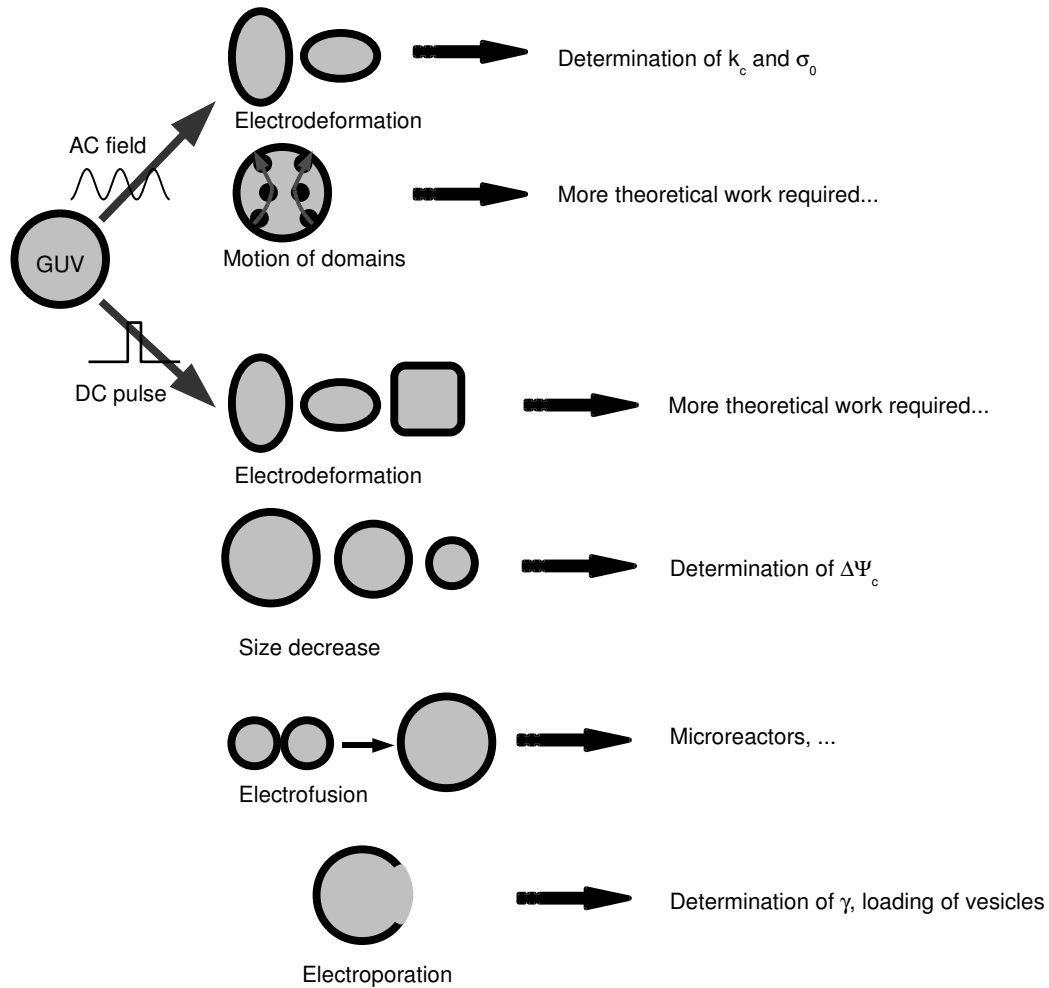
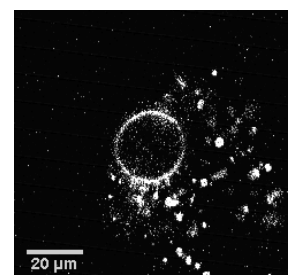


FIGURE 2.1: Schéma récapitulant l'influence des champs électriques sur des vésicules lipidiques géantes et leurs applications pratiques. La mention "More theoretical work required..." indique que notre compréhension des phénomènes mentionnés est pour le moment limitée, et qu'une connaissance approfondie est requise pour nous permettre de concevoir des applications.



Chapitre 3

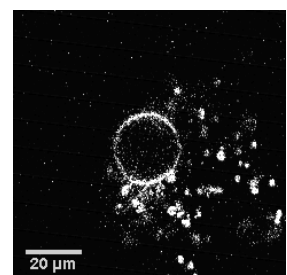
Quelques relations utiles pour la suite

Dans ce chapitre nous allons énoncer quelques équations qui vont revenir de manière récurrente dans la partie II. Ces relations concernent la différence de potentiel transmembranaire et la tension de surface induites par un champ électrique.

3.1 Différence de potentiel transmembranaire

Le modèle de membrane le plus communément utilisé pour décrire l'électroperméabilisation est celui d'une coquille sphérique de rayon R , d'épaisseur a et de conductivité $\hat{\sigma}_m$, encapsulant un milieu ohmique de conductivité électrique $\hat{\sigma}_i$, et baignant dans un milieu de conductivité $\hat{\sigma}_e$. Les électrodes, planes et infiniment étendues, sont placées très loin de l'objet. La figure 3.1 montre la géométrie utilisée. Cette géométrie est employée avec succès dans l'étude de l'électroperméabilisation de cellules vivantes, bien qu'elle représente un modèle très simplifié d'une cellule. Elle s'applique aussi très bien aux objets auxquels nous nous intéresserons dans cette thèse, les GUVs, qui sont bel et bien des objets sphériques avec une membrane régulière.

Quand un champ électrique est appliqué, *i.e.* quand on impose le potentiel au niveau des électrodes, le potentiel électrique ψ est modifié en tout point du système. L'effet prépondérant du champ électrique est d'induire une différence de potentiel $\Delta\psi$ à travers la membrane. Cette différence de potentiel induite, ou potentiel transmembranaire, est d'une importance capitale pour l'électroperméabilisation. C'est cette quantité que l'on admet déclencher la perméabilisation de la membrane.



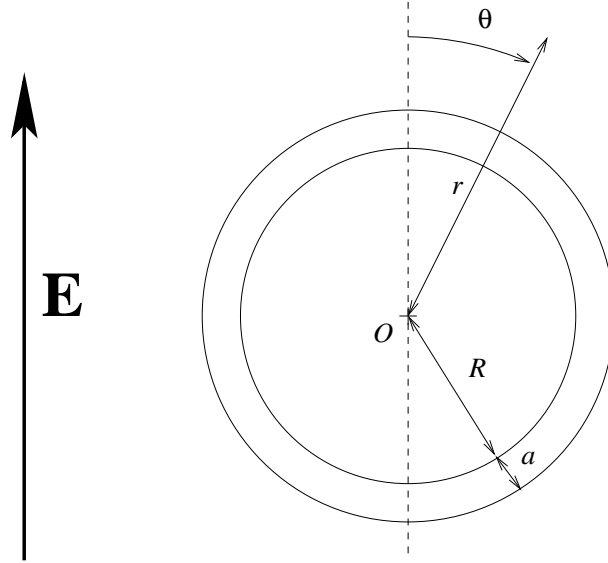


FIGURE 3.1: Géométrie utilisée pour le calcul de la différence de potentiel à travers la membrane d'un GUV.

Dans le cadre de la géométrie dépeinte à la figure 3.1, on peut résoudre analytiquement les équations de Maxwell pour ψ , et obtenir une expression exacte pour $\Delta\psi$. Dans la limite $a \ll R$ (ce qui bien est le cas pour des GUVs où $a/R \approx 10^{-3}$) et $\hat{\rho}_m \ll \hat{\rho}_i$ et $\hat{\rho}_e$ (cette condition est aussi vraie dans nos expériences, où la conductivité d'une bicouche lipidique non perméabilisée est très inférieure aux conductivités des milieux interne et externe à la vésicule), on obtient pour la différence de potentiel transmembranaire (voir par exemple [Neumann 89, chapitre 1 par H.P. Schwan] ou les références y figurant) :

$$\Delta\psi = \frac{3}{2}RE \cos(\vartheta) \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_c}\right) \right), \quad (3.1)$$

où E est l'intensité du champ appliqué par l'expérimentateur (*i.e.* le champ loin ou en l'absence de la vésicule), t est le temps écoulé depuis le début de l'application du champ, ϑ est l'angle repérant le point d'intérêt sur la surface du liposome par rapport à la direction du champ et τ_c le temps de charge de la membrane donné par

$$\tau_c = RC_m \left(\frac{1}{\hat{\rho}_i} + \frac{1}{2\hat{\rho}_e} \right), \quad (3.2)$$

C_m désignant la capacité par unité de surface de la bicouche lipidique, de l'ordre de $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. On peut voir grâce à ces équations que le poten-

tiel transmembranaire croît avec le temps, avant de se stabiliser au bout de quelques τ_c à sa valeur maximale. Dans nos expériences sur GUVs, τ_c vaut typiquement quelques dizaines, au plus centaines de microsecondes. Comme nous nous intéressons principalement à l'effet d'impulsions électriques longues (quelques millisecondes), nous pouvons considérer que la différence de potentiel induite par une impulsion atteint sa valeur maximale et vaut donc :

$$\Delta\psi = \frac{3}{2}RE \cos(\vartheta) . \quad (3.3)$$

Cette relation est souvent nommée *équation* ou *formule de Schwan* dans la communauté de l'électroperméabilisation. On y voit que $\Delta\psi$ sera d'autant plus important que la vésicule sera grande ou le champ intense. Le terme en $\cos(\vartheta)$ indique que la différence de potentiel est extrémale dans les zones faisant face aux électrodes, aux pôles du GUV. C'est donc à ces endroits que le champ électrique à travers la membrane $E_m \sim \Delta\psi/a$ sera le plus intense et le plus à même de perméabiliser la membrane. Ceci est en parfait accord avec les observations expérimentales qui montrent aussi bien sur des cellules vivantes ou sur des liposomes géants que la perméabilisation a lieu majoritairement dans les régions de la membrane face aux électrodes [Tekle 94, Tekle 01]. Remarquons que le champ électrique à travers le membrane E_m est beaucoup plus intense que le champ E appliqué par l'expérimentateur. Ce dernier est amplifié d'un facteur $R/a \approx 1000$; c'est cette caractéristique qui rend l'électroperméabilisation possible et si efficace.

3.2 Tension de surface

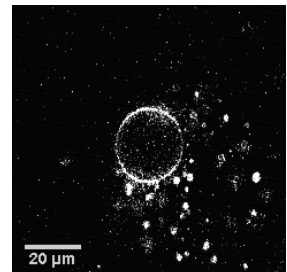
L'application d'un champ électrique crée aussi des contraintes au niveau de la membrane. Il induit une tension de surface, qui peut être évaluée en utilisant les tenseurs de contrainte de Maxwell [Needham 89]. Cette tension de surface vaut

$$\sigma_{el} = \epsilon_m \epsilon_0 \left(\frac{a}{2a_e^2} \right) \Delta\psi^2 , \quad (3.4)$$

où ϵ_0 désigne la permittivité du vide, ϵ_m la perméabilité relative de la membrane ($\epsilon_m \sim 2$ pour une bicouche lipidique), a l'épaisseur totale de la bicouche et a_e l'épaisseur de la partie hydrophobe.

Si la vésicule possède une tension initiale σ_0 , alors la tension de surface totale σ pendant l'application du champ est donnée par la somme de la tension initiale et de la tension induite par le champ :

$$\sigma = \sigma_0 + \sigma_{el} . \quad (3.5)$$



La tension de rupture, ou tension de lyse σ_{lys} d'une membrane est la valeur de tension de surface au-delà de laquelle la membrane est déstabilisée et perd son intégrité. L'existence de σ_{lys} est à rapprocher de l'existence d'un potentiel transmembranaire critique $\Delta\psi_c$ au-delà duquel la membrane est bouleversée et devient perméable. Ces deux quantités peuvent être reliées par

$$\sigma_{lys} = \sigma_0 + \epsilon_m \epsilon_0 \left(\frac{a}{2a_e^2} \right) \Delta\psi_c^2 . \quad (3.6)$$

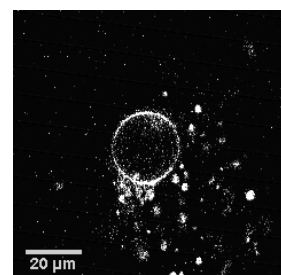
Si on néglige σ_0 dans l'équation 3.6, on obtient une expression de σ_{lys} en fonction de $\Delta\psi_c$:

$$\sigma_{lys} \approx \epsilon_m \epsilon_0 \left(\frac{a}{2a_e^2} \right) \Delta\psi_c^2 . \quad (3.7)$$

C'est cette équation 3.7 qui sera utilisée au chapitre 5 pour déduire une valeur de tension de lyse à partir de la valeur de potentiel transmembranaire critique mesurée expérimentalement.

Deuxième partie

**Travaux de recherche réalisés
pendant la thèse**



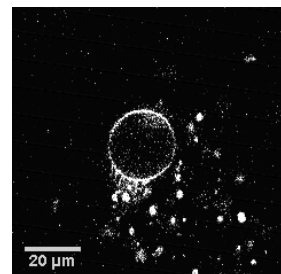
Chapitre 4

Diminution de taille de GUVs soumis à des impulsions électriques

Contexte

Cette étude, réalisée au début de ma thèse, s'inscrit dans la continuité du travail initié par Émilie Phez, Franc Camps i Febrer, Cyril Favard, Marie-Pierre Rols et David S. Dean. Il avait été remarqué depuis quelque temps qu'un train d'impulsions de 5 ms et de quelques dizaines de kV/m pouvait induire la perméabilisation de GUVs visualisée par le mélange de solutions de saccharose et glucose [Phez 05]. Cette perméabilisation était accompagnée d'une diminution de taille des GUVs, comme déjà rapporté dans [Tekle 01], où le phénomène de perte de lipides par application d'un champ électrique avait déjà été étudié, mais d'un point de vue différent, en examinant l'effet d'impulsions uniques. Des GUVs de DOPC d'une vingtaine de microns de diamètre avaient été soumis à des impulsions électriques de durée 700 μ s et d'amplitude de l'ordre de 100 kV/m. Les observations en microscopie de fluorescence à une cadence de 30 images par seconde avaient révélé la présence de macropores de plusieurs microns de diamètre face à la cathode, et l'apparition de plusieurs petits pores face à l'anode, trop petits pour être détectés, avait été déduite car la taille du seul macropore était insuffisante pour expliquer à elle seule la perte de 14 % de la surface de la vésicule.

Si on suppose que l'aire de la vésicule diminue proportionnellement à l'aire de la surface où le potentiel transmembranaire induit par l'impulsion excède une valeur seuil $\Delta\psi_c$, alors on est en mesure de prédire l'évolution



du rayon de la vésicule en fonction de deux paramètres : $\Delta\psi_c$ et le facteur de proportionnalité β . Cette simple théorie introduite par David S. Dean est en excellent accord avec l'expérience : les rayons des GUVs décroissent bien de la manière attendue. Cela a été vérifié par Franc Camps i Febrer sur un grand nombre de vésicules d'EggPC observées en contraste de phase, et avec quelques vésicules de DOPC marquées à la Rhodamine PE. J'ai poursuivi ces expériences avec le DOPC, et j'ai observé une décroissance de taille conforme à la prédiction, comme l'indiquaient les premiers résultats de Franc. J'ai aussi remarqué que la perte de lipides associée au rétrécissement s'accompagnait de la formation de diverses structures (petites vésicules, tubules, pores). Ces travaux ont donné lieu à la publication qui figure en annexe D.

4.1 Protocole

Le protocole est très simple. Il s'agit d'appliquer à une vésicule un train d'impulsions de 5 ms en prenant une image entre chaque impulsion, afin de pouvoir suivre l'évolution du rayon du liposome en fonction du nombre d'impulsions. L'intensité du champ électrique est choisie en fonction de la taille initiale R_0 du GUV afin d'imposer la même différence de potentiel transmembranaire initiale $\Delta\psi_0$ à toutes les vésicules (cf section 4.2). On arrête l'expérience une fois que le rayon ne décroît plus.

La fréquence de répétition des impulsions, de l'ordre de 0.1-1 Hz, n'a pas d'influence visible sur les résultats. Elle n'était d'ailleurs pas rigoureusement maintenue constante durant les expériences à cause de la nécessité de recentrer les vésicules se dirigeant vers l'anode et de refaire la mise au point de l'objectif.

Le lipide étudié est du DOPC, et les vésicules sont marquées à la Rhodamine PE (cf annexe A). Les solutions sont les solutions usuelles de glucose et saccharose décrites aussi en annexe A.

Dans tout ce qui suit j'utilise l'expression "une expérience" pour désigner l'application d'impulsions électriques à une vésicule jusqu'à la stabilisation de son rayon réduit à la valeur W_c . Un "jeu de données" est donc une suite de valeurs de $W(n)$. Une fois suffisamment d'expériences réalisées, l'ajustement de la formule 4.6 à chaque jeu de données permet de déterminer une valeur pour β et une valeur pour $\Delta\psi_c$ (cf section 4.2). Comme on le verra par la suite, ces valeurs mesurées peuvent fluctuer de manière importante d'une expérience à l'autre, il est donc nécessaire de calculer les valeurs moyennes de ces quantités sur un nombre suffisant d'expériences.

4.2 Théorie

Comme indiqué dans le chapitre 1, il est communément admis que la perméabilisation d'une membrane lipidique est déclenchée lorsque la valeur absolue de la différence de potentiel transmembranaire $\Delta\psi$ induite par le champ électrique excède une valeur critique $\Delta\psi_c$. Considérons une vésicule sphérique de rayon R soumise à un champ électrique \mathbf{E} . La différence de potentiel induite $\Delta\psi$ est alors donnée par l'équation 3.3, que l'on rappelle ici :

$$\Delta\psi = \frac{3}{2}RE \cos(\vartheta) \quad (3.3)$$

L'insertion de $\Delta\psi_c$ dans cette équation nous permet de définir deux grandeurs d'intérêt : un angle et un rayon critiques notés ϑ_c et R_c respectivement.

L'angle critique

$$\vartheta_c = \arccos\left(\frac{2\Delta\psi_c}{3RE}\right) \quad (4.1)$$

délimite deux calottes sphériques ($\vartheta \in [0, \vartheta_c]$ et $\vartheta \in [\pi - \vartheta_c, \pi]$), cf fig 4.1. En tout point de cette surface, on a $|\Delta\psi| > \Delta\psi_c$, d'où l'appellation de surface perméabilisée. L'aire perméabilisée correspondante A_p vaut $4\pi R^2(1 - \cos(\vartheta_c))$. Le rayon critique

$$R_c = \frac{2\Delta\psi_c}{3E} \quad (4.2)$$

représente la plus petite taille de vésicule pour laquelle $|\Delta\psi|$ peut encore dépasser $\Delta\psi_c$, pour E donné. À intensité de champ électrique fixée, les vésicules de taille inférieure au rayon critique ne devraient donc pas être perméabilisées. Il est utile pour la suite d'exprimer l'aire perméabilisée en fonction du rayon critique :

$$A_p = 4\pi R^2 \left(1 - \frac{R_c}{R}\right). \quad (4.3)$$

Revenons maintenant à notre problème de décroissance de taille. Comme on l'a dit plus haut, nous allons supposer que l'aire perdue par impulsion est proportionnelle à l'aire perméabilisée A_p . En notant A l'aire de la vésicule et n le nombre d'impulsions reçues, cette hypothèse s'écrit simplement

$$\frac{dA}{dn} = -\hat{\lambda}A_p. \quad (4.4)$$

En utilisant 4.3 pour A_p et $A = 4\pi R^2$ pour une vésicule restant sphérique (ce qui est le cas dans les expériences), on obtient une équation différentielle pour R , dont la solution

$$R(n) = R_c + (R(0) - R_c) \exp\left(-\frac{\hat{\lambda}}{2}n\right) \quad (4.5)$$

est à décroissance exponentielle, depuis la valeur initiale $R(0)$ du rayon du GUV jusqu'au rayon critique R_c . Introduisons maintenant la quantité sans dimension $W(n) = R(n)/R(0)$. Ce rayon réduit doit donc décroître selon

$$W(n) = W_c + (1 - W_c) \exp\left(-\frac{\hat{n}}{2}n\right), \quad (4.6)$$

où W_c est un rayon critique réduit $W_c = R_c/R(0)$. Or, W_c peut aussi s'exprimer comme

$$W_c = \frac{\Delta\psi_c}{\Delta\psi_0}, \quad (4.7)$$

$\Delta\psi_0$ étant la différence de potentiel initiale $(3/2)ER(0)$ induite par l'impulsion électrique sur la vésicule de taille $R(0)$. Si l'on règle la magnitude du champ en fonction de la taille initiale du liposome de manière à appliquer un même $\Delta\psi_0$ à toutes les vésicules, alors toutes les courbes de décroissance devraient se superposer et adopter la même forme caractéristique : un déclin exponentiel de 1 à W_c . En effet, $\Delta\psi_c$ étant supposé constant pour un type lipidique donné et $\Delta\psi_0$ étant par construction le même d'une expérience à l'autre, le rayon critique réduit W_c sera le même pour chaque vésicule. Il est raisonnable de supposer que la constante de proportionnalité \hat{n} ne dépend que du type de lipide utilisé (peut-être aussi de la durée de l'impulsion, mais cette dernière ne varie pas dans ces expériences), ce qui implique que les différentes courbes pour $W(n)$, en plus d'avoir leurs valeurs initiales et finales respectives identiques, devraient décroître à la même vitesse.

Nous disposons donc d'une formule (équation 4.6) à ajuster à chaque jeu de données expérimentales en fonction de deux paramètres, \hat{n} et W_c . Chaque ajustement nous donnera donc une valeur pour la fraction d'aire perméabilisée perdue par impulsion \hat{n} , et pour la différence de potentiel critique $\Delta\psi_c$ en utilisant la relation 4.7.

Raffinement du modèle Comme nous allons le voir en section 4.3, toutes les vésicules ne commencent pas à rétrécir dès la première impulsion. Il faut parfois attendre d'en avoir appliqué plusieurs pour commencer à observer la décroissance de taille. Une raison possible pour ce phénomène serait que le mécanisme de perte de lipides, tout comme le processus d'électroperméabilisation, nécessite la présence de défauts dans la membrane. De tels défauts peuvent résulter de processus d'activation, et verraient donc le jour avec une probabilité q à chaque impulsion. Une fois ces défauts créés, la vésicule rentrerait dans son régime de décroissance, où elle rétrécirait effectivement après chaque impulsion, comme prédit par l'équation 4.6. Il est légitime de supposer que la probabilité q de créer des défauts

(i.e. d'entrer dans le régime de décroissance) est constante et ne dépend pas du nombre d'impulsions reçues auparavant. En d'autres termes, peut importe ce qui lui est arrivé plus tôt et à combien d'impulsions elle a été soumise, une vésicule n'ayant pas encore entamé son régime de décroissance peut basculer dans ce régime avec une probabilité q à chaque fois qu'elle reçoit une impulsion électrique.

En tenant compte de ce régime préliminaire au régime de décroissance, l'équation 4.6 utilisée pour les ajustements est maintenant changée en

$$W(n) = H(N_c - n - 1) + H(n + 1 - N_c) \left[W_c + (1 - W_c) \exp\left(-\frac{\hat{n}}{2}n\right) \right] \quad (4.8)$$

où H désigne une fonction de Heaviside prenant la valeur 1 pour un argument positif et 0 autrement. Il apparaît ainsi un troisième paramètre d'ajustement N_c , qui correspond au nombre d'impulsions à appliquer avant de faire rentrer la vésicule dans le régime de décroissance. La courbe d'ajustement sera donc constante et égale à 1 jusqu'à $n = N_c$, puis suivra ensuite le déclin exponentiel de l'équation 4.6. Avec nos hypothèses sur q , la variable aléatoire N_c devra donc adopter une distribution géométrique pour laquelle la probabilité que N_c soit égal à n est donnée par

$$P(N_c = n) = q(1 - q)^{n-1} . \quad (4.9)$$

4.3 Résultats

4.3.1 Observations

L'expérience a été réalisée sur un grand nombre de GUVs. Il arrivait parfois que les vésicules éclatent avant que leur taille ne se stabilise. Les jeux de données correspondants ont été écartés, et nous avons conservé en tout 51 jeux de données correspondant à 51 vésicules différentes.

La première chose à noter est la confirmation de l'existence du rayon critique R_c . En effet, après une trentaine d'impulsions ne restaient plus dans la chambre de pulsation que des vésicules de taille inférieure à celle de la vésicule d'intérêt. L'application d'une nouvelle séquence d'impulsions d'amplitude plus élevée fait à nouveau décroître le rayon des liposomes de l'échantillon. À plusieurs reprises, la diminution de taille ne commença pas directement après la première impulsion, mais après quelques unes. Comme décrit à la section 4.2, ceci peut s'interpréter comme si les GUVs avaient besoin d'un certain nombre de défauts à leur surface afin de basculer dans le régime de décroissance. Ces défauts pouvant résulter de processus activés, on peut considérer qu'ils apparaissent avec une même

probabilité q à chaque application d'une impulsion, et qu'une fois présents le liposome commence effectivement à expulser des lipides après chaque impulsion suivante.

La figure 4.2 présente 4 exemples typiques des jeux de données recueillis (croix) ainsi que les ajustements correspondants réalisés à l'aide de la formule 4.8. Les diamants correspondent aux images des figures 4.3 et 4.4 illustrant les différentes manières d'éjecter des lipides, décrites ci-dessous.

4.3.2 Mécanismes de perte de lipides

La présence de molécules fluorescentes dans la membrane a permis d'observer que la décroissance de taille était accompagnée de l'expulsion de lipides. Nous avons pu identifier trois sortes de mécanismes spectaculaires pour l'éjection des lipides. J'emploierai les termes éjection ou expulsion pour désigner la formation de structures détachées de la membrane, mais aussi de structures encore en contact avec la partie sphérique de la bicouche définissant réellement la vésicule. Les trois principaux mécanismes de perte de lipides sont représentés dans les figures 4.3, 4.4, 4.5 et 4.6.

Le mécanisme observé le plus fréquemment est la formation de petits objets, agrégats, petites vésicules ou micelles au niveau des pôles faisant face aux électrodes. Ces petites vésicules étaient la plupart du temps expulsées vers l'extérieur du liposome, mais il est aussi arrivé quelquefois qu'elles se retrouvent piégées à l'intérieur du GUV. Les liposomes A et C de la figure 4.3, ainsi que celui de la figure 4.5 ont éjecté leurs lipides de cette manière. Un phénomène similaire a été rapporté dans [Marszalek 95]. Des cellules d'oursin exposées à des champs électriques alternatifs à haute fréquence commencent par être allongées et déformées dans la direction du champ, puis se partagent en deux petites cellules entourées d'un grand nombre de plus petites vésicules.

Le deuxième phénomène que nous avons observé est sans doute le plus fascinant à contempler (voir figures 4.3 et 4.6). Des structures en forme de tubules pouvaient être créées par l'application des impulsions électriques. Les molécules de DOPC expulsées de la membrane formaient alors ces sortes de tubes lipidiques, dont la longueur augmentait avec le nombre d'impulsions reçues. Ces structures apparaissaient dans la vaste majorité des cas sur le pôle du GUV faisant face à l'anode (électrode positive), et demeuraient attachées à l'enveloppe sphérique du liposome. Elles semblaient ensuite se rapprocher de l'équateur, pour finir par couvrir la quasi-totalité de l'hémisphère face à l'anode, comme on peut le constater sur la figure 4.3. Nous avons aussi observé que les tubules pouvaient croître face à la cathode, sur la surface intérieure du liposome. Ces structures diffu-

saient elles-aussi vers les régions équatoriales, mais leur nombre et leur longueur étaient moindres que ceux des tubes issus du pôle face à l'anode, qui abritait la vaste majorité des tubules formés. Notons que ces tubules ont une forme similaire à celle des structures observées dans [Khalifat 08]. L'application de gradients locaux de pH d'environ 4 unités peut causer la création de tels tubules dans des GUVs contenant de la cardioline, ce qui a permis d'étudier dans un système modèle minimal la formation des tubes membranaires caractéristiques des membranes internes de mitochondries.

Enfin, nous avons aussi observé la présence de pores de plusieurs microns de taille face à la cathode, comme rapporté dans [Tekle 01]. La visualisation de ces macropores était plutôt rare en raison de leur durée de vie (de l'ordre de quelques centaines de millisecondes, voir le chapitre 5) similaire au temps d'acquisition d'une image avec le système utilisé lors de ces expériences (microscope confocal Zeiss LSM 510, cf annexe A). Néanmoins, nous avons réussi à quelques reprises à imager de tels événements. La figure 4.4 montre le liposome D qui, après être rentré dans le régime de décroissance au bout de 16 impulsions, a montré la formation de macropores à la suite des seizième et dix-huitième impulsions (cf images D2 et D4). Sur les photos suivantes, on assiste au début de la formation des tubules décrits précédemment. On peut ainsi conclure que ces deux mécanismes pourraient avoir lieu simultanément pour le même GUV. Le fait que nous avons détecté relativement peu de macropores est très vraisemblablement dû à la faible vitesse d'acquisition de notre appareil. Il a été montré récemment que la formation de macropores pouvait être induite dans des GUVs par solubilisation de la membrane, et que ce procédé s'accompagnait de la perte de matériel lipidique et d'une diminution de la taille du liposome [Rodriguez 06].

L'évolution à long terme des structures décrites ci-dessus (après l'arrêt du train d'impulsions) était très variable d'une expérience à l'autre. Les petites vésicules, la plupart du temps, s'éloignaient du GUV dont le rayon restait alors constant. Le comportement des tubules était sujet à beaucoup plus de variations, et dépendait fortement de leur environnement immédiat, et de s'ils entraient en contact avec d'autres objets ou pas. Certains tubules pouvaient se rompre et s'écarter du GUV, en formant de petits agrégats de lipides. D'autres restaient attachés à la membrane et ondulaient dans la solution, à la manière de cheveux dans le vent. Dans certains cas, après quelques minutes, ils pouvaient même être réincorporés dans la membrane du GUV, qui par la suite adoptait une forme finale non sphérique à cause de l'aire lipidique en excès à disposition.

Notons que ces expériences ont été réalisées avec un marqueur fluorescent chargé négativement (Rhodamine PE), mais qu'elles ont aussi été

reproduites avec des marqueurs neutre (Pérylène) ou chargé positivement (DiIC18). Dans tous les cas, la migration des vésicules vers l'anode avait toujours lieu, et l'asymétrie des phénomènes entre les deux pôles était maintenue. On peut donc raisonnablement écarter la charge de la sonde comme cause des différents phénomènes observés sur les deux hémisphères.

4.3.3 Analyse quantitative des données

La réalisation de 51 expériences a permis d'obtenir 51 triplets de valeurs pour les trois paramètres d'ajustement de l'équation 4.8 notés N_c , $\hat{\gamma}^{fit}$ et W_c^{fit} . Les distributions de ces quantités sont données dans les figures 4.7, 4.8 et 4.9. On remarque que les valeurs obtenues pour $\hat{\gamma}^{fit}$ et W_c^{fit} exhibent des variations autour de leur valeur moyenne. Il est normal que ces valeurs mesurées $\hat{\gamma}^{fit}$ et W_c^{fit} fluctuent autour de leurs vraies valeurs $\hat{\gamma}$ et W_c . En effet, dans notre système, le champ électrique perçu par la vésicule d'intérêt sera soumis à des fluctuations locales, notamment à cause de la présence d'autres vésicules en solution. On peut aussi s'attendre à ce que l'évolution de la tension de surface du GUV au fil de chaque expérience soit différente (par exemple à cause des diverses manières de perdre des lipides) ce qui peut causer des variations dans la mesure des seuils de perméabilisation [Riske 05]. Ces deux effets impliquent des variations sur les valeurs mesurées W_c^{fit} . Les fluctuations de $\hat{\gamma}^{fit}$ peuvent s'expliquer par une variation du nombre et de la nature de défauts présents dans la vésicule lors du régime de décroissance. Cette hypothèse est légitime étant donné que nous avons vu que l'entrée dans le régime de décroissance (et donc l'apparition de défauts) est de nature stochastique.

On peut commencer l'analyse en considérant la moyenne de toutes les courbes expérimentales, et en ajustant ce nouveau jeu de données avec la formule 4.8. On obtient alors les valeurs $N_c = 1.73$, $\hat{\gamma} = 0.16$ et $W_c = 0.65$, signifiant qu'une vésicule aurait besoin de subir deux impulsions avant de commencer à rétrécir, qu'elle perdrait alors 16% de l'aire perméabilisée par impulsion, et que son rayon final serait égal à 0.65 fois son rayon initial.

Une deuxième façon de procéder est de calculer les moyennes arithmétiques des 51 triplets de paramètres $\langle N_c \rangle$, $\langle \hat{\gamma}^{fit} \rangle$ et $\langle W_c^{fit} \rangle$. Cette méthode donne les résultats suivants : $\langle N_c \rangle = 4.99$, $\langle \hat{\gamma}^{fit} \rangle = 0.25$ et $\langle W_c^{fit} \rangle = 0.58$.

Notons que les deux valeurs ainsi obtenues pour N_c sont compatibles avec la valeur $1/q = 3$ obtenue en ajustant une distribution géométrique de paramètre q (cf équation 4.9) à la distribution des valeurs mesurées de N_c .

Les données ont été examinées afin de savoir s'il existait des corrélations entre les valeurs ajustées de β et W_c et le rayon initial des vésicules, mais aucune tendance particulière n'a été remarquée. Ceci valide notre description du rétrécissement des liposomes à l'aide des rayons adimensionnels $W(n)$.

4.4 Discussion

Des liposomes géants soumis à des impulsions électriques rétrécissent donc bel et bien, et l'expulsion de lipides a lieu par le biais de différents mécanismes : l'éjection de petites vésicules, la formation de tubules, ou la création de macropores. Ce comportement est très différent de celui de cellules vivantes, qui ont plutôt tendance à gonfler lors de l'électropulsation [Kinosita 77, Abidor 93, Abidor 94, Golzio 98].

Les résultats expérimentaux, avec le modèle théorique associé, nous conduisent à proposer le scénario suivant. La perte de lipides a lieu en deux étapes. Tout d'abord, si l'impulsion électrique est assez intense, la membrane passe d'un état inactif, sans défauts, à un état comportant des défauts, nécessaires pour entrer dans le régime de décroissance où des lipides sont effectivement perdus après chaque impulsion. Ensuite, l'aire perdue par impulsion est de l'ordre de $\beta \approx 20\%$ de l'aire où la différence de potentiel transmembranaire excède une valeur critique $\Delta\psi_c$. D'après notre estimation $W_c = 0.65$ obtenue en considérant la moyenne de toutes les courbes expérimentales, nous trouvons un potentiel critique $\Delta\psi_c \approx 0.85$ V. En moyennant les W_c^{fit} obtenus individuellement pour chaque liposome, on obtient finalement $\Delta\Psi_c \approx 0.75$ V. Ces valeurs, de l'ordre de 0.8 V, peuvent être comparées avec celles rapportées pour certaines membranes cellulaires $\Delta\Psi_c \approx 1$ V [Tsong 91, Weaver 96] et pour des GUVs composés de 1-stearoyl-2-oleoylphosphatidylcholine et dioleoyl phosphatidylglycerol où $\Delta\Psi_c \approx 1.1$ V [Needham 89].

Récemment, des simulations numériques de dynamique moléculaire ont apporté un éclairage nouveau sur la réorganisation de la membrane pendant le processus d'électroperméabilisation [Tieleman 04, Leontiadou 04, Tarek 05, Tieleman 06, Wohlert 06]. Il semble que le champ électrique intramembranaire, très intense, favorise la pénétration dans le cœur de la bicouche de molécules d'eau à cause de l'interaction entre dipôles d'eau et champ électrique. Ces structures sont appelées pores hydrophobes en raison de la présence d'eau dans la partie hydrophobe de la bicouche. Par la suite, les têtes polaires lipidiques se réorientent pour tapisser les parois internes des pores et former ainsi ce que l'on nomme des pores hydro-

philes. Le mécanisme menant à cette migration met en jeu à la fois des effets hydrophobes et électrostatiques. Les moments dipolaires, orientés normalement à la surface de la membrane (ce qui est à peu près le cas pour du DOPC), sont favorablement orientés par rapport au champ électrique sur un feuillet de la membrane, mais pas sur l'autre. Ceci implique que sur le feuillet où ils sont bien alignés, le champ a tendance à les maintenir en position, alors que sur l'autre feuillet ils peuvent abaisser leur énergie en se tournant vers l'intérieur de la bicouche. Cette tendance peut contribuer à la formation de pores hydrophiles. Le même effet est aussi présent avant l'insertion de molécules d'eau dans la membrane, et aide aussi vraisemblablement à former les défauts conduisant à la pénétration de molécules d'eau. Toutefois, on n'observe pas dans ces simulations le phénomène de perte de lipides, que ce soit lors de la formation des pores ou bien lors de leur fermeture. Ce pourrait être parce que les échelles de temps explorées avec ces approches sont trop courtes. L'autre différence avec nos expériences est bien évidemment la taille très inférieure du système et des pores observés, qui peuvent être considérés comme des précurseurs des macropores. Nous avons vu dans nos expériences que les lipides étaient majoritairement expulsés de manière collective, en formant des structures en forme de tubules ou de petites vésicules. Ces structures ont vraisemblablement une taille minimale, pour des raisons mécaniques et thermodynamiques, et on peut donc légitimement s'attendre à ne pas assister à leur formation si la taille du système simulé est trop faible.

Une description éventuelle du mécanisme de perte de lipides serait que les lipides dont la tête polaire est mal orientée, plutôt que de se tourner vers l'intérieur de la membrane, soient simplement expulsés dans le milieu aqueux environnant. Cette expulsion aurait tendance à augmenter l'énergie libre des lipides due aux interactions hydrophobes, mais aussi à abaisser leur énergie électrostatique. La composante hydrophobique de l'énergie libre pourrait être diminuée en formant des structures organisées du type de celles observées. De plus, dans le cas de la création de petites vésicules, l'énergie électrostatique des lipides mal orientés serait beaucoup plus faible que dans le GUV de départ en raison de la proportionnalité du potentiel transmembranaire induit $\Delta\psi$ au rayon de l'objet. Il semble très difficile que les lipides soient expulsés individuellement de la membrane. Le moment dipolaire p des têtes lipidiques de phosphatidylcholine est de l'ordre de 20 Debyes [Pasenkiewicz-Gierula 99], et l'énergie maximale d'un dipôle mal orienté dans le champ à travers la membrane d'épaisseur a est de l'ordre de $E_D \approx p(\Delta\Psi/a)$. L'énergie hydrophobe d'une chaîne hydrocarbonée modélisée par un cylindre de rayon ρ et de hauteur $l = a/2$ (la moitié de l'épaisseur de la bicouche lipidique) est donnée par

$E_{hydro} \approx 2\pi\rho l\mu$, où μ est une énergie hydrophobe par unité d'aire de l'ordre de 40 mJ/m^2 [Israelachvili 00]. Si on assimile les deux chaînes hydrocarbonées d'un lipide à un cylindre de rayon effectif $\rho = 0.8 \text{ nm}$, on trouve que ces deux énergies se compensent pour une valeur critique du potentiel transmembranaire $\Delta\Psi^*$ au-delà de laquelle le champ électrique peut directement arracher les lipides individuellement, qui vaut

$$\Delta\Psi^* \approx \frac{\pi a^2 \rho \mu}{p} \approx 24 \text{ V} . \quad (4.10)$$

Cette valeur de $\Delta\psi^*$ est nettement supérieure aux valeurs maximales de $\Delta\psi$ atteintes dans nos expériences ($\sim 1.3 \text{ V}$) et aux valeurs de seuils de perméabilisation $\Delta\psi_c$ déterminées par diverses méthodes sur différents types de membranes ($\sim 1 \text{ V}$). Il en découle qu'avec les valeurs de champ électrique utilisées typiquement dans nos expériences, il est très improbable que les lipides soient arrachés de la membrane individuellement. Il semble plus plausible que l'éjection de lipides ait lieu de manière collective, en formant des structures aptes à minimiser leur énergie hydrophobe, telles que les petites vésicules, micelles, ou tubules que nous avons observés.

Il existe une asymétrie frappante entre les deux hémisphères des GUVs lors de l'électroperméabilisation, comme déjà remarqué dans [Tekle 01] sur des vésicules de DOPC ou dans [Tekle 94] sur cellules. Les structures tubulaires se forment la plupart du temps face à l'anode, et les macropores, bien que rarement observés avec ce dispositif, face à la cathode.¹ Cette rupture de symétrie pourrait avoir pour origine, par exemple, l'anisotropie des propriétés diélectriques de la bicouche lipidique, ou bien la différence entre les anions Na^+ et les cations Cl^- présents dans le milieu de pulsation. Le fait que l'on observe des comportements variés pour l'éjection de lipides pourrait être lié à la tension initiale de la vésicule. En effet, ce paramètre n'est pas contrôlé dans nos expériences, et il a déjà été rapporté que des GUVs provenant du même échantillon pouvaient exhiber des fluctuations de tension de surface initiale suffisamment importantes pour affecter les phénomènes d'électroperméabilisation [Riske 05]. La formation des tubules peut être comprise qualitativement avec les idées décrites dans [Fournier 09]. Dans ce travail, un modèle physique a été proposé dans le but d'expliquer la création de tubules dans des GUVs soumis à des gradients locaux de pH, tout comme dans [Khalifat 08]. Les auteurs avancent l'idée que la nucléation de tubules peut être favorisée par le fait que l'aire

1. Nous verrons par la suite, au chapitre 5, que lorsqu'on image la vésicule avec une meilleure résolution temporelle, l'observation de macropores créés par des impulsions longues face à la cathode est quasi-systématique.

préférentielle par lipide est différente sur le feuillet de la membrane exposé à la solution basique. Ceci induit une courbure spontanée de la membrane, cette instabilité menant à terme à la formation de structures tubulaires. Dans notre cas où un champ électrique est appliqué à travers le film lipidique, on peut très bien imaginer que l'agencement des têtes polaires, et donc l'aire préférentielle par lipide, sont différents sur les deux feuillets en raison de la tendance des dipôles à vouloir s'aligner avec le champ électrique.

Un autre aspect intéressant de nos résultats est le fait que toutes les vésicules ne commencent pas à rétrécir et éjecter des lipides dès l'application de la première impulsion, mais après un nombre d'impulsions N_c adoptant une distribution exponentielle. Ceci implique que la vésicule a besoin de se trouver dans un état particulier, induit par le champ avec une certaine probabilité, afin d'entrer dans son régime de décroissance. La différence entre ce régime de décroissance et l'état initial de la membrane n'est pas très claire, mais on peut être tenté de spéculer que dans ce régime de décroissance, la bicouche possède des défauts facilitant l'expulsion de lipides. Cette observation est compatible avec l'idée que l'électropulsation crée des défauts dans les membranes de durée de vie relativement longue, et que cette création de défauts est de nature stochastique. Le nombre et la nature de ces défauts sont vraisemblablement différents d'une vésicule à l'autre, ce qui pourrait expliquer les variations de λ , le paramètre caractérisant la quantité de lipides perdue par impulsion.

4.5 Figures du chapitre 4

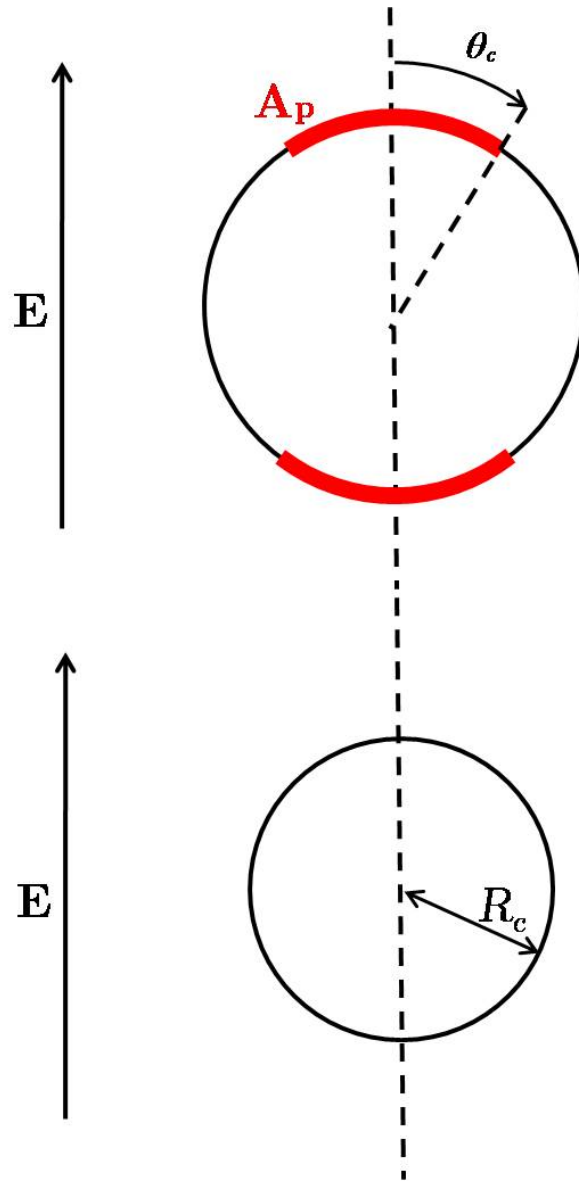
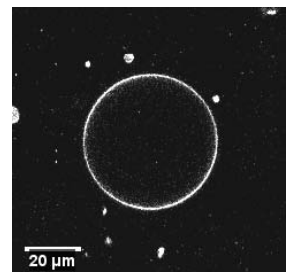


FIGURE 4.1: Représentation du rayon critique R_c , de l'angle critique θ_c et de l'aire perméabilisée A_p .



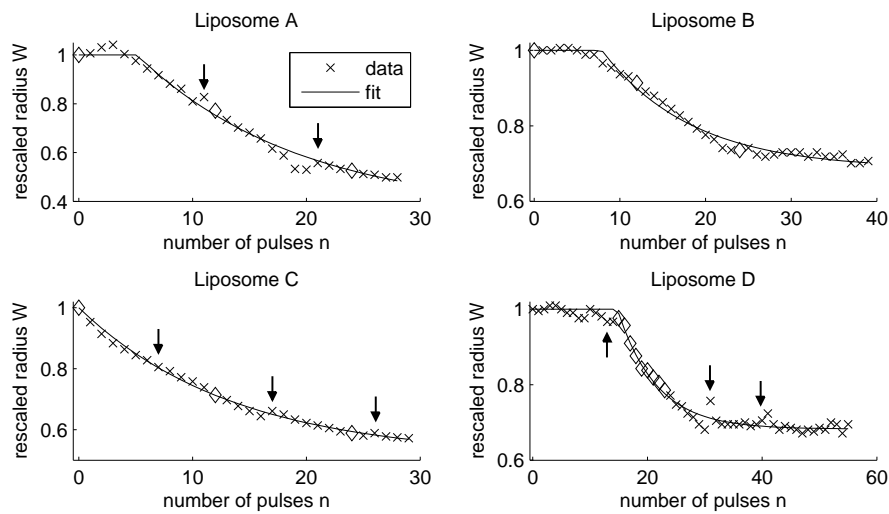


FIGURE 4.2: Exemple typique de 4 jeux de données. Liposome A; l'ajustement donne $N_c \approx 6$, $\hat{\eta} \approx 0.13$, et $W_c \approx 0.35$. Liposome B; l'ajustement donne $N_c \approx 9$, $\hat{\eta} \approx 0.19$, et $W_c \approx 0.69$. Liposome C; l'ajustement donne $N_c \approx 1$, $\hat{\eta} \approx 0.15$, et $W_c \approx 0.51$. Liposome D; l'ajustement donne $N_c \approx 16$, $\hat{\eta} \approx 0.30$, et $W_c \approx 0.68$. L'amplitude des impulsions est de 29, 36, 23.5, et 30 kV/m, respectivement. Les flèches indiquent les données juste avant lesquelles le train d'impulsions a été interrompu afin de refaire la mise au point. L'intervalle de temps entre deux points à ces endroits est d'environ 10 secondes, au lieu de 2 secondes partout ailleurs.

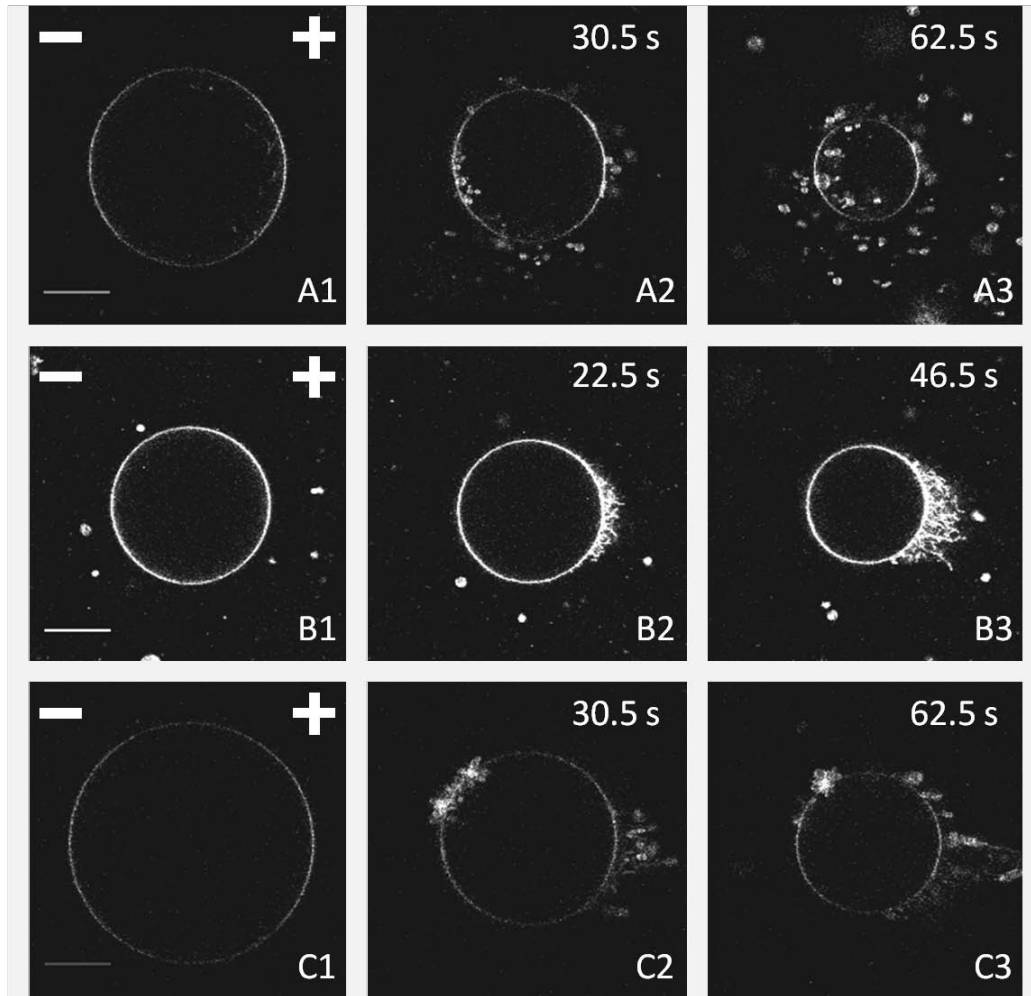
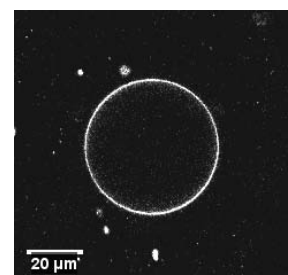


FIGURE 4.3: Images des liposomes A, B et C, aux temps indiqués par les diamants sur la figure 4.2, correspondant à 0, 12 et 24 impulsions reçues. Les liposomes A et C perdent des lipides *via* la formation de petites vésicules, et le liposome B *via* la formation de tubules. Les barres d'échelle (longueur $20 \mu\text{m}$) et la position des électrodes sont affichées sur la première image de chaque séquence. L'amplitude des impulsions était 29, 36, et 23.5 kV/m , respectivement. Les temps dans les coins supérieurs droits indiquent quand les images ont été acquises, l'origine des temps étant l'application de la première impulsion. Aucun temps signifie que l'image a été acquise avant le début de la séquence d'impulsions.



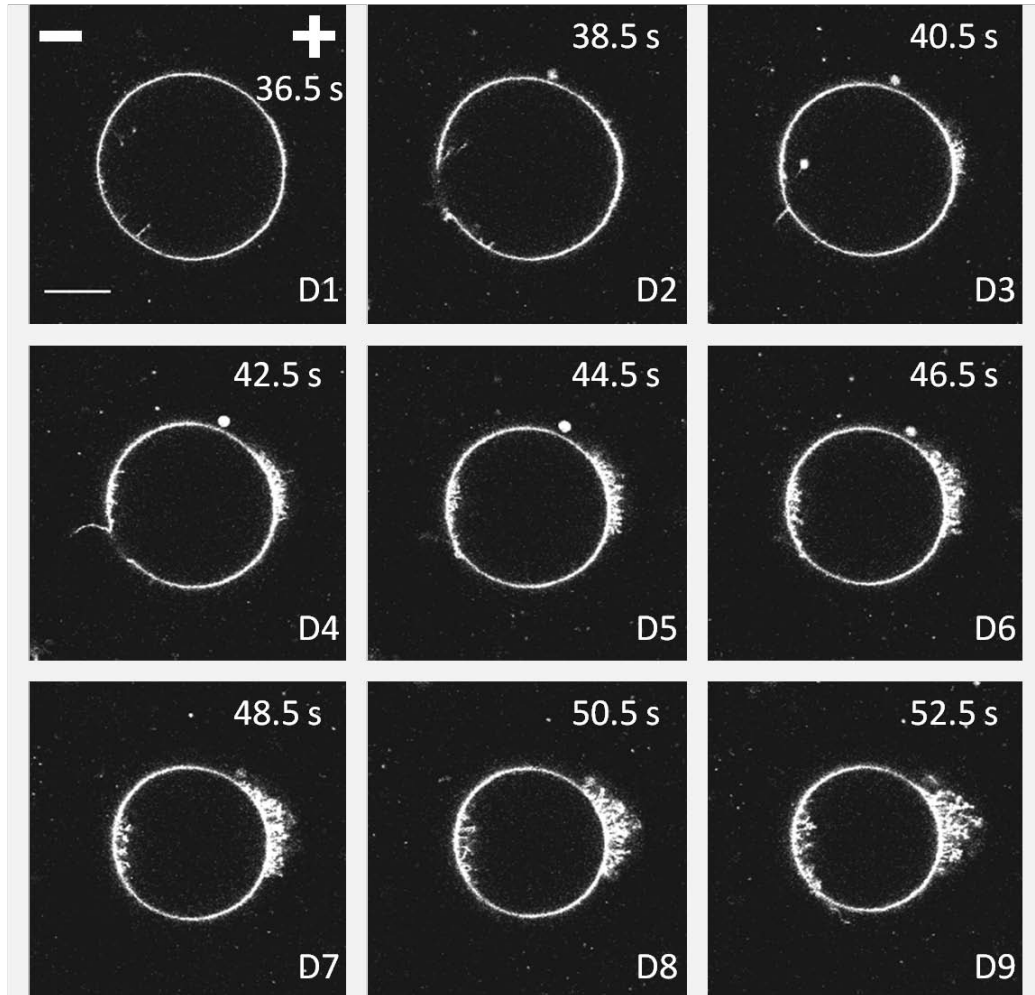


FIGURE 4.4: Images du liposome D aux temps indiqués par les diamants sur la figure 4.2. L'image D1 a été acquise après 15 impulsions, D2 après 16, D3 après 17, *etc.* On peut voir des macropores au niveau du pôle faisant face à la cathode sur les photos D2 et D4. La barre d'échelle de $20\ \mu\text{m}$ et la position des électrodes apparaissent sur la première image. L'amplitude des impulsions était $30\ \text{kV/m}$. Les temps dans les coins supérieurs droits indiquent quand les images ont été acquises, l'origine des temps étant l'application de la première impulsion.

Chapitre 4. Diminution de taille de GUVs soumis à des impulsions électriques

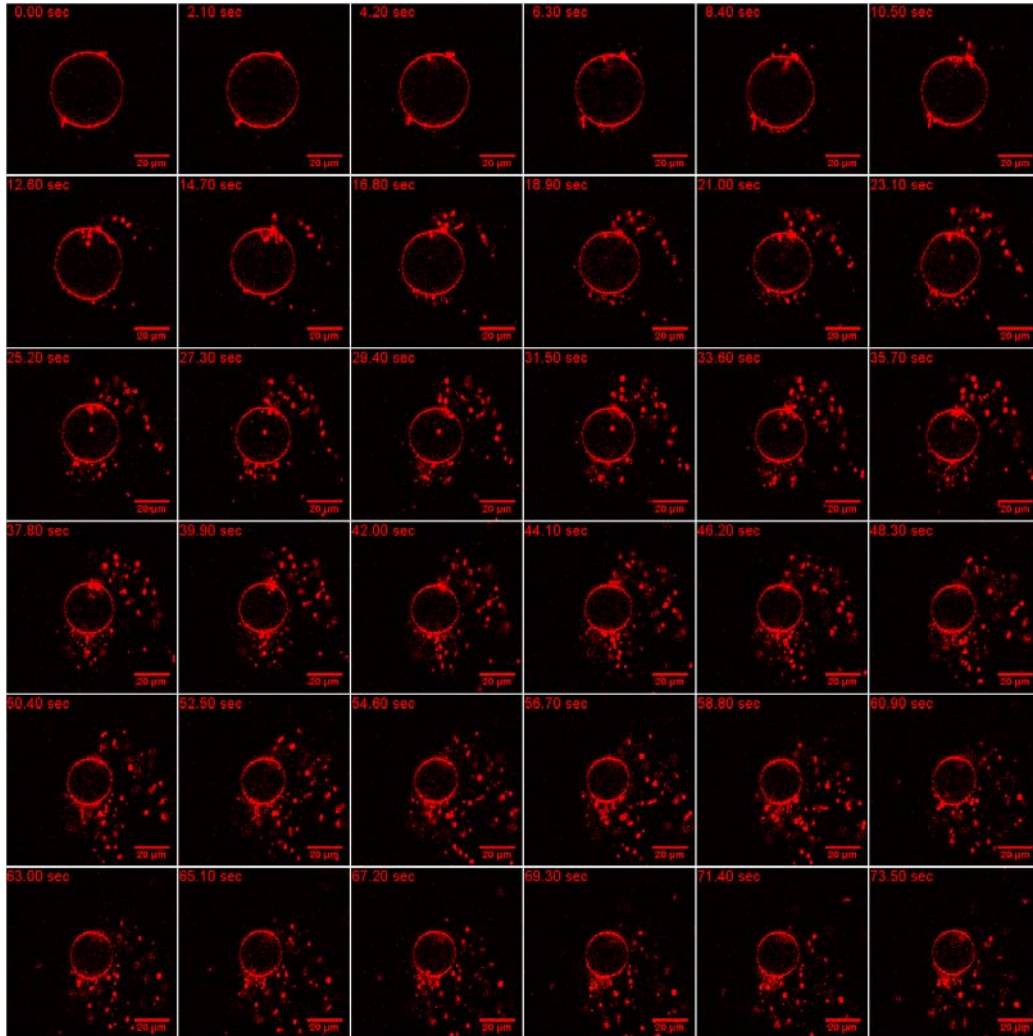
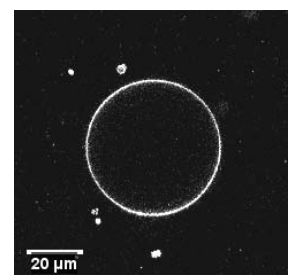


FIGURE 4.5: Séquence détaillée montrant la perte de lipides sous forme de petites vésicules, pour un liposome soumis à des impulsions électriques de 41 kV/m. Sur ces images, le champ électrique est orienté du bas vers le haut.



Chapitre 4. Diminution de taille de GUVs soumis à des impulsions électriques

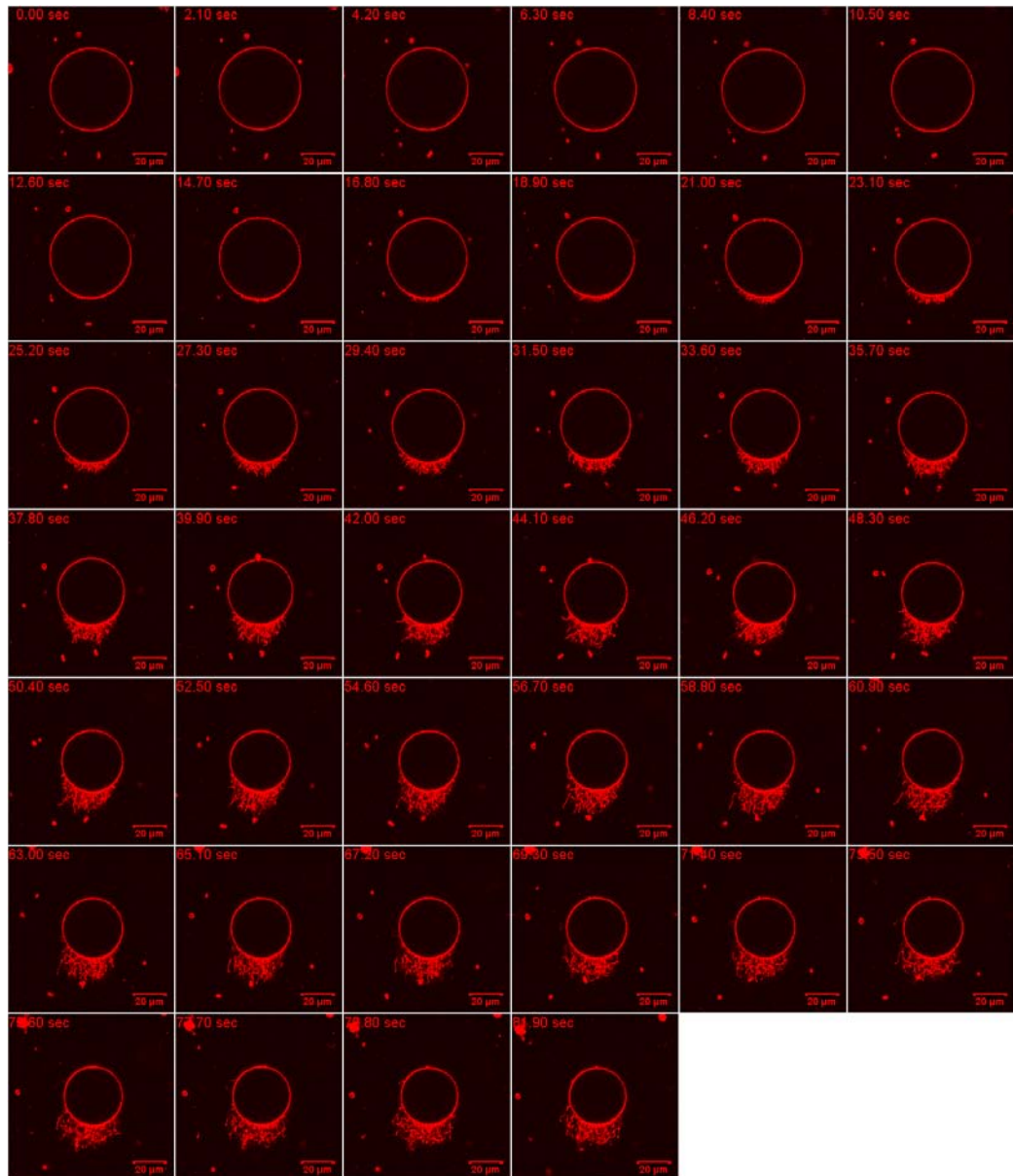


FIGURE 4.6: Séquence détaillée montrant la perte de lipides sous forme de tubules, pour le liposome B des figures 4.2 et 4.3. Le champ électrique, de magnitude 36 kV/m, est orienté de bas en haut sur ces images.

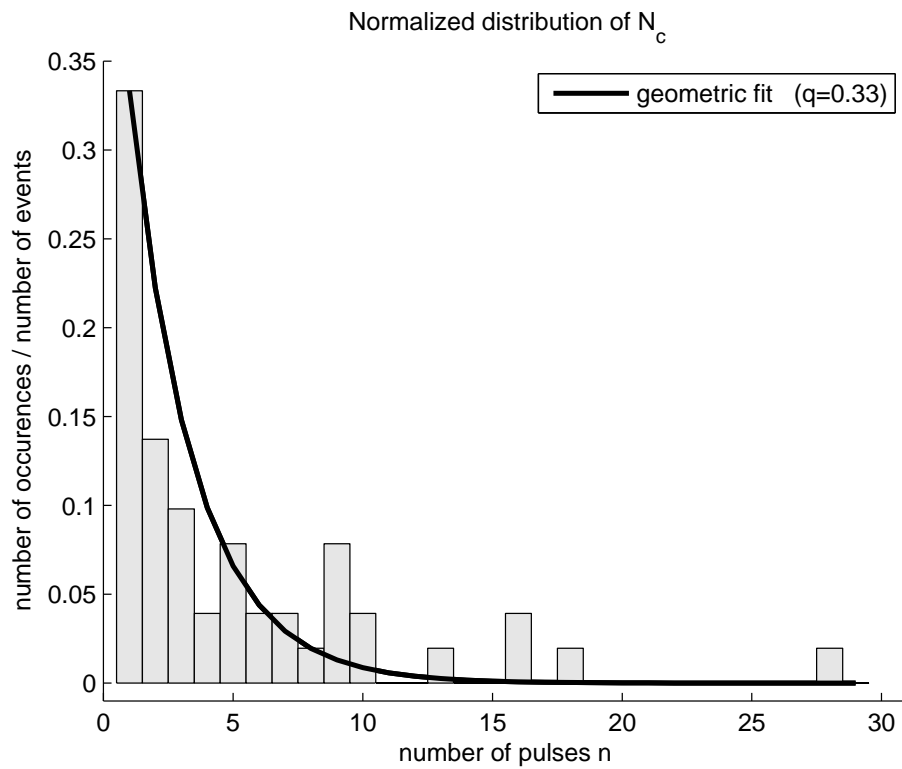
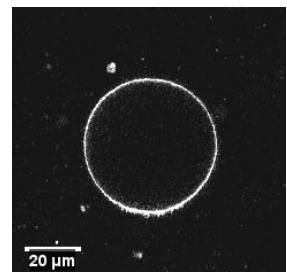


FIGURE 4.7: Distribution normalisée des valeurs de N_c obtenues expérimentalement. La courbe noire représente une distribution géométrique d'équation 4.9 ajustée aux données avec le paramètre $q = 0.33$.



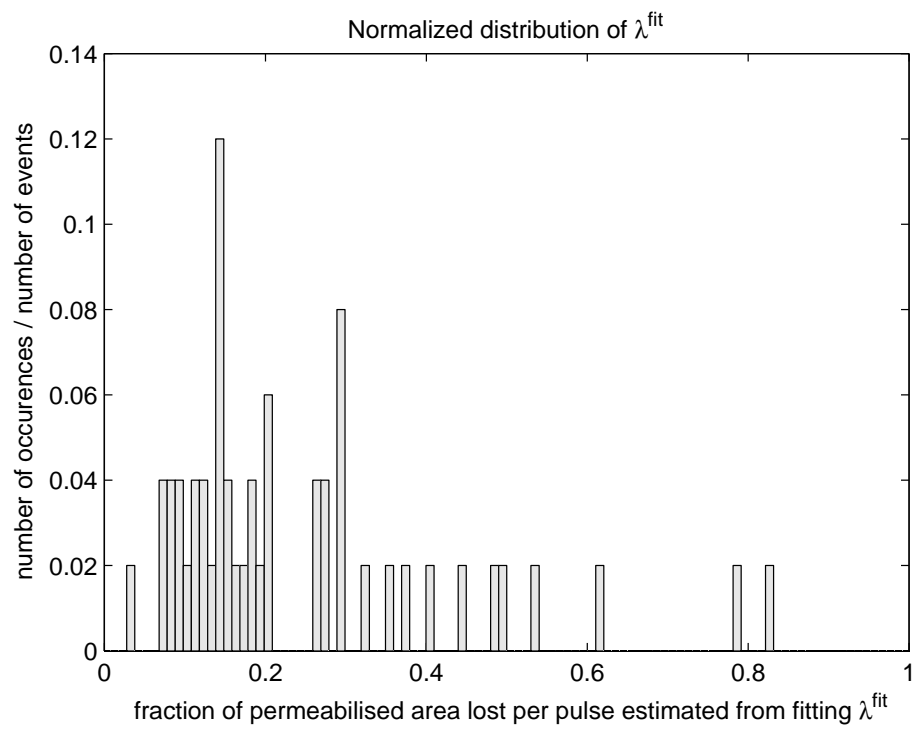


FIGURE 4.8: Distribution des valeurs de $\hat{\lambda}^{\text{fit}}$ obtenues par la procédure d'ajustement.

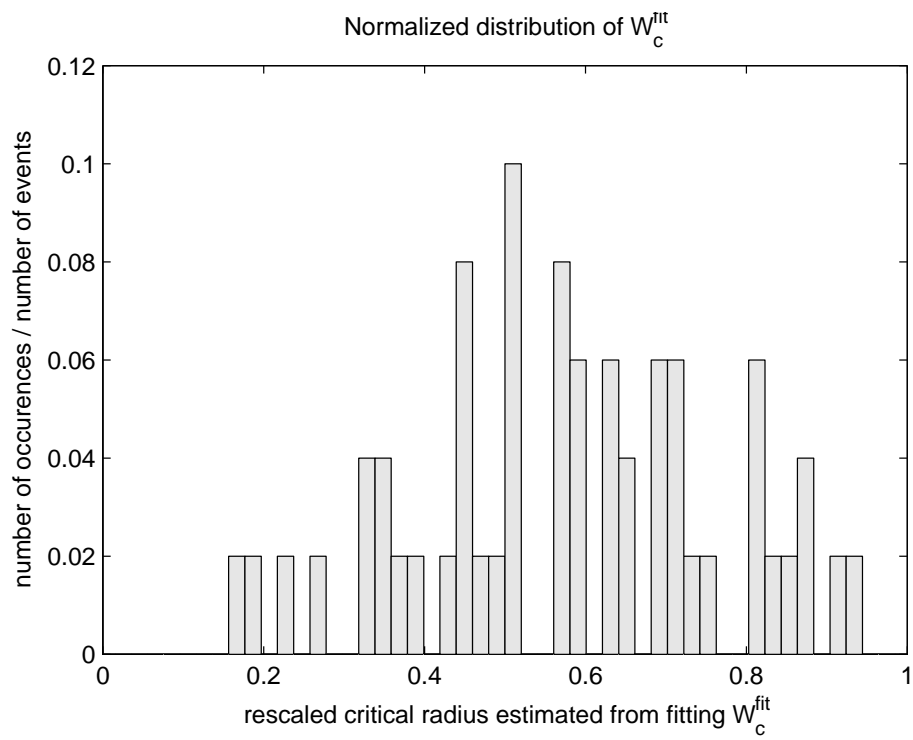
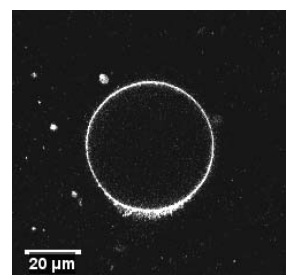


FIGURE 4.9: Distribution des valeurs de W_c^{fit} obtenues par la procédure d'ajustement.



Chapitre 4. Diminution de taille de GUVs soumis à des impulsions électriques

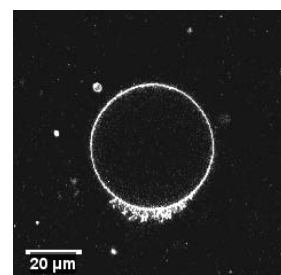
Chapitre 5

Une nouvelle méthode pour mesurer la tension de bord et la stabilité de bicouches lipidiques

Contexte

Ce travail a été réalisé au printemps 2009, pendant les trois mois que j'ai passés à Potsdam en Allemagne, à l'Institut Max Planck de Recherche sur les Colloïdes et Interfaces, au sein du groupe de Rumiana Dimova. En utilisant une caméra rapide, je me suis vite rendu compte que les impulsions électriques que j'utilisais couramment dans les expériences sur la diminution de taille de GUVs (de durée 5 ms et d'amplitude de l'ordre de 50 kV/m induisant des potentiels transmembranaires $\Delta\psi \sim 1 - 1.5$ V) provoquaient l'apparition de macropores sur l'hémisphère de vésicules de phosphatidylcholine faisant face à la cathode.

Ces observations ont un intérêt pour l'étude fondamentale des mécanismes de l'électroperméabilisation; elles pointent du doigt la différence de comportement entre cellules vivantes et vésicules géantes. En outre, elles ont permis de développer une nouvelle méthode de mesure de la tension de bord de bicouches lipidiques. Nous proposons une approche basée sur un modèle théorique de l'évolution de macropores dans des GUVs [Brochard-Wyart 00]. Cette méthode basée sur l'analyse de la vitesse de fermeture d'un macropore est une variante de la méthode décrite dans [Karatekin 03]. En s'intéressant à la taille initiale des macropores créés par les impulsions électriques, nous sommes aussi en mesure d'évaluer le potentiel critique $\Delta\psi_c$ permettant de provoquer la poration de la vésicule, et ainsi d'évaluer la tension de lyse σ_{lys} qui reflète la stabilité de la membrane. Ce travail a donné lieu à un manuscrit accepté pour publication dans *Biophysical Journal*, dont une copie est fournie en annexe E.



5.1 Introduction aux tensions de bord

Quand un pore est créé dans une membrane biologique par une perturbation externe, les lipides se réorientent de manière à ce que leurs têtes polaires tapissent les parois internes du pore. On parle dans ce cas de pore hydrophile [Litster 75]. Ce réarrangement est favorable énergétiquement car il permet de protéger les queues hydrophobes d'une exposition directe à l'eau. Cependant il existe tout de même un prix à payer pour réorganiser les lipides le long du bord du pore. Le coût en énergie par unité de longueur est appelé tension de bord et est de l'ordre du picoNewton [Boal 02]. La tension de bord provient des propriétés physicochimiques et de la nature amphiphile des lipides, et donne naissance à la force responsable de la fermeture des pores [Brochard-Wyart 00].

Les tensions de bord ont une importance majeure en biologie. Elles contribuent aux propriétés d'auto-assemblage et d'auto-réparation des bicouches lipidiques nécessaires à la compartimentation indispensable à la vie. Elles gouvernent la transition disque-vésicule pour de petits systèmes de phosphatidylcholines d'œuf mélangées à un détergent [Fromherz 86], et jouent aussi un rôle fondamental dans les processus de réparation membranaire à l'œuvre après les protocoles thérapeutiques tels que la sonoporation [Newman 07] ou bien sûr l'électroporation [Escoffre 09]. Être capable de mesurer les tensions de bord est donc d'un grand intérêt pour l'étude de phénomènes biologiques et physicochimiques dans les membranes. Des études fondées sur des simulations de dynamique moléculaire ont aussi permis de dériver des valeurs de tensions de bord pour de nombreux systèmes, contenant un ou plusieurs types de lipides et/ou d'autres types de molécules [Leontiadou 04, Jiang 04, Tolpekina 04, de Joannis 06, Jiang 07, Moldovan 07, Leontiadou 07].

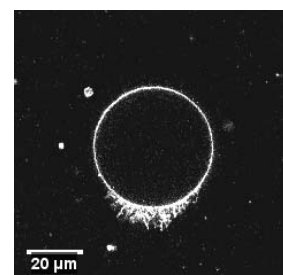
Seul un petit nombre d'approches de mesure des tensions de bord a été développé à ce jour, dont nous allons lister les principales caractéristiques. Une des difficultés majeures reste la visualisation des pores dans la membrane. Des méthodes indirectes impliquant la mesure de propriétés moyennes sur des grandes populations de petites vésicules sont envisageables, comme par exemple dans l'étude de la fuite de vésicules induite par choc osmotique [Taupin 75]. Malheureusement, l'utilisation dans ces mesures de solutions salines très concentrées a une influence significative sur les propriétés physiques de la membrane [Pabst 07]. Une approche élégante est fondée sur la congélation rapide de cellules après un laps de temps précis suivant l'électroporation des cellules, et sur l'examen des pores en microscopie électronique [Chang 90]. Cependant, cette méthode ne fournit qu'une image statique, figée, de la membrane, et demeure sujette

à tous les risques inhérents à la congélation. Un autre moyen de mesurer les tensions de bord a été mis en œuvre sur des bicouches supportées dans [Loi 02], à l'aide d'un microscope à force atomique, mais dans cette approche, c'est le support qui pourrait influencer le comportement membranaire. Des mesures de la dépendance de la tension électrique au temps moyen de vie de pores dans des films lipidiques noirs électropulsés ont aussi permis d'estimer des tensions de bord [Melikyan 90, Genco 93], même si de telles membranes ont habituellement une tension de surface élevée et peuvent toujours renfermer des solvants organiques dans leur cœur hydrophobe.

Les systèmes et approches listés ci-dessus ne permettent pas d'observer directement les pores et leur dynamique. Un système plus pratique est le GUV [Luisi 00], qui ayant une taille comparable à celle des cellules eucaryotes, peut être visualisé en microscopie optique et est largement employé pour l'étude des propriétés membranaires [Dimova 06].

Très peu de travaux ont mesuré des tensions de bord sur des GUVs. L'observation de vésicules géantes cylindriques et ouvertes, soumises à un champ alternatif a permis d'estimer des tensions de bord mais cette approche n'a pu être appliquée qu'à trois vésicules [Harbich 79]. Dans une autre étude, des pores étaient créés dans les vésicules grâce à une impulsion électrique, puis maintenus ouverts en ajustant la tension de surface de la membrane avec une micropipette [Zhelev 93], ce qui conduisait *in fine* à une mesure de la tension de bord. Cette technique nécessite toutefois un équipement sophistiqué, tel le matériel utilisé pour l'aspiration des vésicules par micropipettes. Des liposomes géants ont aussi été utilisés dans [Karatekin 03, Puech 03], où la dynamique de fermeture des pores était analysée dans le cadre d'une théorie développée auparavant [Brochard-Wyart 00]. Cependant, le suivi de la fermeture des pores en microscopie de fluorescence nécessitait l'utilisation de sondes fluorescentes dans la membrane, et de milieux visqueux (solutions contenant du glycérol), qui peuvent tous deux avoir une influence sur la tension de bord.

De manière similaire, nous utilisons aussi le modèle théorique développé par Brochard-Wyart *et al.* [Brochard-Wyart 00] décrivant la dynamique des pores. Le principe de notre méthode est très simple. Il faut juste créer un pore dans un GUV, et mesurer sa vitesse de fermeture qui d'après [Brochard-Wyart 00] peut être reliée à la tension de bord γ . La création d'un pore peut être obtenue par l'application d'une tension à la membrane du GUV. Une fois que la tension de surface excède une valeur critique nommée tension de lyse [Boal 02], la membrane se rompt et un pore transitoire peut apparaître. Karatekin *et al.* ont utilisé l'illumination par lumière visible pour générer leurs pores, mais il existe dans ce cas



un risque que l'illumination intense déclenche des processus d'oxydation dans la bicouche [Ayuyan 06, Zhao 07]. Sandre *et al.* ont utilisé l'adhésion de GUVs sur un substrat de verre, mais cette démarche ne donne pas un bon contrôle sur le procédé de poration [Sandre 99].

Ici, tout comme dans [Zhelev 93], nous utilisons des impulsions électriques pour générer des pores de plusieurs microns de taille dans les GUVs. Nous observons la fermeture des pores en contraste de phase à l'aide d'une caméra rapide, ce qui nous affranchit de l'utilisation de glycérol ou de marqueurs fluorescents dans la membrane. Les pores se referment en quelques dizaines ou centaines de millisecondes, ce qui implique des tensions de bord de l'ordre du picoNewton, compatibles avec les valeurs trouvées dans la littérature. Nous étudierons l'influence de la composition de la membrane sur la tension de bord, par l'inclusion de cholestérol ou d'un autre type de lipide, du DOPE. En outre, nous pourrions aussi évaluer la différence de potentiel critique $\Delta\psi_c$ à appliquer à la membrane pour parvenir à créer un macropore, et nous traduirons ces résultats en termes de tensions de lyse.

5.2 Description de la méthode

5.2.1 Considérations théoriques sur la dynamique des pores

Rappelons le modèle théorique développé dans [Brochard-Wyart 00]. On considère une vésicule sphérique de rayon initial R_{in} soumise à une tension de surface initiale σ_0 , dans un milieu de viscosité η . Quand la tension de surface de la vésicule augmente, un pore peut se créer, ce qui permet de relâcher la tension. Nous avons donc trois variables dynamiques potentiellement couplées : le rayon de la vésicule R , la tension de la membrane σ , et le rayon du pore r . Trois équations pourraient donc être suffisantes pour décrire pleinement l'évolution du système. Si l'on considère l'étirement de la membrane par la tension de surface σ et si l'on suppose que le nombre de lipides dans la membrane est conservé pendant l'ouverture et la fermeture du pore, on obtient en calculant les aires du pore et de la vésicule :

$$\frac{\sigma}{\sigma_0} = 1 - \frac{r^2}{r_c^2} - \frac{4(R_{in}^2 - R^2)}{r_c^2}, \quad (5.1)$$

où $r_c^2 = 4(R_{in}^2 - R_0^2)$, et R_0 désigne le rayon de la vésicule sous tension nulle. La seconde équation, donnée par la dynamique des pores dans des

vésicules où la viscosité de la membrane domine [Debrégeas 95], s'écrit :

$$\eta_s \frac{\dot{r}}{r} = \sigma - \frac{\gamma}{r}, \quad (5.2)$$

où η_s désigne la viscosité de surface de la membrane lipidique, γ la tension de bord, et \dot{r} la dérivée de r par rapport au temps t . La troisième et dernière équation gouverne l'évolution du rayon de la vésicule R . Elle est dérivée en considérant le flux de la solution interne à travers le pore, et en estimant la vitesse de fuite en égalant la pression de Laplace et les tensions de cisaillement en jeu. Elle prend la forme

$$\frac{2\sigma}{3\eta R} r^3 = -4\pi R^2 \dot{R}. \quad (5.3)$$

On dispose à présent d'un système de trois équations régissant l'évolution des trois variables r , R et σ . Brochard-Wyart *et al.* ont mis en œuvre une résolution numérique de ce système d'équations, et donné des solutions analytiques pour certains cas limites [Brochard-Wyart 00]. Nous nous concentrons ici sur les résultats dans la limite correspondant à nos expériences sur GUVs. Dans cette limite, la vie d'un pore comporte quatre étapes consécutives :

- (i)** une période de croissance,
- (ii)** l'atteinte du rayon de pore maximal,
- (iii)** le régime quasistatique durant lequel r décroît lentement (ou régime de fermeture lente),
- (iv)** un dernier stage de fermeture rapide.

Le pore passe la majeure partie de sa vie dans le régime (iii) de fermeture lente, qui est utilisé pour déterminer la tension de bord. Si le rayon r du pore change très lentement, on peut faire l'approximation quasi-statique $r\sigma \approx \gamma$ dans l'équation 5.2. En dérivant l'équation 5.1 par rapport au temps on obtient

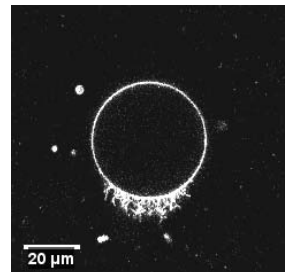
$$r\dot{r} \approx 4RR\dot{R}. \quad (5.4)$$

L'insertion de l'équation 5.4 et de $r\sigma \approx \gamma$ dans l'équation 5.3 donne finalement

$$R^2 \frac{\dot{r}}{r} \approx -\frac{2\gamma}{3\pi\eta}. \quad (5.5)$$

Si l'on intègre cette équation en supposant que R reste constant (ceci sera justifié par la suite), on trouve que la quantité $R^2 \ln(r)$ doit décroître linéairement en fonction du temps t avec une pente $a = -2\gamma/(3\pi\eta)$:

$$R^2 \ln(r) = -\frac{2\gamma}{3\pi\eta} t + C. \quad (5.6)$$



Nous suivons l'évolution temporelle du rayon du pore r et mesurons le rayon R de la vésicule. Nous en déduisons la pente α de la partie à décroissance linéaire de $R^2 \ln(r)$ correspondant à la phase de fermeture lente. La tension de bord γ est ensuite obtenue en utilisant la relation $\gamma = -(3/2)\pi\eta\alpha$.

5.2.2 Caractéristiques de la formation de macropores par électropulsation

Le pore est créé par l'application d'une impulsion électrique de durée égale à 5 ms et d'amplitude de l'ordre de 50 kV/m, induisant une différence de potentiel à travers la membrane de l'ordre de 1 V (exactement le même type d'impulsions que celles décrites au chapitre 4). De telles impulsions peuvent créer des pores de plusieurs microns de diamètre [Portet 09, Tekle 01], d'où l'appellation de macropores. Nous enregistrons l'évolution de la taille du pore par microscopie à contraste de phase rapide, ce qui nous permet d'éviter d'avoir recours à du glycérol et à des sondes membranaires fluorescentes. C'est là le principal avantage de notre méthode sur celles existant à ce jour. En effet, on sait que le glycérol interagit avec les membranes de phosphatidylcholines, par exclusion de la couche d'hydratation et partitionnement dans la membrane [Westh 03]. Il est donc tout à fait concevable que la présence de glycérol ait une influence sur la tension de bord qui dépend de la répulsion entre les têtes polaires lipidiques et de la conformation des chaînes hydrocarbonées, comme le prédit le modèle théorique de May [May 00]. Les sondes fluorescentes, quant à elles, pourraient poser problème à cause d'un partitionnement préférentiel entre le bord du pore et le reste de la bicouche. C'est pour ces raisons que nous pensons que notre méthode de mesure des tensions de bord, basée sur l'utilisation d'imagerie à contraste de phase rapide ne nécessitant ni glycérol ni molécules fluorescentes, peut potentiellement donner des valeurs plus précises.

Il est effectivement possible de mesurer avec précision la taille de pores situés dans le plan de mise au point de la vésicule, comme rapporté dans des études antérieures sur l'électroporation ou la fusion de GUVs [Riske 05, Haluska 06]. La dépendance angulaire du potentiel transmembranaire induit par l'impulsion électrique et la géométrie de la chambre de pulsation assurent que les pores se situent principalement dans ce plan, plus précisément face aux électrodes. Pour améliorer le contraste dans les images de vésicules, nous avons employé l'astuce classique qui consiste en l'utilisation de différents sucres à l'intérieur (saccharose) et à l'exté-

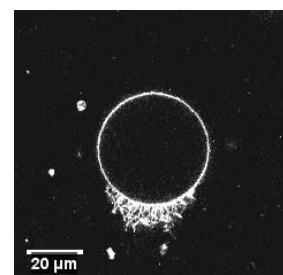
rieur (glucose) de la vésicule. Grâce à la différence d'indices de réfraction entre les milieux interne et externe, les vésicules apparaissent sombres et entourées d'un halo lumineux plus clair, comme on peut le voir sur la figure 5.1A. De plus, elles reposent au fond de la chambre d'observation à cause de la différence de densité entre la solution de saccharose et celle de glucose. La membrane de la vésicule se situe aux endroits où les gradients d'intensité de l'image sont maximaux. Quand un pore s'ouvre, les deux solutions de sucres se mélangent et les gradients d'intensité s'annulent dans le voisinage du pore. La création d'un pore dans la membrane entraîne donc une interruption du halo lumineux, que nous utilisons pour mesurer le rayon du pore. Nous avons développé un programme qui détecte et mesure automatiquement la taille des pores, afin d'éviter tout biais induit par l'opérateur (voir annexe B.1).

Notons que plusieurs tout petits pores situés tout près les uns des autres donneraient en principe des images en contraste de phase similaires à celles obtenues avec un unique macropore. Nous avons vérifié en microscopie à fluorescence rapide que l'application d'une impulsion électrique causait bien l'apparition d'un seul macropore. Comme l'atteste la figure 5.2, c'est bel et bien le cas.

La réponse globale de la vésicule et le comportement des pores décrit dans [Brochard-Wyart 00] sont différents de ce que nous observons lors de l'étape de création du pore. L'application du champ électrique conduit à une augmentation graduelle et non uniforme de la tension de surface de la vésicule. Par conséquent, l'approche de [Brochard-Wyart 00] qui suppose une tension constante et uniforme sur le GUV *ne peut pas s'appliquer* pendant l'impulsion, lors de la phase de création du macropore. Néanmoins, après l'impulsion un macropore est effectivement présent, la tension de surface est relâchée et est redevenue uniforme, et le modèle théorique s'applique pour les phases (iii) et (iv) de fermeture du pore.

Cas d'apparition de plusieurs pores Parfois plusieurs macropores peuvent être créés sur une même vésicule, par exemple un au niveau de chaque pôle. Dans ce paragraphe, nous justifions la validité et l'utilisation de l'équation 5.6 pour ce cas de figure. Considérons un GUV de taille R , contenant deux pores de tailles r_1 et r_2 . Les équations 5.1 et 5.3 sont donc modifiées et prennent la forme :

$$\frac{\sigma}{\sigma_0} = 1 - \frac{r_1^2}{r_c^2} - \frac{r_2^2}{r_c^2} - \frac{4(R_{in}^2 - R^2)}{r_c^2} \quad (5.7)$$



et

$$\frac{2\sigma}{3\eta R}(r_1^3 + r_2^3) = -4\pi R^2 \dot{R}. \quad (5.8)$$

Nous avons aussi deux équations analogues à l'équation 5.2 pour les deux rayons r_1 et r_2 , et disposons donc d'un système de quatre équations à quatre inconnues. Avec les mêmes hypothèses qu'à la sous-section 5.2.1, et en supposant que les pores n'interagissent pas entre eux, nous retrouvons des équations analogues à l'équation 5.6 pour la dynamique de fermeture des deux pores. Nous concluons donc que le modèle de [Brochard-Wyart 00] pour l'étape de fermeture lente s'applique bel et bien aux vésicules contenant plusieurs pores. Cette conclusion est supportée par nos observations de la décroissance linéaire en temps de la quantité $R^2 \ln(r)$ pour des vésicules contenant plusieurs pores, comme celle de la figure 5.1 par exemple. Elle est aussi corroborée par la cohérence et la reproductibilité de nos résultats.

À propos de la décroissance de taille du GUV Comme nous l'avons vu au chapitre 4, l'application d'impulsions électriques de 5 millisecondes peut entraîner une diminution de taille du GUV accompagnée par une perte de lipides [Portet 09]. On peut voir sur la figure 5.1 que le rayon de la vésicule peut décroître d'environ 10 %. Cette observation pose la question du bien-fondé de l'approximation $R = \text{cte}$ utilisée pour dériver l'équation 5.6.

Notons R_{in} le rayon initial de la vésicule, puis R_1 et R_2 les rayons de la vésicule au début et à la fin du régime (iii) de fermeture lente, respectivement. Nous avons mesuré expérimentalement que R_2 était égal à R_f , le rayon final du liposome après fermeture complète du pore. Une inspection détaillée des trois rayons R_{in} , R_1 et R_2 pour les 110 GUVs étudiés a révélé que la décroissance de taille de la vésicule survient majoritairement avant l'entrée dans le régime (iii), dans les quelques centaines de microsecondes suivant la fin de l'impulsion. La figure 5.3 représente les variations de rayon normalisées, pour toutes les vésicules observées. Au cours de la totalité de l'expérience, les rayons des vésicules décroissent en moyenne de 7.5 %, alors que la décroissance lors du régime (iii) est de l'ordre de 2.2 %. Dans un nombre relativement important de mesures (33 sur 110), $R_1 - R_2$ est négatif, ce qui suggère une augmentation de la taille du GUV lors du régime (iii). Cependant, cette dispersion des valeurs de $R_1 - R_2$, aussi bien les positives que les négatives, est compatible avec les limites imposées par la résolution de la microscopie optique. Dans notre dispositif, un pixel représente $0.7528 \mu\text{m}$, ce qui implique qu'une erreur d'un pixel lors de la mesure du rayon d'une vésicule conduit à une variation d'environ

4 %, pour un rayon typique de 20 μm . Par conséquent, les changements de rayon observés lors du régime (iii), $R_1 - R_2$, sont comparables avec l'imprécision de la méthode de mesure et on peut raisonnablement affirmer que $R_1 - R_2 \approx 0$, *i.e.* que le rayon de la vésicule reste constant lors du régime (iii). Nous utiliserons la valeur finale du rayon, R_2 , pour la détermination de la tension de bord γ à l'aide de l'équation 5.6.

5.2.3 Potentiel transmembranaire critique et tension de lyse

Pendant l'impulsion, quand la tension de surface excède une valeur critique correspondant à la tension de lyse σ_{lys} , la membrane se rompt et un pore se forme. L'électroporation des membranes est associée au dépassement d'un certain potentiel critique à travers la membrane $\Delta\psi_c$, que nous pouvons évaluer dans nos expériences et utiliser pour déterminer une valeur pour σ_{lys} .

Au moment où le pore est de taille maximale (juste après l'impulsion, cf section 5.3), on peut estimer le potentiel transmembranaire critique à l'aide de la formule de Schwan vue au chapitre 3

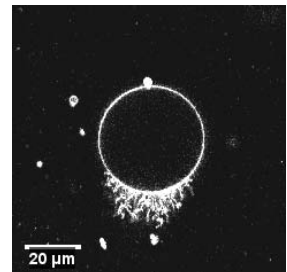
$$\Delta\psi = \frac{3}{2}RE \cos(\vartheta) , \quad (3.3)$$

car le temps de charge de la membrane τ_c (cf équation 3.2), au maximum de l'ordre de 250 μs , est petit devant la durée de l'impulsion. Nous évaluons le potentiel transmembranaire au niveau du bord du pore en remplaçant l'angle ϑ par l'angle ϑ_p délimitant le pore tel que $\cos(\vartheta_p) = \sqrt{1 - r_m^2/R^2}$, où r_m désigne le rayon maximal du pore. Par conséquent, la mesure de r_m nous donnera une estimation de $\Delta\psi_c$ grâce à la formule

$$\Delta\psi_c = \frac{3}{2}E \sqrt{R^2 - r_m^2} \quad (5.9)$$

L'utilisation de l'équation 3.3 sur une membrane déjà perméabilisée est une approximation radicale, conduisant vraisemblablement à une surestimation de $\Delta\psi_c$. Toutefois nous verrons par la suite que les valeurs obtenues avec cette procédure sont en bon accord avec celles figurant dans la littérature.

Il a été aussi expliqué au chapitre 3 que le phénomène d'électroporation pouvait être décrit en termes de contraintes sur la membrane induites par le champ électrique. La différence de potentiel $\Delta\psi$ résultant de l'application du champ donne naissance à une tension de surface additionnelle σ_{el}



donnée par

$$\sigma_{el} = \epsilon_m \epsilon_0 \left(\frac{a}{2a_e^2} \right) \Delta\psi^2, \quad (3.4)$$

où ϵ_m et ϵ_0 dénotent la permittivité relative de la membrane et la permittivité du vide, respectivement, a l'épaisseur totale de la bicouche et a_e celle de la partie hydrophobe. Pour des vésicules possédant une tension de surface initiale σ_0 , la tension totale atteinte durant l'impulsion est

$$\sigma = \sigma_0 + \sigma_{el}. \quad (3.5)$$

La tension totale de la membrane ne peut excéder une valeur pour laquelle la membrane perd son intégrité, appelée tension de lyse. Pour les bicouches lipidiques, la tension de lyse σ_{lys} est de l'ordre de 5 mN/m [Needham 89, Olbrich 00]. Si on néglige la tension de surface initiale (cf paragraphe suivant), on peut évaluer la tension de lyse $\sigma_{lys} \approx \sigma_{el}(\Delta\psi_c)$ pour les différentes compositions membranaires étudiées en utilisant l'équation 3.4. Les valeurs de a proviennent de [Pan 09, Nagle 00]. Pour a_e nous avons pris $a_e = a - 0.99$ nm, en tenant compte de la taille de la tête polaire PC [Tristram-Nagle 10]. Tous ces paramètres figurent dans la table 5.1. Pour la permittivité de la membrane nous avons utilisé $\epsilon_m = 2$, bien que $\epsilon_m = 4$ soit aussi parfois employé (avec cette valeur, nos estimations pour σ_{lys} seraient simplement multipliées par 2).

D'après les équations 3.4 et 3.5, il est clair que les vésicules avec une forte tension initiale doivent former des pores pour des potentiels transmembranaires moins élevés. Nous verrons dans la section suivante que pour les vésicules de DOPC:cholestérol, nous mesurons des seuils d'électroporation plus faibles que pour les autres compositions. Cela ne signifie pourtant pas que ces vésicules sont initialement plus tendues; en effet, il a été mesuré dans [Gracia 10] par analyse des fluctuations que des vésicules de composition similaire n'avaient pas une tension initiale plus élevée, ce qui suggère que les potentiels critiques et les tensions de lyse que nous avons mesurés ne sont pas influencés par la tension initiale σ_0 .

5.3 Résultats

5.3.1 Tension de bord dans des membranes d'EggPC

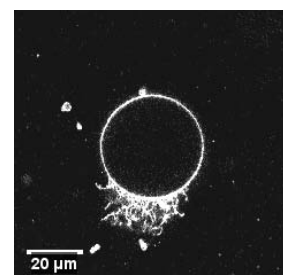
La majorité des données de tensions de bord présentées dans la littérature ayant été collectées sur des vésicules d'EggPC, nous avons tout d'abord testé notre méthode sur des GUVs de cette composition. Comme

indiqué précédemment, nous avons vérifié sur des vésicules d'EggPC marquées à la Rhodamine PE, par microscopie à fluorescence à l'aide d'une caméra rapide EMCCD, qu'un macropore unique était bien créé sur le pôle de la vésicule faisant face à la cathode (cf figure 5.2). Ceci confirme les observations précédentes réalisées avec des vésicules de DOPC [Tekle 01, Portet 09], et indique que ce comportement ne dépend pas des queues hydrophobes mais qu'il est peut-être dû au groupe polaire PC des lipides considérés. Dans un petit nombre d'expériences, on pouvait aussi voir un macropore côté anode, mais cette partie de la vésicule abritant aussi la nucléation de tubules, nous avons préféré concentrer notre analyse sur les macropores côté cathode. Pour les GUVs étudiés, de rayons allant de 10 à 40 μm , les impulsions utilisées induisaient des différences de potentiel de l'ordre de 0.8–1.25 V. Nous avons pu clairement suivre la fermeture du pore en microscopie à contraste de phase, comme le montre la figure 5.1. La première image montre la vésicule encore non perturbée par l'impulsion.

Pendant l'impulsion, *i.e.* pendant les 5 premières millisecondes, les vésicules adoptaient une forme sphéro-cylindrique, avec leur axe de symétrie dans la direction du champ (voir par exemple la figure 5.4B), comme rapporté auparavant pour des GUVs dans des solutions salées [Riske 06]. Les déformations étaient moins prononcées dans nos expériences, vraisemblablement à cause de nos champs de plus faible amplitude, mais duraient plus longtemps en raison de nos impulsions plus longues.

Les pores pouvaient être détectés après environ 5 ms, quasiment à la fin de l'impulsion. Les résolutions temporelle et spatiale de notre dispositif ne nous ont pas permis de détecter la formation et la croissance du pore de manière précise. Il semblait que le pore était créé avec un rayon assez grand de l'ordre de quelques microns, grandissait légèrement pendant les quelques centaines de microsecondes suivantes, se stabilisait au cours des quelques millisecondes subséquentes, puis entamait son régime de fermeture lente. Cette séquence typique d'évènements se produisait pour la quasi-totalité des liposomes étudiés, et ce pour toutes les compositions. Il est encore peu clair si le processus de poration était initié avec un seul macropore créé pendant l'impulsion, ou si plusieurs petits pores étaient formés avant de coalescer juste après l'impulsion. Si le premier scénario est valide, la vitesse d'ouverture du macropore devrait être de l'ordre de plusieurs mm/s, *i.e.* au-delà de notre résolution. Nous penchons plutôt en faveur de la seconde hypothèse avec plusieurs pores de très petite taille car le potentiel critique de poration est déjà atteint au tout début de l'impulsion.

Concentrons-nous maintenant sur l'étape (iii) de fermeture lente utilisée pour la mesure des tensions de bord. Les images de la figure 5.1B-F



correspondent à cette phase, et les images de la figure 5.1G, H montrent la vésicule après fermeture totale du pore. L'image prise après 25 ms, à la figure 5.1B, montre que la membrane du GUV est aussi altérée face à l'anode. Il a déjà été rapporté que cet hémisphère abritait la nucléation de petits pores [Tekle 01] et la génération de tubules [Portet 09], ce qui, outre le fait qu'on n'observait pas systématiquement de poration côté anode, constitue un argument contre l'analyse de la fermeture du pore sur cet hémisphère. La fermeture avait d'ailleurs lieu beaucoup plus rapidement: ce côté du liposome semble intact sur les images suivantes.

Afin d'illustrer la procédure de traitement des images conduisant à la mesure précise du rayon du pore décrite en annexe B.1, nous montrons dans les deuxième et quatrième colonne de la figure 5.1 l'allure des images après traitement correspondant au côté cathode du GUV figurant sur les images adjacentes. Le cercle externe blanc correspond à la frontière entre le halo lumineux entourant la vésicule et le fond gris, alors que le cercle interne indique la position de la membrane. C'est ce cercle interne qui est donc utilisé pour mesurer le rayon r des pores comme indiqué sur la figure 5.1E.

Les GUVs, en général, rétrécissaient à cause de l'impulsion électrique. Ce comportement est cohérent avec celui décrit au chapitre 4 et dans [Portet 09], mais remet en question l'hypothèse $R = \text{cte}$ utilisée pour dériver l'équation 5.6. Or, nous avons vu au chapitre précédent que nous avons pu établir que cette décroissance de taille probablement liée à l'éjection de petites vésicules ou de tubules avait lieu majoritairement dans les quelques centaines de microsecondes suivant l'impulsion, et que lors du régime (iii) la diminution de taille du liposome était quasi-inexistante. L'approximation $R = \text{cte}$ durant le régime (iii) est donc bel et bien fondée pour notre système, et nous devons donc utiliser pour la mesure de la tension de bord γ la valeur de R mesurée après fermeture du pore.

Après avoir mesuré sur les images l'évolution de la taille du pore, nous traçons dans la figure 5.5 avec des cercles gris la taille de la région du pore caractérisée par $R^2 \ln(r)$ en fonction du temps, pour 6 expériences typiquement représentatives des 41 expériences réalisées sur les GUVs d'EggPC. Les lignes pleines noires sont des droites d'ajustement conformes à l'équation 5.6. La tension de bord γ est déduite de la pente de ces droites, qui semblent logiquement parallèles étant donné que la composition membranaire des GUVs est identique. Pour ces membranes d'EggPC, nous trouvons comme valeur moyenne de γ 14.2 pN, avec une erreur standard de 0.7 pN; voir la table 5.2 pour des valeurs de la tension de bord d'EggPC trouvées dans la littérature.

Chaque vésicule étudiée était perméabilisée, ce qui conduisait à un mé-

lange partiel des sucres. Si la perte de contraste associée n'était pas trop importante, nous utilisons encore la même vésicule pour effectuer d'autres mesures de γ , et ainsi confirmer la reproductibilité des résultats. Dans ce cas de figure, les impulsions étaient bien séparées dans le temps, par environ 5 minutes. Le total de 41 expériences sur les bicouches d'EggPC a été réalisé sur 16 vésicules distinctes, provenant de différentes préparations.

5.3.2 Effet de la composition lipidique de la membrane

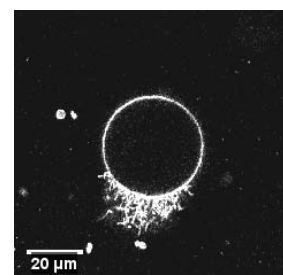
Après avoir testé avec succès notre méthode sur des bicouches d'EggPC, nous avons continué à examiner d'autres compositions. Nous avons tout d'abord choisi des vésicules de DOPC car :

- ce lipide a déjà été utilisé dans d'autres études et nous permettrait de confronter nos résultats à ceux de [Genco 93, Karatekin 03, Chiantia 06],
- le DOPC est un type lipidique pur, alors que l'EggPC est composé de plusieurs espèces pouvant influencer les tensions de bord mesurées.

Les tensions de bord de membranes de DOPC mesurées par électroporation de films lipidiques noirs [Genco 93], par poration par illumination intense [Karatekin 03] ou par microscopie à force atomique [Chiantia 06] varient entre 3.9 et 25 pN, cf table 5.2. La borne supérieure correspond à du DOPC provenant du même fournisseur que nous (Avanti Polar Lipids) ; voir [Karatekin 03] pour une comparaison des lipides provenant de deux producteurs différents. Pour les 24 bicouches de DOPC examinées, notre méthode donne le résultat suivant : $\gamma = 27.7 \pm 2.5$ pN, une valeur en accord avec les résultats précédents.

Après avoir mesuré la tension de bord de systèmes de DOPC pur, nous nous sommes intéressés à l'influence de la présence d'une petite quantité d'autres composés dans la membrane. Nous avons étudié l'effet du cholestérol, car cette molécule est omniprésente dans les membranes eucaryotes. Sa forme de cône inversé devrait *a priori* défavoriser sa localisation le long de la périphérie du pore, et sa présence dans la bicouche requerrait donc vraisemblablement une plus grande quantité d'énergie pour réorganiser les lipides dans les parois du pore, ce qui entraînerait une augmentation de la tension de bord γ , comme déjà observé dans [Karatekin 03]. En effet, pour des membranes de DOPC:cholestérol de rapport molaire 5:1, nous avons trouvé après 14 expériences que la tension de bord augmentait vers une valeur $\gamma = 36.4 \pm 1.9$ pN, ce qui confirmait nos attentes et la tendance déjà rapportée dans [Karatekin 03].

Avec une approche similaire à celle utilisée pour le cholestérol, nous avons examiné l'effet d'un autre lipide, le DOPE, qui à notre connaissance



n'a pas été étudié auparavant. Tout comme le cholestérol, ce phospholipide a une forme de cône inversé, et nous nous attendions donc à observer une augmentation de la tension de bord. Il n'en fut rien. Les 31 bicouches de DOPC:DOPE étudiées, de rapport molaire 5:1, voyaient leur tension de bord diminuer par rapport à celle de bicouches de pur DOPC, adoptant une valeur $\gamma = 15.6 \pm 1.3$ pN.

Tous nos résultats sont récapitulés dans la table 5.2, qui contient aussi des valeurs de tension de bord mesurées par d'autres groupes.

5.3.3 Seuils d'électroporation et stabilité des bicouches

Alors que les GUVs d'EggPC, de DOPC et de DOPC:DOPE ayant reçu une impulsion de l'ordre de quelques dizaines de kV/m voyaient leurs pores se refermer très rapidement, de telles impulsions déstabilisaient complètement les liposomes de DOPC:cholestérol. Les GUVs éclataient et se désintégraient de manière semblable à ce qui a pu être observé avec des membranes chargées [Riske 09]. La séquence d'images d'un tel évènement est montrée dans la figure 5.4. Afin d'éviter la destruction de la vésicule lors des mesures de tension de bord, nous avons été amenés à utiliser des impulsions de moindre amplitude, environ moitié plus faible que pour les impulsions classiques. Avec ces champs électriques moins élevés, les pores dans les vésicules de DOPC:cholestérol se refermaient de manière habituelle. De tels champs n'ayant pas d'effet visible sur les GUVs qui ne contenaient pas de cholestérol, ceci indique que le cholestérol affecte la stabilité de bicouches de DOPC soumises à des impulsions électriques.

Comme caractéristique de la stabilité de membranes dans des champs électriques, on peut s'intéresser à la différence de potentiel transmembranaire critique $\Delta\psi_c$ au-delà de laquelle on peut observer la poration des vésicules. Nous avons indiqué précédemment, à la sous-section 5.2.3, que $\Delta\psi_c$ pouvait être estimé à l'aide du rayon maximal du pore r_m à partir de l'équation 5.9. Les $\Delta\psi_c$ ainsi mesurés pour les quatre compositions figurent dans la table 5.2. Alors que les membranes sans cholestérol voient des macropores se former pour des potentiels transmembranaires supérieurs à $\Delta\psi_c \approx 0.9$ V, l'addition de 17 mol % de cholestérol à des membranes de DOPC voit $\Delta\psi_c$ diminuer aux alentours de 0.7 V. En d'autres termes, le cholestérol déstabilise bel et bien les membranes de DOPC exposées à des impulsions électriques.

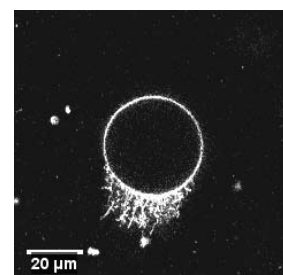
Il a été aussi mentionné à la sous-section 5.2.3 que le potentiel transmembranaire critique pouvait être relié à la tension de lyse σ_{lys} . Si l'on connaît l'épaisseur des bicouches auxquelles on s'intéresse, alors l'utilisation de l'équation 3.4 nous permet de déterminer σ_{lys} en fonction de $\Delta\psi_c$.

Les valeurs de σ_{lys} que nous avons trouvées figurent dans la table 5.2; elles ont été calculées avec les épaisseurs de bicouches données dans la table 5.1, et sans surprise, adoptent les mêmes tendances que les valeurs de $\Delta\psi_c$.

5.4 Discussion

Dans cette partie, nous allons comparer nos résultats pour les tensions de bord à ceux obtenus par d'autres méthodes. Mais avant cela, répétons encore une fois les avantages de notre approche. Tout d'abord, elle est relativement facile à appliquer dans un laboratoire modestement équipé. Les expériences peuvent être réalisées dans une chambre faite maison avec deux électrodes de cuivre, placée sur la platine d'un microscope. Bien que nous ayons utilisé une caméra ultra-rapide pour l'acquisition des images, nous n'avons pas complètement exploité son potentiel. En effet, des caméras plus conventionnelles avec une vitesse d'acquisition d'environ un millier d'images par seconde sont relativement bon marché, et amplement suffisantes pour acquérir un nombre suffisant de données dans la gamme de temps qui nous intéresse, entre 5 et 100 ms. Ensuite, le temps requis pour faire une mesure est inférieur à 5 minutes. Ceci permet d'effectuer un grand nombre d'expériences et ainsi d'obtenir de bonnes statistiques. Notons que dans la littérature, les quelques fois où il est mentionné, le nombre d'expériences n'excède souvent pas une dizaine. Obtenir des statistiques fiables est particulièrement important lors de l'étude de membranes comportant plusieurs types de lipides. Par exemple, Veatch et Keller ont estimé une variation de ± 2 mol % de la quantité de cholestérol dans des vésicules composées de DOPC, sphingomyéline et cholestérol préparées par électroformation [Veatch 03]. Pour cette raison, quand on a affaire à des vésicules de composition complexe, on doit en principe examiner de larges populations de liposomes. L'activité de recherche grandissante avec des membranes de compositions de plus en plus variées nécessite donc le développement de méthodes de mesure qui peuvent être facilement et rapidement appliquées sur un grand nombre de vésicules. Notre méthode remplit ces conditions. Enfin, contrairement à d'autres qui sont aussi faciles à mettre en œuvre [Karatekin 03, Puech 03], notre approche ne nécessite l'utilisation ni de glycérol, ni de sondes membranaires fluorescentes qui, comme nous l'avons signalé auparavant, peuvent tous deux influencer les valeurs des tensions de bord.

Nous avons mesuré les tensions de bord de membranes de diverses compositions et, pour des membranes de DOPC et d'EggPC, nous avons



trouvé des valeurs de 27.7 et 14.2 pN, respectivement. Ce résultat est compréhensible lorsque l'on envisage le caractère de mélange de l'EggPC : une petite fraction des molécules constituant le mélange peut permettre de stabiliser le pore et ainsi d'abaisser l'énergie de bord ; il est donc logique que la tension de bord de bicouches d'EggPC soit plus faible que celle de bicouches de DOPC, constituées d'un seul type de lipides. Notre examen de la littérature a révélé une importante dispersion des valeurs de tension de bord de membranes d'EggPC, allant de 8.6 à 42 pN (cf table 5.2). On peut supposer que ces différences sont dues au fait que de l'EggPC provenant de divers fournisseurs peut avoir une composition variable. Dans le cas de lipides synthétiques comme le DOPC, la présence d'impuretés peut aussi causer des variations significatives de la tension de bord, comme observé dans [Karatekin 03]. En effet, notre résultat se rapproche d'avantage de la plus grande des valeurs rapportée dans [Karatekin 03] et de la valeur mesurée dans [Genco 93], ce qui n'est guère surprenant étant donné que notre DOPC provient du même fournisseur (cf table 5.2). Ce résultat contredit celui obtenu en perforant des bicouches supportées avec une pointe de microscope à force atomique [Loi 02]. Cette dernière méthode semble sous-estimer systématiquement les tensions de bord ; voir la table 5.2 et les valeurs pour DOPC obtenues dans [Chiantia 06] et celles pour POPC obtenues dans [García-Sáez 07]. Nous pouvons simplement spéculer que la présence du substrat supportant la bicouche doit influencer la stabilité du pore et donc la tension de bord. Cette méthode reste cependant applicable pour examiner les variations relatives de tension de bord résultant de la présence de peptides [García-Sáez 07] ou de différents types lipidiques [Chiantia 06].

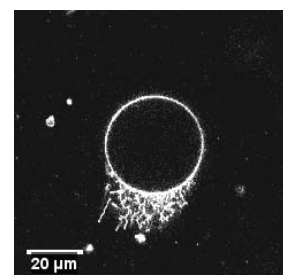
L'inclusion de cholestérol dans des GUVs de DOPC (5:1 mol:mol ou ~ 17 mol %) a conduit à deux observations intéressantes : une déstabilisation des membranes face aux impulsions électriques et une augmentation de leur tension de bord. Discutons tout d'abord la première de ces observations.

Des impulsions électriques de durée 5 ms induisant des différences de potentiel transmembranaire de l'ordre de 1.25 V causaient la rupture des GUVs contenant du cholestérol, comme il est illustré dans la figure 5.4. Pour pouvoir observer la fermeture du pore créé par l'impulsion, nous devions abaisser l'amplitude du champ de manière à imposer des potentiels transmembranaires de seulement 0.8 V, potentiels qui ne semblaient pas avoir beaucoup d'effet sur les vésicules d'autres compositions. Comme indiqué dans la table 5.2, le potentiel critique requis pour créer un pore dans la membrane est abaissé en présence de cholestérol. Ce résultat est intéressant et quelque peu inattendu si l'on se souvient de l'effet inverse observé

avec des membranes de SOPC [Needham 89, Zhelev 93], voir table 5.2. En revanche, des vésicules de DPPC contenant entre 12 et 20 % de cholestérol semblent pouvoir être perméabilisées pour des différences de potentiel transmembranaire plus faibles que pour les vésicules pures de DPPC [Raffy 99]. En outre, l'addition de cholestérol ne semblait pas modifier le seuil de perméabilisation de membranes planes [Genco 93] ou de vésicules [Raffy 99] d'EggPC. En résumé le cholestérol, qui altère notamment le cœur hydrophobe des bicouches lipidiques, semble affecter la stabilité des membranes de manière différente selon l'architecture moléculaire des lipides auxquels il est ajouté.

Des études récentes suggèrent que l'effet du cholestérol sur la rigidité de courbure de bicouches lipidiques dépend spécifiquement du type de lipide considéré et du degré d'insaturation des chaînes hydrocarbonées [Pan 08a, Pan 08b, Gracia 10]. Auparavant, le consensus, fondé sur des observations de SOPC [Evans 90, Song 93], de DMPC [Duwe 90, Meleard 97] ou de POPC [Henriksen 06], était que le cholestérol devait inexorablement provoquer une augmentation de la rigidité de courbure en raison de l'ordonnement qu'il induisait dans la partie hydrophobe de membranes en phase fluide. Cependant, il a été signalé récemment [Pan 08b, Gracia 10] que la rigidité de courbure de mixtures de DOPC:cholestérol ne montre pas de corrélation significative avec le contenu en cholestérol, et qu'elle peut même décroître dans le cas de mélanges sphingomyéline:cholestérol [Gracia 10]. L'origine de l'abaissement de la différence de potentiel critique de poration de membranes de DOPC par inclusion de cholestérol peut être vue dans son effet de diminution de la conductivité membranaire, justifié en détail dans [Raffy 99]. Ce comportement peut être lié à l'ordonnement des lipides. Nos résultats suggèrent que l'influence du cholestérol sur les propriétés mécaniques des membranes lipidiques dépend spécifiquement du type de lipide considéré et est loin d'être complètement comprise. D'avantage d'études, avec d'autres sortes de lipides et d'autres quantités de cholestérol doivent encore être mises en œuvre. Notre travail souligne le fait que le seuil critique de poration est une propriété membranaire fortement dépendante de la composition lipidique, et peut être utilisé afin de caractériser la stabilité des bicouches.

Bien que les membranes de DOPC semblent fortement perturbées par l'ajout de cholestérol, comme en attestent la décroissance du seuil de poration et de la tension de lyse, nous avons établi que la tension de bord augmentait de manière drastique, de 27.7 à 36.4 pN. Ceci est en accord avec la tendance évoquée dans [Karatekin 03], où la dépendance de la tension de bord γ à la fraction molaire de cholestérol x a été mesurée suivre la relation empirique $\gamma = \gamma_0 + 26.7x$, γ_0 désignant la tension de bord d'une



membrane de DOPC sans cholestérol. Cette expression prédit des tensions de bord légèrement plus faibles que celles mesurées ici et dans [Zhelev 93], voir table 5.2 pour les valeurs précises. Cet effet d'augmentation de γ par ajout de cholestérol était attendu, étant donnée la forme de cône inversé de la molécule de cholestérol qui est supposée pénaliser le réarrangement des lipides le long du bord du pore.

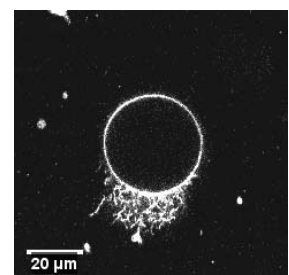
En résumé, la stabilité des pores dans des membranes de DOPC est diminuée par la présence de cholestérol. La plus grande valeur de la tension de bord γ provoque une fermeture des pores plus rapide. En outre, l'inclusion de cholestérol réduit la tension de lyse de membranes de DOPC en induisant des changements structurels dans la bicouche. Ceci est corroboré par notre observation que des impulsions d'amplitude plus faible, sans effet sur les GUVs ne contenant pas de cholestérol, pouvaient créer la formation de macropores sur les liposomes de DOPC:cholestérol.

Nous avons aussi étudié l'effet sur les tensions de bord de l'inclusion d'un autre lipide, du DOPE, dans des GUVs de DOPC à la fraction molaire 5:1. Nous avons trouvé une diminution significative de γ de 27.7 à 15.6 pN, tout comme lors de l'addition de surfactants [Karatekin 03, Puech 03]; voir les valeurs de γ pour des mélanges de DOPC et du détergent Tween 20. De manière intéressante, des valeurs similaires ont été obtenues avec des membranes d'EggPE et des extraits de PE d'*Escherichia coli* [Chernomordik 85, Melikyan 90]. Dans le cadre de la théorie d'élasticité des membranes et compte tenu de la forme de cône inversé de la molécule de DOPE, on s'attendrait plutôt à une augmentation de la tension de bord, tout comme lors de l'addition de cholestérol. Nos résultats contredisent cette intuition. L'architecture moléculaire des lipides PE qui leur confère leur tendance à former une phase hexagonale inversée et qui facilite la fusion et la fuite de vésicules [Ellens 86], est vraisemblablement responsable de leur habilité à stabiliser les pores et à abaisser la tension de bord. Une éventuelle cause de ce comportement pourrait être leur propension à former des liaisons hydrogène inter-lipides [Lewis 93, Pink 98], cette caractéristique n'étant pas observée dans des bicouches de PC. Il serait intéressant de tester cette hypothèse, par exemple à l'aide de simulations de dynamique moléculaire.

5.5 Figures et tables du chapitre 5

Lipide	EggPC	DOPC	DOPC:cholestérol	SOPC
a , nm	3.69	3.67	3.90 [†]	3.91
a_e , nm	2.70	2.68	2.91	2.92

TABLE 5.1: Valeurs de l'épaisseur totale a et de l'épaisseur diélectrique a_e de membranes de diverses compositions. [†] Cette valeur de a est approximative car elle correspond en réalité à une fraction molaire 4:1 du mélange DOPC:cholestérol.



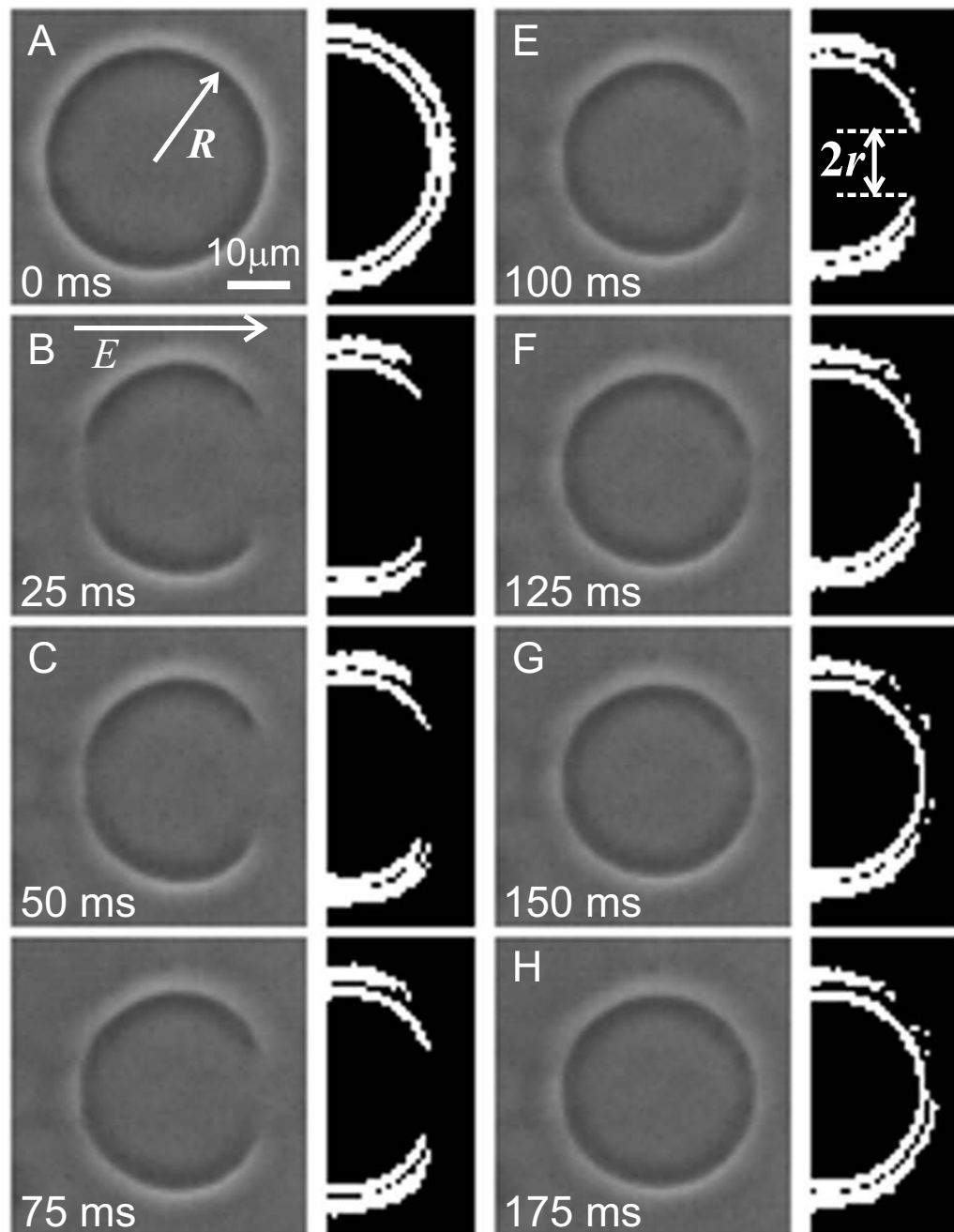


FIGURE 5.1: Séquence des images brutes (colonnes 1 et 3) et traitées (colonnes 2 et 4) d'une vésicule d'EggPC de rayon $R = 17 \mu\text{m}$ soumise à un champ électrique de durée 5 ms et d'amplitude 50 kV/m. Le temps $t = 0$ (A) correspond au début de l'impulsion. Le rayon du pore r , indiqué en (E), décroît (B-F), et après 150 ms le pore est entièrement refermé (G, H). On peut voir en (B) que la vésicule est aussi perméabilisée face à l'anode.

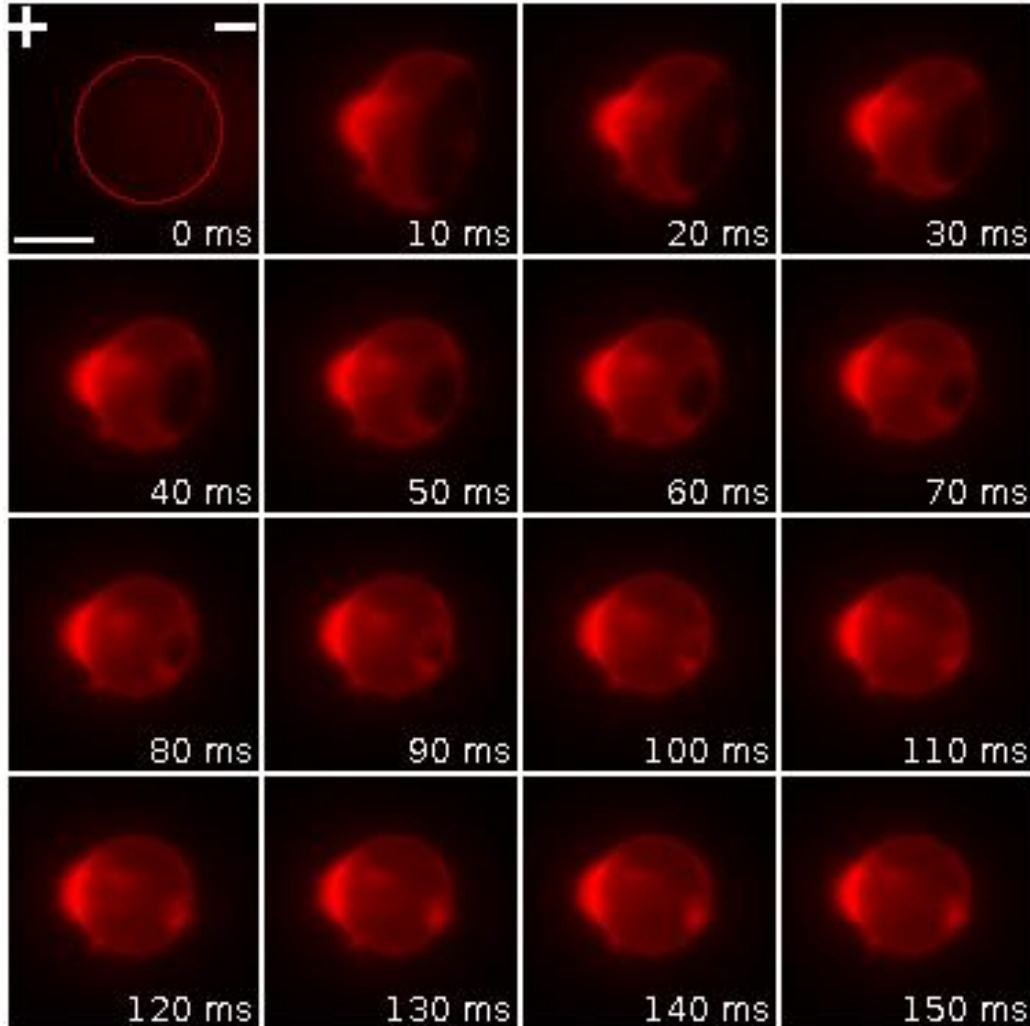
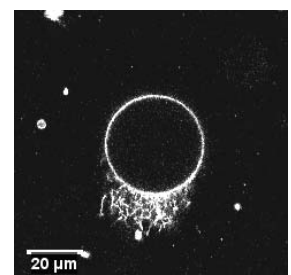


FIGURE 5.2: Séquence d'une vésicule d'EggPC de rayon $R = 14 \mu\text{m}$ marquée à la Rhodamine PE et soumise à une impulsion électrique de durée 5 ms et d'amplitude 52 kV/m, acquise avec une caméra EMCCD. On voit clairement qu'un macropore (et non plusieurs petits pores) est formé côté cathode de la vésicule. Dans cette expérience, le pore n'était pas situé précisément dans le plan équatorial; cette observation était plutôt rare, mais permet de mieux voir le macropore et sa forme circulaire. Une barre d'échelle de $15 \mu\text{m}$ figure en bas à gauche de la première image. La position des électrodes est indiquée en haut de la première image.



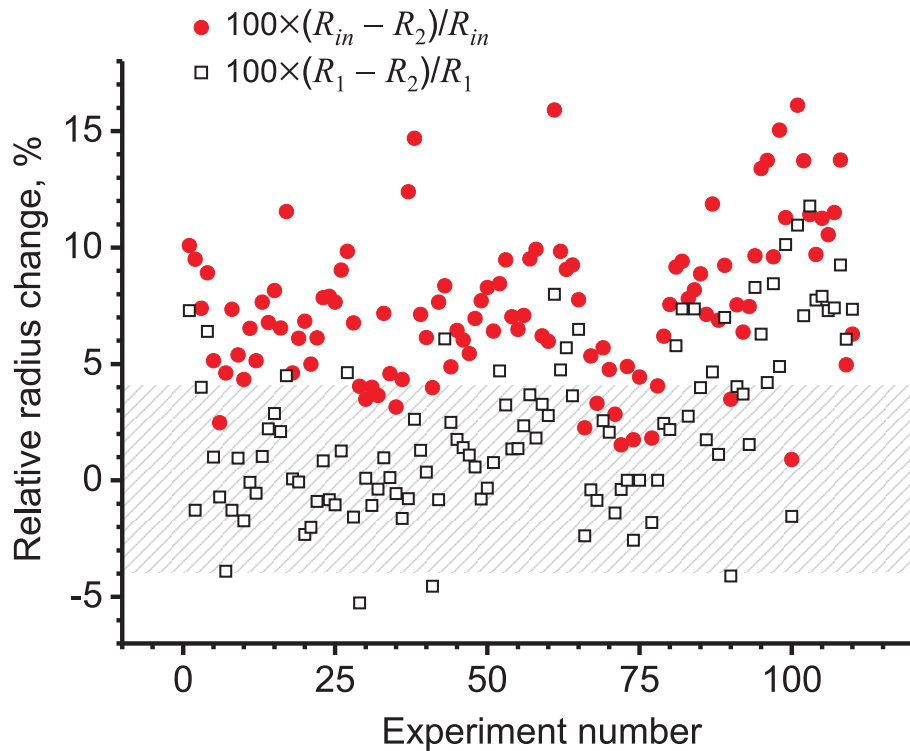


FIGURE 5.3: Variation relative des rayons des vésicules étudiées. Les disques rouges représentent le changement de rayon en pourcentage au cours de toute l'expérience, et les carrés le changement au cours du régime (iii) de fermeture lente uniquement. L'aire grisée indique l'erreur typique de mesure à cause de la résolution optique, pour une vésicule de rayon $20 \mu\text{m}$. Les 41 premiers points correspondent aux GUVs d'EggPC, les 24 suivants à ceux de DOPC, les 14 suivants à ceux de DOPC:cholestérol (5:1), et les 31 derniers à ceux de DOPC:DOPE (5:1). On peut voir que la majeure partie de la décroissance de taille a lieu avant le régime (iii) utilisé pour mesurer les tensions de bord.

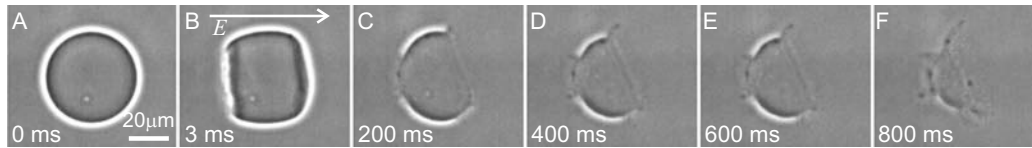


FIGURE 5.4: Séquence montrant l'éclatement d'une vésicule de DOPC:cholestérol 5:1 soumise à une impulsion de durée 5 ms et d'amplitude 50 kV/m.

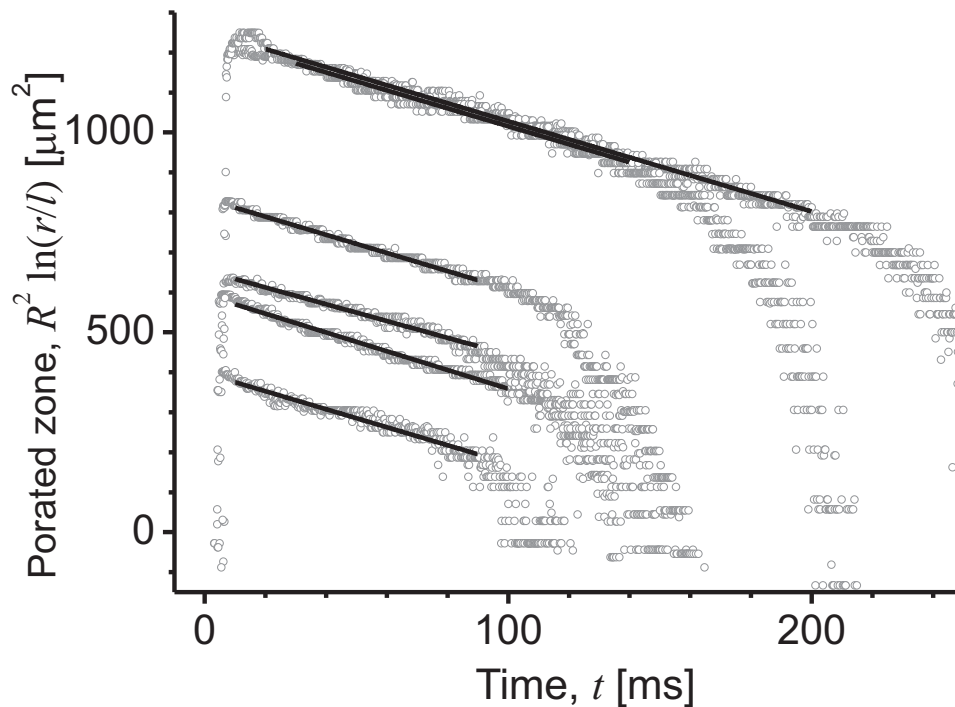
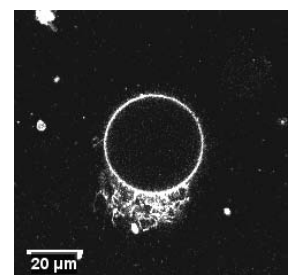


FIGURE 5.5: Évolution de la région du pore caractérisée par $R^2 \ln(r/l)$, en fonction du temps t pour 6 vésicules d'EggPC. Afin d'éviter d'afficher une valeur avec dimension dans le logarithme, nous avons introduit le paramètre $l = 1\mu\text{m}$, qui ne modifie en rien la pente des courbes. Les cercles gris représentent les données expérimentales, et les lignes pleines les ajustements linéaires dont les pentes donnent la tension de bord γ .



Composition membranaire	Tension de bord γ , en pN	Méthode	Seuil d'électroporation $\Delta\psi_c$, en mV	Tension de lyse σ_{lyse} , en mN/m	Référence
EggPC	14.2 ± 0.7 [41]	Dynamique de fermeture des pores et électroporation	920 ± 20	3.79	Ce travail [Harbich 79]
EggPC	20	Observation de vésicules cylindriques ouvertes			[Chernomordik 85]
EggPC	8.6 ± 0.4	Electroporation de films noirs			[Fromherz 86]
EggPC	42	Observation de la transition disque-vésicule			[Melikyan 90]
EggPC	8.6 ± 0.4	Électroporation de films noirs			[Melikyan 90]
EggPC	21	Electroporation de films noirs			[Genco 93]
DOPC	27.7 ± 2.5 [24]	Dynamique de fermeture des pores et électroporation	950 ± 30	4.08	Ce travail [Genco 93]
DOPC	25	Électroporation de films noirs			[Karatekin 03]
DOPC d'Avanti	20.7 ± 3.5	Dynamique de fermeture des pores et illumination intense			[Karatekin 03]
DOPC de Sigma	6.9 ± 0.42	Dynamique de fermeture des pores et illumination intense			[Karatekin 03]
DOPC	13-18	Dynamique de fermeture des pores et illumination intense			[Puech 03]
DOPC	3.9 ± 0.3	Microscopie à force atomique			[Chantia 06]
DOPC:cholestérol 5:1 (mol)	36.4 ± 1.9 [14]	Dynamique de fermeture des pores et électroporation	680 ± 20	1.89	Ce travail [Karatekin 03]
mixtures DOPC:cholestérol	9-22	Dynamique de fermeture des pores et illumination intense			[Zhelev 93, Needham 89]
SOPC	9.2 ± 0.7	Micro-aspiration et électroporation	1100	4.91	[Zhelev 93, Needham 89]
SOPC:cholestérol 1:1 (mol)	30.5 ± 1.2	Micro-aspiration et électroporation	1800		[Moroz 97]
SOPC:cholestérol 1:1 (mol)	26	Réinterprétation des résultats de [Zhelev 93]			
DOPC:DOPE 5:1 (mol)	15.6 ± 1.3 [31]	Dynamique de fermeture des pores et électroporation	880 ± 40		Ce travail [Melikyan 90]
EggPE	15 ± 1	Électroporation de films noirs			[Chernomordik 85]
Escherichia coli PE	16 ± 0.6	Electroporation de films noirs			[Karatekin 03, Puech 03]
mixtures DOPC:Tween 20	0.2-12	Dynamique de fermeture des pores et illumination intense			

TABLE 5.2: Tensions de bord pour différentes compositions membranaires, mesurées dans ce travail et par d'autres groupes. Les erreurs standard sont données, sauf si non précisées dans la référence originale. Les nombres entre crochets indiquent le nombre d'expériences réalisées pour chaque composition. Des valeurs pour le seuil d'électroporation et la tension de lyse sont aussi fournies.

Chapitre 6

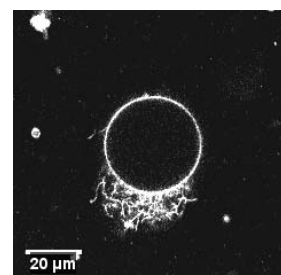
Étude de l'électrotransfert d'ADN dans des GUVs

Contexte

Nous avons vu au chapitre 1 que l'électrotransfert d'ADN plasmidique dans des cellules vivantes s'accompagne d'une étape d'interaction de l'ADN avec de la membrane. Cette interaction, caractérisée par la formation de spots discrets d'ADN dans le voisinage de la membrane faisant face à la cathode, est intimement corrélée à l'efficacité de la transfection. À ce jour, on ne sait toujours pas quelle est la nature précise de cette interaction. Est-elle causée par les propriétés diélectriques de la membrane liées aux lipides ? Par certains types de protéines ? Par des domaines lipidiques particuliers ?

Lors de sa thèse, Émilie Phez s'était penchée sur cette question, notamment en essayant d'électroperméabiliser des GUVs d'EggPC en présence d'ADN marqué avec la sonde fluorescente TOTO-1 [Phez 05]. Ses expériences en microscopie à fluorescence à champ large semblaient indiquer que l'ADN pouvait rentrer librement dans les liposomes, sans interagir avec la membrane. Néanmoins, ses observations n'étaient pas accompagnées d'une analyse fine des données.

J'ai donc décidé de reprendre ce type d'expériences, mais en microscopie confocale. Avec cette technique les intensités de fluorescence mesurées étaient directement proportionnelles aux concentrations locales d'ADN. Ceci a permis d'étudier de manière quantitative l'effet du nombre, de la durée et de l'amplitude des impulsions. Ainsi nous avons pu confronter les résultats expérimentaux à un modèle simple, établir que l'entrée d'ADN, sous forme libre sans interaction avec la membrane, était majoritairement due



aux forces électrophorétiques, et nous avons par conséquent été capables de décrire un protocole permettant le chargement de vésicules géantes avec de l'ADN plasmidique. Ces travaux ont donné lieu à un manuscrit qui est actuellement en train d'être finalisé et qui figure en annexe F.

6.1 Introduction

Comme il a été souligné dans [Golzio 02], les mécanismes de transfert de molécules par électroperméabilisation dépendent fortement de la taille des composés en jeu. Alors que les petites molécules semblent en mesure de traverser librement les membranes électroperméabilisées, les macromolécules subissent une étape d'interaction au niveau de la membrane plasmique nécessaire au succès de la transfection.

Dans ce chapitre je décris les expériences d'électrotransfert d'ADN plasmidique réalisées sur des GUVs d'EggPC. Notre étude reposant sur la quantification des concentrations d'ADN par fluorescence, la composition simple (des sucres et de l'eau) des milieux interne et externe aux vésicules est ici cruciale. En effet, les solutions à l'intérieur et à l'extérieur du liposome étant similaires, l'utilisation de microscopie confocale assure que les intensités de fluorescence mesurées sur les images sont directement proportionnelles aux concentrations locales d'ADN. On ne pourrait pas affirmer la même chose pour des milieux de composition radicalement différentes, tels qu'une solution classique d'électroperméabilisation et le cytoplasme d'une cellule par exemple. La nature quantitative de nos observations fait que nous sommes en mesure de confronter nos résultats à un modèle théorique, et de proposer une interprétation physique pour l'électrotransfert d'ADN dans des GUVs.

À notre connaissance, l'électrotransfert d'ADN dans des liposomes fut étudié pour la première fois par Chernomordik *et al.* [Chernomordik 90]. Les auteurs ont trouvé que des grosses molécules d'ADN pouvaient pénétrer dans des LUVs de DPPC:cholestérol (7:3, mol:mol) *via* des sortes de vésicules d'endocytose protégeant les molécules d'ADN du milieu interne. Leur proposition d'un tel mécanisme d'internalisation était basée sur leur observation de la fluorescence caractéristique des complexes ADN/bromure d'éthidium (BE) *après* sonication de LUVs chargés de BE et électropulsés en présence d'ADN. Cependant, ils ne pouvaient pas observer directement les liposomes en raison de leur petite taille. Les conclusions de [Chernomordik 90] ont ensuite été remises en question par Lurquin et Athanasiou [Lurquin 00], qui observèrent que de grandes vésicules ($\sim 10 \mu\text{m}$) de DPPC chargées de BE et électropulsées en présence d'ADN exhibaient

bel et bien la fluorescence des complexes d'ADN/BE *avant* (ou même sans) sonication. Ces résultats parlent plutôt en faveur d'une entrée directe de l'ADN dans les liposomes, et contredisent ceux de [Chernomordik 90].

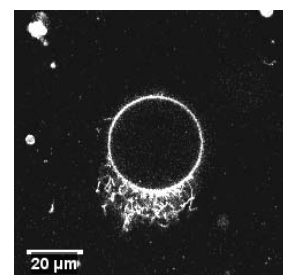
6.2 Protocole

Les GUVs étudiés étaient formés d'EggPC, marqués à la Rhodamine PE, et fabriqués comme décrit en annexe A. Des observations qualitativement similaires à celles décrites plus bas ont été aussi obtenues avec des vésicules de DOPC, mais l'analyse détaillée de la quantité d'ADN transféré a été réalisée avec les GUVs d'EggPC. Les solutions interne et externe étaient les habituelles solution aqueuses de saccharose et de glucose. Le plasmide utilisé était une macromolécule de 4700 paires de bases marquée au TOTO-1, cf annexe A. C'est le même plasmide typiquement employé lors des études d'électrotransfection sur cellules vivantes et qui est observé interagir avec la membrane après application des impulsions électriques [Golzio 02]. Il était ajouté au milieu de pulsation en quantité analogue à ce qui est utilisé sur cellules, à une concentration massique de 1 μg pour 100 μL .

Une séquence de 10, 20 ou 40 impulsions de durée 0.5, 1 ou 5 ms et d'amplitude de l'ordre de 10–100 kV/m, induisant des différences de potentiel transmembranaire entre 0.5 et 2 V était appliquée aux GUVs en présence d'ADN dans les chambres de pulsation classiques, sous le microscope confocal. La fréquence des impulsions était de 0.33 Hz, de manière à avoir le temps de prendre une image sur le canal rouge (vésicule) et une image sur le canal vert (ADN) entre deux impulsions consécutives. Les images étaient ensuite analysées de manière automatique avec une routine maison décrite en annexe B.2, en prenant soin de soustraire le niveau de base du canal vert mesuré à l'intérieur de la vésicule avant le début des impulsions correspondant à une quantité nulle d'ADN.

6.3 Résultats

Nous avons réalisé des expériences d'électrotransfert d'ADN sur 21 liposomes d'EggPC, en appliquant 10, 20 ou 40 impulsions à 0.33 Hz, de durée 0.5, 1 ou 5 ms. Ces durées correspondent typiquement à celles utilisées dans les protocoles d'électrotransfert d'ADN dans les cellules en culture et les organes ou tissus *in vivo* par électroporéabilisation [Rols 98]. Nous avons vite observé que la plus longue durée d'impulsion $\tau = 5$ ms per-



mettait de maximiser la quantité d'ADN transféré, et avons donc réalisé la majeure partie des expériences avec cette valeur. Selon la taille initiale de la vésicule étudiée, l'amplitude E_0 des impulsions variait entre 10 et 100 kV/m, de manière à induire des différences de potentiel transmembranaire de l'ordre de 0.5–2 V (estimées avec l'équation 3.3).

Dans certains cas nous sommes arrivés à conserver plusieurs vésicules au-dessus de l'objectif, et avons donc pu recueillir des données pour plusieurs liposomes en une seule expérience. Typiquement, l'amplitude du champ était réglée sur le plus gros liposome visible. Comme nous l'avons vu au chapitre 4 dans le cas de GUVs de DOPC, les vésicules d'EggPC suffisamment grandes rétrécissaient, leur diminution de taille étant associée à la formation de tubules et à l'éjection de petites vésicules. Les liposomes les plus petits n'étaient pas perméabilisés, et la présence d'ADN en leur sein n'était pas détectée. Pour les liposomes de tailles intermédiaires, l'aire perméabilisée était plus petite que pour le GUV d'intérêt sur lequel la magnitude du champ était réglée. Par conséquent, la quantité d'ADN transféré dans ces vésicules était relativement faible. Nous avons néanmoins conservé ces vésicules pour la phase d'analyse des données, et elles ont permis d'obtenir des résultats d'incrément de concentration cohérents.

Comme on peut le voir sur les figures 6.1 et 6.2, il était possible de détecter l'ADN entrant dans les GUVs. Sur ces figures, on peut voir clairement les tubules décrits au chapitre 4. On constate que ces structures étaient là encore créées sur l'hémisphère faisant face à l'anode, puis restaient attachées à la vésicule et stables pour quelques minutes. Les zones plus sombres au-dessus de la vésicule, face à la cathode, pourraient être dues à une déplétion locale en ADN causée par le flot de la solution de saccharose s'échappant de la vésicule, ou aussi par l'entrée dans le liposome de l'ADN précédemment présent à cet endroit.

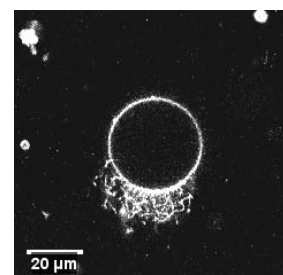
Nous confirmons l'observation de Lurquin et Athanasiou [Lurquin 00] : l'entrée d'ADN sous forme libre par des pores créés par le champ électrique. En effet, si une entrée *via* des vésicules d'endocytose était le mécanisme prépondérant, nous aurions vu de tels événements dans nos expériences, ce qui ne fut pas le cas. Nos images supportent clairement le passage de l'ADN par des pores. Mentionnons tout de même que nous avons vu à quelques reprises de tels événements d'endocytose. Toutefois, ces phénomènes étaient très rares et avaient toujours lieu après application du train d'impulsions. Une explication détaillée de ce procédé inhabituel d'entrée dépasse le cadre de ce travail, mais nous tenons quand même à souligner qu'un scénario fondé sur des mécanismes similaires à ceux décrits dans [Angelova 99] ne serait pas satisfaisant, car dans l'étude citée les auteurs

n'ont pas reporté d'entrée d'ADN dans des GUVs constitués de lipides zwitterioniques.

Ces observations qualitatives ont été aussi faites lors d'expériences préliminaires avec des vésicules de DOPC, même si l'analyse quantitative présentée par la suite est basée sur des GUVs d'EggPC uniquement.

Des exemples typiques des données de fluorescence relative d'ADN à l'intérieur des GUVs sont montrés dans la figure 6.3. Ces données pour I/I_0 , obtenues comme décrit en annexe B.2, sont les rapports entre les fluorescences moyennes à l'intérieur et à l'extérieur du GUV, et sont équivalentes au rapport des concentrations c/c_0 , c désignant la concentration d'ADN dans la vésicule et c_0 celle à l'extérieur. Un rapport I/I_0 égal à 1 signifie donc que la concentration d'ADN dans le GUV égale celle à l'extérieur. L'amplitude E_0 des impulsions, leur durée τ , leur nombre N , le rayon initial de la vésicule R_0 et la différence de potentiel transmembranaire initiale $\Delta\psi_0$ sont donnés dans chaque sous-graphe. Pour chaque expérience, on peut constater une augmentation de la quantité d'ADN dans la vésicule suivie d'une stabilisation après la fin de la séquence d'impulsions. Ceci montre clairement que l'ADN peut pénétrer dans les vésicules et y rester de manière stable, sans fuites significatives. Il faut bien remarquer sur la figure 6.3 les différentes échelles sur les axes horizontaux et verticaux : les concentrations finales d'ADN sont bien plus élevées dans les sous-graphes du bas, avec les impulsions les plus longues de 5 ms.

Plusieurs expériences de contrôle ont été mises en œuvre. Nous avons tout d'abord vérifié que l'intensité de fluorescence moyenne à l'intérieur des liposomes ne changeait pas si nous n'appliquons pas d'impulsions. Cette vérification fut faite sur de longues échelles de temps (plusieurs minutes). Comme deuxième contrôle nous avons appliqué une série de 10 impulsions et vérifié que la fluorescence moyenne dans la vésicule, après avoir augmenté, restait stable jusqu'à l'application d'une nouvelle séquence d'impulsions. Ceci est important car c'est la preuve que l'entrée d'ADN est directement provoquée par le champ électrique. Ceci élimine la possibilité que la vésicule reste perméable à l'ADN en l'absence d'impulsions, et souligne l'importance de la force électrophorétique sur l'ADN, autant que l'effet perméabilisant du champ sur la membrane. Nous avons aussi effectué des expériences uniquement avec le marqueur TOTO-1, sans ADN, afin de vérifier que ce n'était pas la fluorescence de la sonde seule que nous observions, mais bien celle de la sonde liée au plasmide. Le rendement quantique du TOTO-1 augmente énormément quand il est associé à l'ADN, donc les images acquises avec les mêmes paramètres du microscope et avec du TOTO-1 seul devraient être beaucoup moins lumineuses. C'est bien le cas, le signal du TOTO-1 seul étant en fait trop faible pour être



détecté, ce qui apporte la preuve que c'est bien la fluorescence du TOTO-1 lié à l'ADN que nous voyons sur les images des figures 6.1 et 6.2, et que nous traçons à la figure 6.3.

De manière intéressante nous avons établi que parfois, la concentration d'ADN finale dans les GUVs pouvait excéder la concentration à l'extérieur ($c/c_0 = I/I_0 > 1$). On peut voir ce phénomène sur la figure 6.3, sur le sous-graphe en bas à droite. C'est assez surprenant, et cela signifie que l'ADN mu par le champ électrique, entrant dans la vésicule par le pôle faisant face à la cathode, n'est pas en mesure de ressortir de la vésicule au niveau de l'autre pôle. En effet, si les structures de perméabilisation présentes dans la membrane étaient les mêmes sur chaque hémisphère du liposome, le rapport de concentrations maximal envisageable serait $c/c_0 = 1$. Ce n'est pas le cas dans nos expériences. Cette observation, avec celle de la formation asymétrique de tubules, met l'accent sur la différente réorganisation de la membrane et sur la brisure de symétrie ayant lieu entre les deux hémisphères. Cette possibilité de dépasser dans la vésicule la concentration externe d'ADN implique que la force électrophorétique surpasse la force osmotique due à la différence de concentrations entre l'intérieur et l'extérieur du GUV. Ceci sera discuté plus en détail à la section 6.4.

Dans ces expériences, nous étions aussi capables de mesurer la décroissance de taille des vésicules. En appliquant la méthode décrite au chapitre 4, nous avons pu extraire la fraction d'aire perméabilisée perdue par impulsion \hat{n} et la différence de potentiel critique $\Delta\psi_c$ requise pour assister à une diminution de taille des GUVs. Pour les impulsions de durée 5 ms, nous trouvons en faisant la moyenne sur les différentes expériences : $\hat{n} \approx 0.32$ et $\Delta\psi_c \approx 0.50$ V. La valeur de \hat{n} est en accord avec la valeur de 0.31 rapportée pour le même type de lipide, de l'EggPC [Portet 09]. Cependant, cette valeur de $\Delta\psi_c$ de 0.50 V est beaucoup plus petite que la valeur 0.89 V obtenue pour des vésicules électropulsées en l'absence d'ADN. Ceci suggère que la présence d'ADN hors de, ou même dans la vésicule (après quelques impulsions perméabilisantes) tend à déstabiliser la membrane et la rend plus facile à perméabiliser. La tension de lyse associée, déterminée à partir de la valeur de $\Delta\psi_c$ comme décrit au chapitre 5, sous-section 5.2.3, vaut $\sigma_{lys} \approx 1.12$ mN/m.

6.4 Considérations théoriques sur les incréments de concentration relative d'ADN

L'interprétation théorique de nos résultats n'est pas chose aisée, étant donné que nous n'avons pas un accès explicite à la manière dont les vésicules sont perméabilisées (nombre et taille des structures de perméabilisation pendant l'impulsion par exemple). Néanmoins, nous allons montrer dans cette section que les 360 incréments de concentration relative d'ADN que nous mesurons sont conformes à un modèle simple postulant que l'entrée d'ADN est majoritairement causée par la force électrophorétique.

Notons $\delta x = \delta c/c_0$ l'incrément de concentration relative dans une vésicule de rayon R causé par une impulsion d'amplitude E_0 et de durée τ . L'incrément de concentration dans la vésicule, par impulsion, est noté δc et la concentration à l'extérieur, supposée constante, c_0 .

La concentration d'ADN c est gouvernée par une équation d'électrodiffusion

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -\nabla \cdot \mathbf{j}, \quad (6.1)$$

où \mathbf{j} est le courant thermodynamique $\mathbf{j} = -D\nabla c + \mu c \mathbf{E}$. Le premier terme est un terme diffusif qui dépend du coefficient de diffusion de la molécule D . Le second terme est un terme électrophorétique qui dépend du champ électrique local \mathbf{E} et de la mobilité électrophorétique de la molécule μ^1 . L'incrément de concentration d'ADN $\delta c(t)$ dans un objet \mathcal{V} de volume V pendant un temps t est donné par

$$\delta c(t) = \int_0^t \left(\frac{1}{V} \int_{\mathcal{V}} \frac{\partial c}{\partial t} d\mathbf{x} \right) dt, \quad (6.2)$$

qui peut être réécrit en utilisant le théorème de Gauss :

$$\delta c(t) = \int_0^t \left(\frac{1}{V} \int_{\mathcal{S}} -\mathbf{j} \cdot d\mathbf{S} \right) dt. \quad (6.3)$$

L'incrément de concentration $\delta c(t)$ est simplement lié à l'intégrale temporelle du flux du courant thermodynamique \mathbf{j} à travers la surface perméabilisée \mathcal{S} . Considérons maintenant un objet sphérique de volume fixé V et calculons l'incrément de concentration élémentaire entre le début d'une impulsion et le début de la suivante. L'utilisation d'un volume constant est une approximation raisonnable car dans nos expériences la variation moyenne de volume est petite comparée au volume initial de la vésicule. Nous allons aussi effectuer les suppositions suivantes :

1. La vitesse stationnaire \mathbf{v} de la molécule dans un champ électrique \mathbf{E} est donnée par $\mathbf{v} = \mu \mathbf{E}$.

- le procédé de transport dominant est de nature électrophorétique et non diffusif ;
- au cours de l'impulsion un pore circulaire conducteur de rayon a (ou de manière équivalente une calotte sphérique d'angle ϑ) est présent dans la membrane face à la cathode.

On peut facilement estimer l'importance relative des termes électrophorétique et diffusif en comparant la composante diffusif ou osmotique du courant thermodynamique par concentration $\mathbf{r}_{os} = \mathbf{j}_{os}/c = -D\nabla \ln(c)$ et la composante électrophorétique $\mathbf{r}_{ep} = \mathbf{j}_{ep}/c = \mu\mathbf{E}$. Nous utilisons les valeurs suivantes pour de l'ADN de poids moléculaire similaire ($\sim 3 \times 10^6$ Da pour le plasmide utilisé dans nos expériences) : $\mu = -3.75 \times 10^{-8} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ [Stellwagen 97] et $D = 10^{-12} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ [Lukacs 00]. En utilisant les estimations $|\mathbf{r}_{os}| \sim D|\ln(c/c_0)|/R$ (où c est la concentration d'ADN moyenne dans le liposome) et $|\mathbf{r}_{ep}| \sim |\mu|E_0$, on obtient

$$\frac{|\mathbf{r}_{os}|}{|\mathbf{r}_{ep}|} \sim \frac{D|\ln(c/c_0)|}{|\mu|E_0R} \sim 10^{-4} \ln\left(\frac{c}{c_0}\right) \quad (6.4)$$

pour les plus faibles intensités des impulsions appliquées. On voit bien que l'effet de la diffusion est négligeable, sauf peut-être au moment de la première impulsion quand $c \sim 0$.

La deuxième hypothèse signifie que l'aire moyenne de la surface perméabilisée, au cours de l'impulsion, est celle d'un disque de rayon a . Ceci est une simplification radicale, pour plusieurs raisons. Tout d'abord, la surface perméable aux ions (*i.e.* la surface conductrice) peut éventuellement être plus grande que celle perméable à l'ADN. Ensuite, nous ne pouvons pas être certains que pendant l'impulsion il n'y a qu'un seul macropore dans la bicouche, plutôt que plusieurs petits pores ou qu'une autre sorte de défauts. Ce n'est d'ailleurs probablement pas le cas : rappelons que les macropores observés en microscopie rapide décrits au chapitre 5 ne pouvaient être détectés qu'*après* la fin de l'impulsion. Cette surface perméabilisée doit donc plutôt être interprétée comme une surface perméabilisée *effective* au cours de l'impulsion plutôt que comme un disque de rayon a au sens strict. Nous nous attendons tout de même à ce que pour une aire fixée, le flux du champ électrique à travers la surface perméabilisée soit du même ordre de grandeur pour un simple disque ou pour une réunion de surfaces plus complexe.

Pour une impulsion de durée τ l'incrément de concentration est donc donné par

$$\delta c = \frac{|\mu|c_0\tau}{V} \int_{S_p} \mathbf{E} \cdot d\mathbf{S} . \quad (6.5)$$

On peut voir que l'incrément de concentration élémentaire δc est simplement proportionnel au flux ϕ du champ électrique local à travers la surface perméabilisée S_p , le pore de rayon a . En terme d'incrément de concentration relative $\delta x = \delta c/c_0$, qui représente exactement la différence entre deux points consécutifs de nos données expérimentales pour I/I_0 , ceci s'écrit

$$\delta x = \frac{3|\mu|\tau}{4\pi R^3} \phi . \quad (6.6)$$

Afin d'être capables d'estimer δx , nous devons tout d'abord évaluer la valeur de ϕ . Rappelons-nous que nous avons supposé que la surface perméabilisée prenait la forme d'une calotte sphérique d'angle ϑ faisant face à l'anode et pouvant être traversée à la fois par les ions et l'ADN. Malgré cette simplification il n'existe pas de solution analytique à l'équation de Laplace pour cette géométrie qui nous permettrait d'obtenir ϕ exactement. On peut toutefois écrire, en se basant sur des arguments dimensionnels dans la limite d'une épaisseur de membrane nulle,

$$\phi = E_0 R^2 f(a/R) , \quad (6.7)$$

où a désigne le rayon du pore tel que $a = R \sin(\vartheta)$, et f une fonction inconnue du rapport a/R , ou en d'autres termes une fonction de l'angle ϑ de la surface perméabilisée. Afin de vérifier cette formule, nous avons calculé ϕ pour différentes amplitudes de champ E_0 , différents rayons de vésicule R et différents angles de perméabilisation ϑ en résolvant numériquement l'équation de Laplace dans cette géométrie à l'aide du logiciel de calcul aux éléments finis Comsol (voir annexe B.3). Les résultats de ces calculs sont présentés dans la figure 6.4 où l'on peut voir que toutes les valeurs normalisées du flux, $\phi/(E_0 R^2)$, se superposent. Ces courbes sont en fait les courbes de la fonction $f(a/R) = f(\vartheta)$, et montrent que l'équation 6.7 est valide. Pour de petits angles ϑ , on peut écrire au premier ordre $f(\vartheta) \approx f'(0)\vartheta$, où $f'(0)$ est la pente de la ligne droite donnant $f(\vartheta)$. On obtient finalement pour les incréments de concentration relative

$$\delta x = \frac{3|\mu|E_0\tau}{4\pi R} f'(0)\vartheta . \quad (6.8)$$

Nous avons vérifié l'approximation $f(\vartheta) \approx f'(0)\vartheta$ en ajustant des lignes droites aux valeurs calculées de $f(\vartheta)$. Comme le montre la figure 6.5, ces ajustements sont en excellent accord avec les données numériques. Les différentes courbes correspondent à différents rapports de conductivités interne et externe σ_i/σ_e , comme indiqué dans la légende. On peut constater que les pentes $f'(0)$ dépendent de ces rapports, et croissent pour des

rapports croissants. Ceci est logique : en effet, on s'attend à obtenir un flux de champ électrique nul pour une sphère parfaitement non conductrice. C'est aussi intéressant car cela permet d'avancer une cause autre que la diminution de taille de la vésicule au fait que les incréments de concentration relative semblent augmenter au fil d'une expérience. Une raison de ce phénomène pourrait être l'augmentation de la conductivité de la solution interne à la vésicule au cours de l'expérience. Elle ne contient originellement pas de sels pour faciliter l'électroformation des GUVs, mais au fur et à mesure que le liposome reçoit des impulsions elle se mélange avec la solution saline externe et σ_i augmente donc en tendant vers σ_e . Ceci résulte en une augmentation des flux ϕ , et donc en une augmentation des δx . On peut aussi voir sur la figure 6.5 que pour des rapports de conductivité entre 1/10 et 1, correspondant aux valeurs dans nos expériences, le facteur de flux $f'(0)\vartheta$ doit être, pour des angles raisonnables, de l'ordre de 0.1–0.5. Cette valeur doit bien évidemment varier d'une impulsion à l'autre, principalement à cause des différences dans la nature des surfaces perméabilisées, mais notre analyse prédit néanmoins que si nos hypothèses sont fondées, les valeurs de $f'(0)\vartheta = 4\pi R\delta x / (3|\mu|E_0\tau)$ obtenues à partir de nos données expérimentales pour δx devraient être distribuées autour de 0.1–0.5. Nous avons rassemblé dans la figure 6.6 toutes nos estimations expérimentales de $f'(0)\vartheta$ obtenues en utilisant pour μ la valeur de [Stellwagen 97] donnée plus haut. L'histogramme contient plus de 300 valeurs correspondant à diverses tailles de vésicules R , diverses amplitudes de champ E_0 et diverses durées d'impulsion τ . La forme étroite de la distribution autour des valeurs attendues 0.1–0.5 confirme notre hypothèse comme quoi l'entrée d'ADN dans les vésicules est principalement de nature électrophorétique.

La valeur du facteur de flux $f'(0)\vartheta$ moyennée sur toutes les expériences vaut $\langle f'(0)\vartheta \rangle \approx 0.26$. Si l'on prend comme valeur pour $f'(0)$ la valeur de 2.34 rad^{-1} correspondant à un rapport de conductivités égal à 1 (ceci doit être à peu près le cas après quelques impulsions, une fois que les solutions interne et externe se sont suffisamment mélangées), on obtient pour valeur moyenne de l'angle de perméabilisation ϑ : $\langle \vartheta \rangle \approx 6.3^\circ$. Cette valeur d'angle est raisonnable, mais ne doit pas forcément être interprétée comme étant la valeur d'angle de perméabilisation la plus fréquente de nos expériences. En effet, elle provient d'un moyennage sur plusieurs expériences avec des paramètres électriques et des tailles de GUVs très différents, et comme les vésicules décroissent durant l'application de la séquence d'impulsions, on s'attend à ce que ϑ décroisse aussi. Rappelons aussi que l'image d'un unique pore pendant l'impulsion est une image simpliste, pour le moment

corroborée par aucune observation². C'était juste une approximation que nous avons utilisée de manière à pouvoir estimer le flux du champ électrique ϕ . Même s'il est rassurant que $\langle \partial \rangle$ ait une valeur acceptable, il est très difficile de donner un sens réel à cette moyenne.

6.5 Discussion

Nos observations qualitatives et l'accord quantitatif entre notre modèle et nos résultats expérimentaux supportent un modèle d'entrée dans les GUVs de l'ADN plasmidique sous forme libre [Lurquin 00] et essentiellement dû aux effets électrophorétiques. Il existe cependant des différences entre notre système et notre protocole, et ceux utilisés par Chernomordik *et al.* [Chernomordik 90] qui méritent d'être soulignées. Par exemple dans [Chernomordik 90] une seule impulsion était appliquée, alors que nous avons utilisé des séquences d'au moins dix impulsions. Comme on peut le voir sur le sous-graphe en haut à gauche dans la figure 6.3, la quantité d'ADN transférée avec une seule impulsion peut parfois être très faible. On pourrait deviner que dans leurs expériences l'ADN ne pénétrait pas dans la vésicule pendant l'impulsion, et que le mécanisme évoqué, de type endocytose, avait en fait lieu comme nous l'avons observé à quelques reprises, après le traitement électrique. Les amplitudes de champ électrique utilisées dans [Chernomordik 90] induisaient des différences de potentiel transmembranaire au maximum de l'ordre de 450 mV, alors que les nôtres et celles de Lurquin et Athanasiou étaient à l'origine de chutes de potentiel de plus de 1 V. Ceci pourrait expliquer pourquoi si peu d'ADN était encapsulé par les liposomes dans les expériences de [Chernomordik 90]. Une autre origine éventuelle de ces différents comportements pourrait simplement être la nature même des systèmes considérés. Les liposomes utilisés dans [Chernomordik 90] étaient beaucoup plus petits (LUVs d'environ 500 nm de diamètre) et contenaient 70 % de DPPC et 30 % de cholestérol, alors que les GUVs de DPPC de [Lurquin 00], tout comme les nôtres d'EggPC, ne contenaient pas de cholestérol.

L'accord de nos résultats expérimentaux avec notre modèle pour l'entrée d'ADN corrobore nos observations qualitatives. Même s'il était impossible d'avoir précisément accès à la taille, au nombre, à la forme ou à la nature des défauts membranaires autorisant le passage de l'ADN, nous avons vu qu'une entrée par un ou plusieurs macropores de quelques microns de diamètre semble être une supposition raisonnable. De plus, comme observé dans le cas de cellules vivantes [Klenchin 91, Sukharev 92], l'entrée

2. J'ai d'ailleurs le sentiment qu'elle n'est pas près de l'être!

paraît être principalement pilotée par la force électrophorétique résultant de l'application du champ électrique. L'effet des impulsions électriques est donc double. Non seulement elles perméabilisent la bicouche lipidique, mais encore elles assurent le transport des composés chargés électriquement dans la vésicule, rendant l'électrotransfert de macromolécules avec une forte charge négative, telles l'ADN plasmidique, hautement efficace. Comme signalé dans le chapitre 4, l'application d'une séquence d'impulsions s'accompagne d'un rétrécissement des GUVs. Cette diminution de taille s'arrête lorsque les vésicules atteignent un rayon tel que le seuil critique de perméabilisation $\Delta\psi_c$ n'est plus dépassé. Notre estimation de $\Delta\psi_c$ d'après l'évolution du rayon des liposomes dans ces expériences nous conduit à une valeur de 500 mV beaucoup plus petite que les 890 mV estimés en l'absence d'ADN [Portet 09]. Ceci indique l'éventualité que les macromolécules chargées négativement puissent favoriser le processus de perméabilisation par certaines interactions avec la membrane. Il est possible que les molécules d'ADN circulent par les défauts conduisant *in fine* à la formation de macropores et que certaines de ces molécules empêchent la réparation de ces défauts. La présence d'ADN bloqué dans ces défauts pourrait peut-être avoir un lien avec le mécanisme de transfert par endocytose décrit dans [Chernomordik 90].

Un autre résultat de grande importance est le fait que l'on puisse parvenir à des concentrations d'ADN dans la vésicule plus importantes que celles à l'extérieur ($c/c_0 = I/I_0 > 1$, comme dans le sous-graphe en bas à droite de la figure 6.3). Ceci montre que l'ADN éprouve des difficultés à traverser la membrane du côté de la vésicule face à l'anode, et suggère que les structures de perméabilisation créées dans cette région ont une taille d'au plus quelques nanomètres, comme déjà déduit par d'autres méthodes dans le cas de cellules [Tekle 94] ou de GUVs [Tekle 01]. Cela signifie aussi que le ou les pores créés côté cathode se referment suffisamment vite, après l'impulsion, pour que la concentration d'ADN à l'intérieur du liposome n'ait pas le temps de s'équilibrer avec la concentration externe par diffusion. En effet, il a déjà été rapporté dans [Riske 05] et au chapitre 5 que des macropores créés dans des GUVs par des impulsions électriques se refermaient en quelques dizaines de millisecondes. La présence de tubules face à l'anode (cf figure 6.1), similaires à ceux décrits au chapitre 4 dans le cas de vésicules de DOPC, pourrait aussi vraisemblablement empêcher l'ADN de s'échapper de la vésicule par cet hémisphère. Un corollaire intéressant de ces résultats est que le transfert de macromolécules chargées *positivement* serait bien moins efficace que ce qui est observé ici. En effet, des molécules chargées positivement seraient écartées par le champ électrique de la zone contenant les macropores, et atteindraient la vésicule

uniquement par le pôle face à l'anode où les défauts semblent de moindre taille.

L'étude d'électrotransfection de cellules CHO en présence d'ADN plasmidique analogue à celui utilisé ici a montré que l'interaction de l'ADN à la membrane plasmique était de nature plus complexe qu'observé dans nos travaux. Dans [Golzio 02], l'ADN forme des spots discrets face à la cathode. Le fait que l'on n'observe pas de telle interaction avec des GUVs de PC a plusieurs explications possibles. Dans le cas de cellules, il se peut qu'un mécanisme de nature physique ou chimique tende à piéger les molécules d'ADN près de la membrane, ou bien que la mobilité réduite de l'ADN dans le cytoplasme cause un phénomène analogue à des embouteillages résultant en un blocage local de l'ADN. Rappelons encore que le motif de transport asymétrique vu dans nos expériences a aussi été observé sur cellules [Tekle 94]. L'asymétrie de transport décrite par les auteurs les a amenés à la conclusion que des pores étaient créés des deux côtés de la cellule, et qu'ils étaient moins nombreux mais de taille plus grande face à la cathode.

En plus de clarifier le mécanisme d'entrée d'ADN dans des liposomes par électroperméabilisation, notre travail souligne l'efficacité d'une méthode de transfert alternative à celle rapportée dans [Sato 03]. Cette procédure d'encapsulation dans des liposomes géants d'ADN plasmidique peut se révéler utile dans le cadre du transfert de gènes ou de la production artificielle de protéines. Une règle simple pour choisir les paramètres électriques de l'électrotransfert serait la suivante : utiliser une durée d'impulsion de 5 ms, régler l'amplitude du champ E_0 en fonction du rayon initial de la vésicule R_0 de manière à obtenir une différence de potentiel transmembranaire induite $\Delta\psi_0 = (3/2)R_0E_0 \sim 1$ V, puis appliquer une séquence d'impulsions à la fréquence de répétition 0.33 Hz jusqu'à l'encapsulation de la quantité d'ADN souhaitée. Cette technique est aussi applicable pour toute autre molécule chargée négativement, et une efficacité équivalente ($c/c_0 > 1$) devrait être atteinte du moment que les molécules sont suffisamment grosses pour ne pas pouvoir retraverser la membrane du côté anode. La charge négative est cruciale afin d'entrer dans la vésicule par l'hémisphère face à la cathode. Plus importante sera la charge (et donc la mobilité électrophorétique) alors plus grande sera la quantité effectivement transférée, comme on peut s'en rendre compte grâce à l'équation 6.8 stipulant que la quantité encapsulée par impulsion est proportionnelle à la charge électrique nette.

Nous avons montré que le mécanisme d'entrée d'ADN dans des liposomes géants est indubitablement l'entrée électrophorétique sous forme libre par des macropores présents sur le côté de la vésicule face à la ca-

thode. Cette spectaculaire brisure de symétrie, déjà pointée du doigt dans [Tekle 01], est ce qui rend l'électrotransfert d'ADN dans les GUVs si efficace. En effet, la concentration d'ADN dans les vésicules peut même excéder celle dans le milieu externe. Ce serait impossible si des macropores s'ouvraient aussi du côté du liposome face à l'anode car l'ADN quitterait la vésicule par ces passages, et cela montre clairement que même si de petits composés chargés positivement peuvent traverser la partie de la bicouche face à l'anode, des molécules de taille suffisante en sont incapables. Nous pouvons déduire de cette observation que les structures de perméabilisation créées face à l'anode pendant l'impulsion mesurent au plus quelques nanomètres. L'origine sous-jacente de ces différences frappantes de la réorganisation membranaire à l'échelle microscopique reste encore inconnue, et l'explication de cette asymétrie entre les deux pôles constitue une direction de recherches à venir très intéressante.

6.6 Figures du chapitre 6

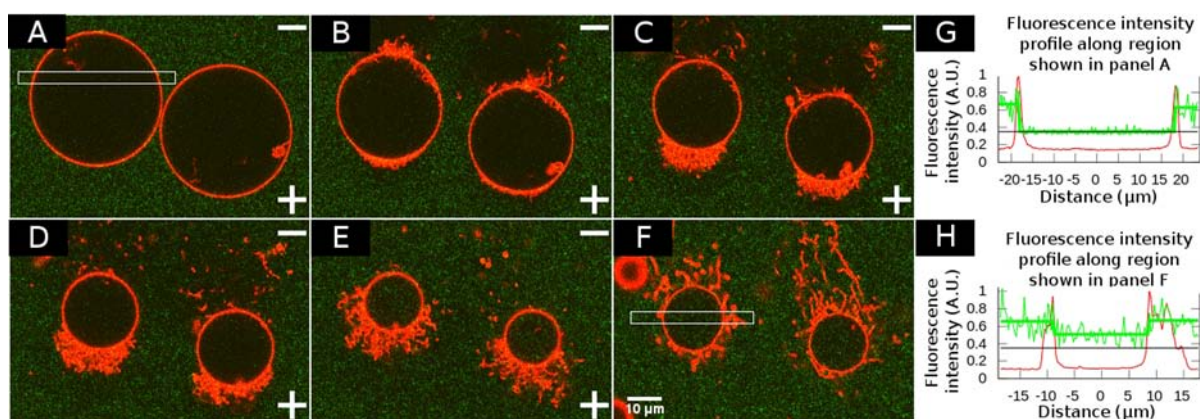


FIGURE 6.1: **A-F** : Images brutes d'une expérience typique. La Rhodamine PE (membrane) et le TOTO-1 (ADN) sont représentés en rouge et vert, respectivement. 20 impulsions d'amplitude 39 kV/m et de durée 5 ms ont été appliquées à 0.33 Hz, soit une impulsion toutes les 3 secondes pour un temps total de pulsation d'une minute. Les images ont été acquises après 0, 6, 12, 18, 54 et 222 secondes; l'origine des temps est le début de l'acquisition, et la première impulsion fut appliquée après environ 2.5 secondes. Les vésicules sont donc montrées après avoir reçu 0, 2, 4, 6, 18 et 20 impulsions, respectivement. La direction du champ est indiquée uniquement sur les images prises pendant la séquence d'impulsions, par la position des électrodes (signes + et -). La dernière image (F) fut acquise plus de deux minutes après la dernière impulsion et montre la stabilité des vésicules chargées d'ADN. On peut voir les tubules associés à la diminution de taille du GUV décrits au chapitre 4. **G et H** : Profils de fluorescence le long des régions rectangulaires des images A et F, respectivement. La ligne verte épaisse représente la valeur moyenne de fluorescence du TOTO-1 sur la gauche, à l'intérieur et sur la droite du GUV. La ligne noire montre le niveau de fluorescence de base qui correspond en réalité à une quantité nulle d'ADN, et qui était retranché systématiquement lors de l'analyse (voir annexe B.2).

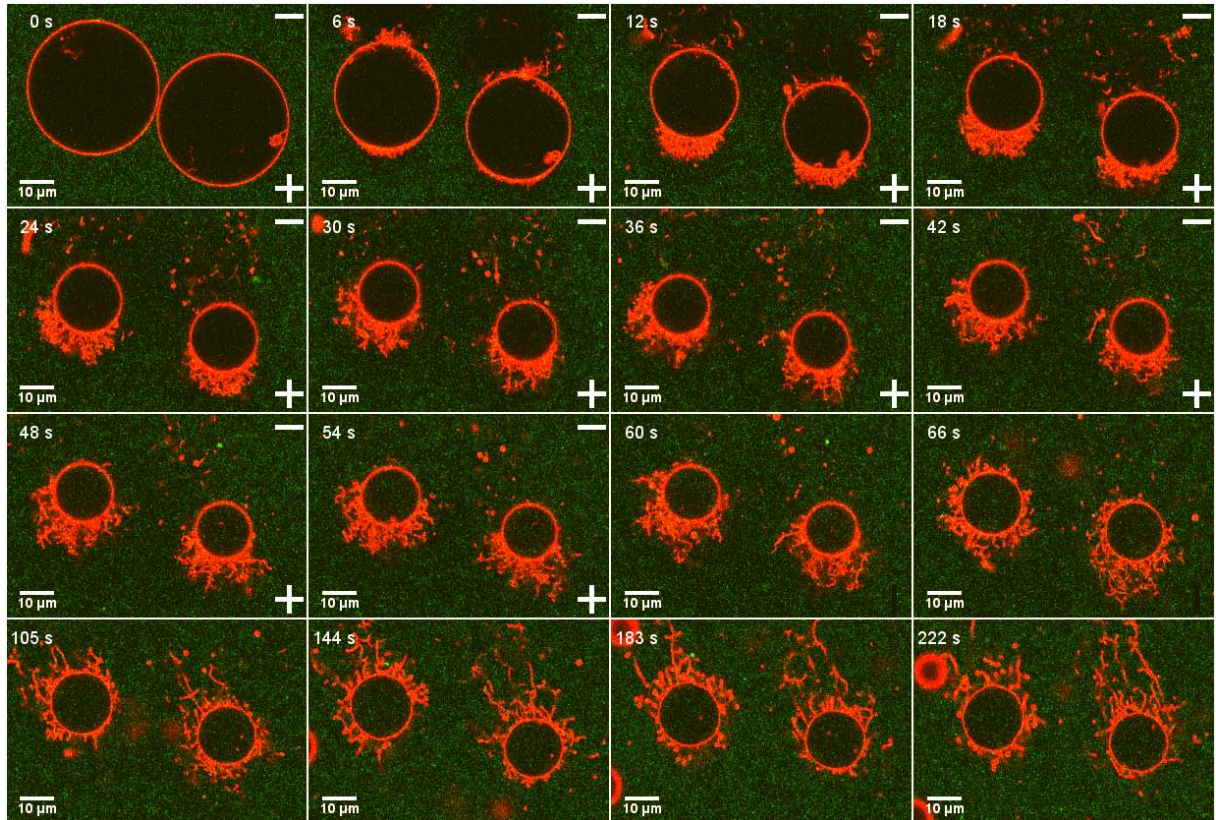


FIGURE 6.2: Mêmes vésicules qu'à la figure 6.1, montrées à différents temps qui apparaissent en haut de chaque image. Ici encore, la présence des électrodes + et - signifie que la séquence d'impulsions n'est pas encore achevée.

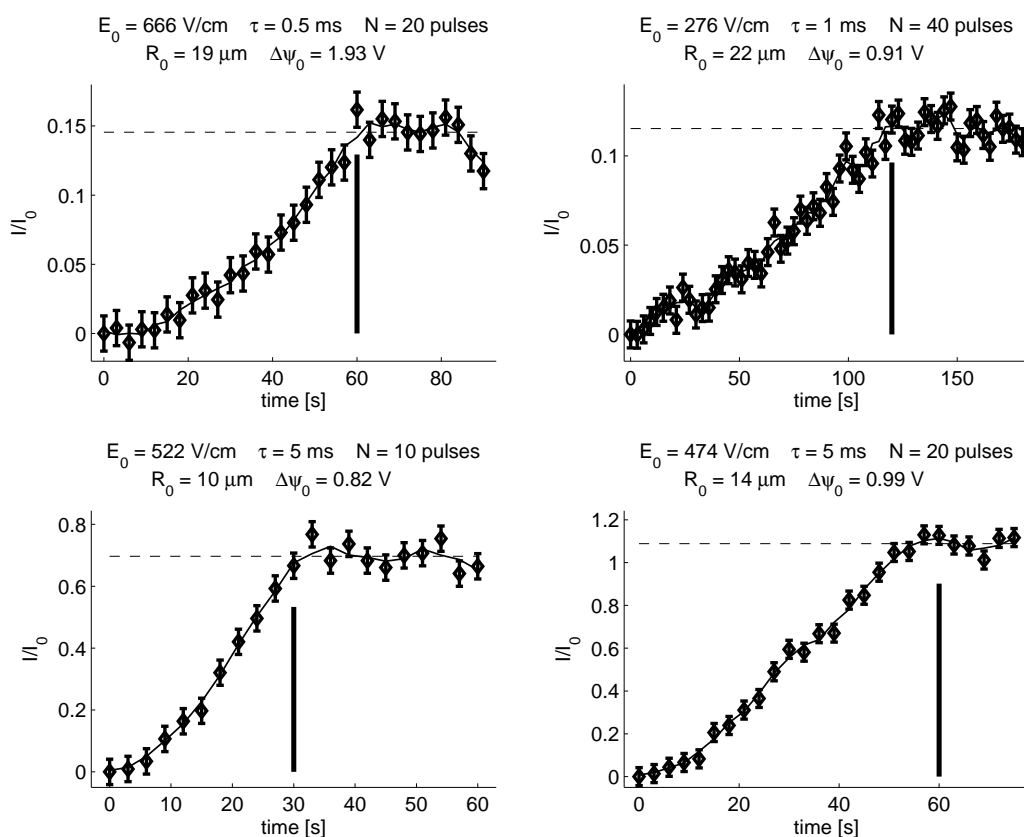


FIGURE 6.3: Tracés de l'intensité de fluorescence moyenne relative à l'intérieur de la vésicule I/I_0 (ou de manière équivalente de la concentration relative d'ADN c/c_0) en fonction du temps, pour quatre expériences typiques. Les losanges représentent les données brutes, et les courbes ces mêmes données lissées par moyenne glissante de largeur 3. Ce sont ces valeurs qui ont été utilisées dans le calcul des incréments de concentration relative δx (voir section 6.4). Les barres d'erreur représentent l'écart-type de I/I_0 après les séquences d'impulsions. Les concentrations relatives finales, obtenues en moyennant les valeurs de I/I_0 après les dernières impulsions, sont indiquées par la ligne en pointillés. La ligne verticale marque la fin de la séquence d'impulsions. Noter les différentes échelles verticales et horizontales pour chaque sous-graphe. Les paramètres des impulsions électriques, le rayon initial de la vésicule R_0 et la différence de potentiel transmembranaire initiale $\Delta\psi_0$ sont donnés pour chaque courbe. Une impulsion était appliquée entre deux points consécutifs (fréquence de répétition de 0.33 Hz).



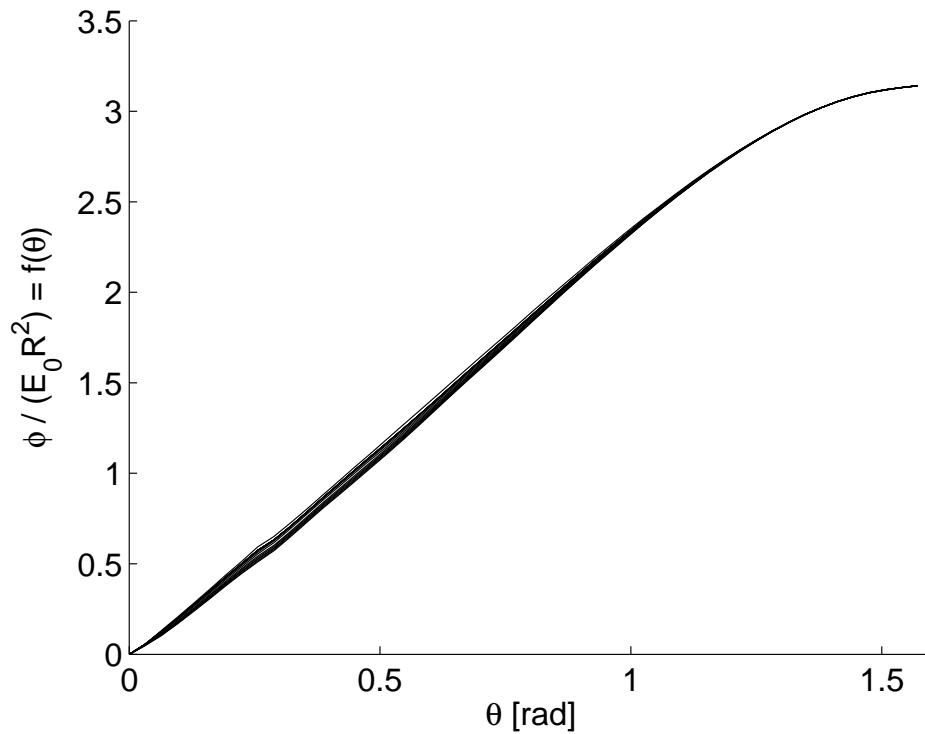


FIGURE 6.4: Flux ϕ du champ électrique à travers une calotte sphérique perméabilisée d'angle ϑ . Les valeurs de ϕ ont été calculées numériquement pour différents rayons du liposome R variant entre 5 et 50 μm , et diverses amplitudes de champ E_0 variant entre 10 et 500 kV/m. Les conductivités électriques interne et externe σ_i et σ_e étaient toutes deux égales à 400 $\mu\text{S/cm}$. De légères déviations ont lieu pour les courbes correspondant à différents rayons, à cause de la nécessité d'utiliser différents maillages. Les courbes correspondant à différents E_0 se superposent exactement.

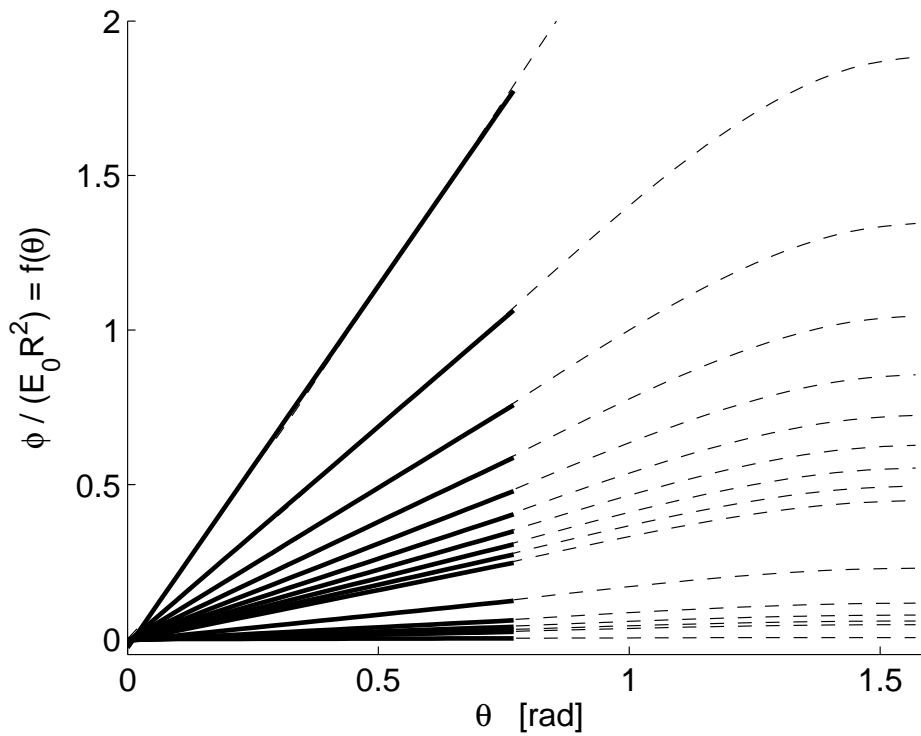
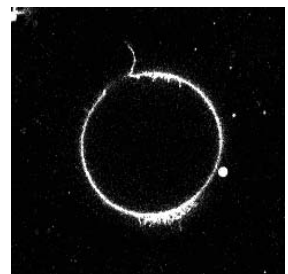


FIGURE 6.5: Flux ϕ du champ électrique à travers une calotte sphérique perméabilisée d'angle ϑ . Les valeurs de ϕ (lignes en pointillés) ont été calculées numériquement pour différentes conductivités électriques internes $\sigma_i = \{\sigma_e, \sigma_e/2, \sigma_e/3 \dots \sigma_e/10, \sigma_e/20, \sigma_e/40 \dots \sigma_e/100, \sigma_e/1000\}$ (de la courbe du haut vers la courbe du bas). Le rayon de la vésicule R était de $10 \mu\text{m}$, l'amplitude du champ E_0 de 60 kV/m , et la conductivité externe σ_e de $400 \mu\text{S/cm}$. Les lignes pleines épaisses sont des ajustements linéaires des données numériques. Ces ajustements montrent que l'approximation au premier ordre de $f(\vartheta)$ faite pour obtenir l'équation 6.8 est valide, et que pour des angles de surface perméabilisée ϑ raisonnables et des conductivités interne et externe du même ordre, $f'(0)\vartheta$ est de l'ordre de 0.1–0.5.



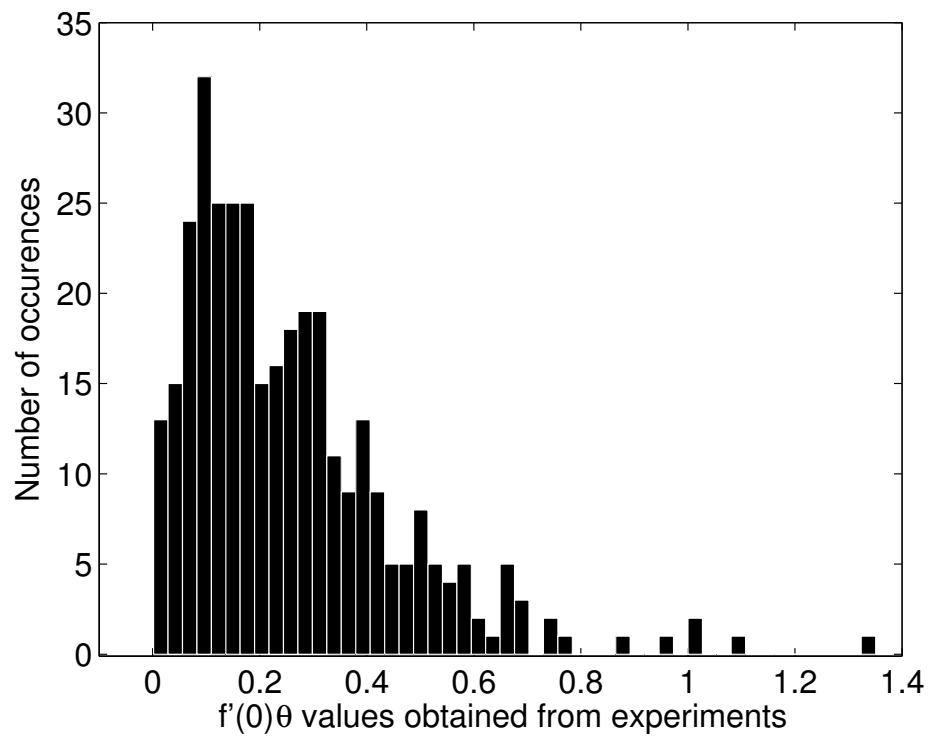


FIGURE 6.6: Histogramme des valeurs du facteur de flux $f'(0)\theta$ obtenues expérimentalement. À cause des fluctuations des valeurs mesurées de c/c_0 et des faibles incréments au début de la séquence d'impulsions, 20 données sur 360 se sont avérées être négatives et ont donc été exclues de cet histogramme.

Chapitre 7

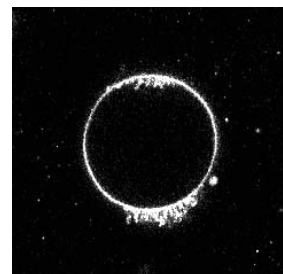
Modélisation de l'entrée de molécules chargées dans des cellules vivantes

Contexte

Nous avons déjà souligné que l'électrotransfert de petites molécules comme de l'iodure de propidium (PI) ou de macromolécules comme de l'ADN plasmidique mettait en jeu des phénomènes différents. Alors que les petites molécules traversent librement la membrane électroperméabilisée, l'ADN subit tout d'abord une étape d'interaction avec la membrane (interaction ADN/membrane). Des amas locaux, ou spots, d'ADN se forment dans le voisinage immédiat de la membrane. La dynamique de ce procédé est pour le moment méconnue, les précédentes observations ayant été effectuées à l'échelle de la seconde.

Jean-Michel Escoffre et Cyril Favard ont réalisé des expériences d'électroperméabilisation de cellules CHO en présence d'ADN sous un microscope confocal rapide¹. Ils ont pu suivre l'électrotransfection des cellules à une résolution temporelle de 2 ms, et ainsi montrer que les complexes d'ADN étaient créés dès la première impulsion. Avec des expériences de récupération de fluorescence après photoblanchiment (FRAP), ils ont observé que ces complexes restaient quasi-immobiles. Nous avons proposé un modèle théorique pour expliquer l'apparence de sites d'interaction distincts, l'accroissement de la quantité d'ADN dans ces sites et leur immobilité, qui

1. L'annexe A décrivant mes méthodes expérimentales ne donne pas d'informations relatives à ces expériences car ce n'est pas moi qui les ai réalisées. Le lecteur intéressé par ces informations pourra consulter la section **Materials and methods** de l'annexe G.



nous permet aussi de proposer une possible explication pour le succès du transfert de gène par électroperméabilisation. Ces travaux à la fois expérimentaux et théoriques ont donné lieu à un manuscrit requérant quelques modifications mineures avant sa publication dans *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, dont une copie est fournie en annexe G.

7.1 Introduction

L'électroperméabilisation permet l'accès au cytoplasme de petites, et même de grosses molécules telles que de l'ADN plasmidique [Neumann 89, Weaver 95]. Cette technique a des applications thérapeutiques, notamment dans le cadre de la lutte contre le cancer et des thérapies géniques [Belehradek 93, Daud 08, Rols 06]. Malgré son utilisation dans le monde médical, de nombreuses questions relatives aux phénomènes biophysico-chimiques fondamentaux restent sans réponse. C'est spécialement le cas concernant l'électroperméabilisation de membranes à des grosses molécules d'ADN. Compte tenu de la taille de l'ADN plasmidique (plusieurs milliers de paires de bases, soit plusieurs millions de masses atomiques), si la perméabilisation est engendrée par des pores (ou des défauts conducteurs), comme il est suggéré par la théorie standard de l'électroporation [Pastushenko 79, Powell 86], alors les pores doivent être relativement larges à cause de la grande taille des molécules d'ADN, et à cause du besoin de compenser l'exclusion diélectrique due à leur importante charge électrique [Parsegian 69]. La membrane plasmique a une organisation bien plus complexe que celle de simples bicouches lipidiques. On peut s'attendre à ce que la localisation des régions perméables à l'ADN ne soit pas déterminée uniquement par le champ électrique local, mais aussi par la composition membranaire locale. Dans les membranes cellulaires, les régions les plus susceptibles à la perméabilisation pourraient être celles contenant certains types de protéines transmembranaires, ou encore celles à l'interface entre différents domaines lipidiques [Antonov 80]. Un autre facteur clé est la manière dont le champ électrique induit un mouvement de l'ADN par électrophorèse, les grands polyélectrolytes étant fortement influencés par le champ [Gabriel 99]. En effet, des études expérimentales ont montré que les phénomènes physicochimiques en jeu dans l'électrotransfert d'ADN sont beaucoup plus complexes qu'avec de petites molécules. De telles molécules traversent simplement la membrane perméabilisée par diffusion après les impulsions, alors que l'ADN exhibe une étape d'interaction avec la membrane, en formant des spots discrets face à la cathode [Golzio 02]. La dynamique de ce procédé est encore méconnue, car les observations de

Golzio *et al.* étaient réalisées à l'échelle de la seconde [Golzio 02]. Dans ce chapitre, nous allons décrire l'interaction ADN/membrane à une résolution temporelle de 2 ms. Cet accès aux événements qui se déroulent *pendant* les impulsions (de durée 20 ms) nous permet d'apporter des éléments de réponse aux questions essentielles suivantes.

- Quels sont les phénomènes conduisant à la formation de ces sites où l'ADN s'accumule ?
- Quelle est la dynamique de leur formation ?
- Dans quelle mesure les sites sont-ils localisés dans l'espace, et sur quelles échelles de temps ?
- Quel est le mécanisme de cette localisation ?

Nous avançons un modèle pour le transport de molécules chargées en présence d'un champ électrique, qui nous permet de proposer une interprétation pour les observations expérimentales, et dont la validité est aussi testée avec une molécule beaucoup plus petite, le PI.

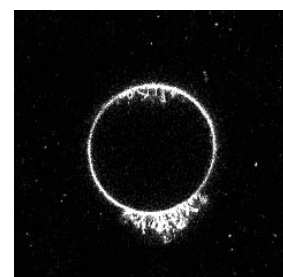
7.2 Résumé des résultats expérimentaux

7.2.1 Expériences d'électropulsation

De l'iodure de propidium (PI) et de l'ADN plasmidique marqué avec une sonde fluorescente, le TOTO-1, ont été utilisés pour étudier la perméabilisation de la membrane par champs électriques et l'entrée de molécules associée. La perméabilisation était induite par l'application d'impulsions électriques de durée 20 ms et d'amplitude 50 kV/m, à une fréquence de répétition de 1 Hz. Ce protocole est connu pour provoquer à la fois la perméabilisation de la membrane, et le transfert de gène [Golzio 02]. La perméabilisation de la membrane était observée au niveau de la cellule unique, à une résolution temporelle de 500 images par seconde. Cette fréquence d'acquisition autorisait le suivi du processus de l'entrée de molécules à la fois pendant et après les impulsions, avec une résolution spatiale typique de microscopie confocale. Un intérêt particulier a été porté à l'entrée de molécules ayant lieu après une unique impulsion, ou après une dizaine.

7.2.2 Expériences d'électropulsation en présence de PI

Comme on peut le voir sur les figures 7.1A et 7.1C, et comme déjà rapporté dans [Golzio 02], la perméabilisation de la membrane était détectée par entrée de PI, face aux deux électrodes. L'afflux de PI dans les cellules, déduit de la fluorescence associée, suggère un transport libre à travers



la membrane vers le cytoplasme ; on n'observe pas de piégeage dans le voisinage de la membrane. L'entrée de PI commençait au moment de l'application du champ électrique, et la concentration de PI dans la cellule augmentait pendant environ une minute, montrant que l'état perméable de la membrane persiste après la fin de l'impulsion (figure 7.1E). En effet, la majorité des molécules pénétrait dans la cellule après l'impulsion. L'analyse de l'infiltration des molécules image par image révéla que le processus était à la fois asymétrique et différé: il était plus important face à l'anode et retardé de 4-5 secondes face à la cathode. Cette asymétrie de transport peut s'expliquer par le fait que le PI en solution porte une charge électrique de $+2e$ et que la force électrophorétique l'entraîne vers la cathode.

7.2.3 Expériences d'électropulsation en présence d'ADN

L'électrotransfert d'ADN dans les cellules CHO a donné des résultats radicalement différents de ceux obtenus pour l'électrotransfert de PI. L'interaction ADN/membrane n'a été observée que pour des intensités de champ électrique plus grandes que la valeur critique (~ 25 kV/m) induisant la perméabilisation, *i.e.* conduisant à une entrée de PI. Dans le régime de faibles champs, l'ADN s'écoulait simplement autour des cellules et se dirigeait vers l'anode. Pour des champs perméabilisants, on n'observait pas comme pour le PI une entrée diffuse d'ADN pendant ni même après l'impulsion. On observait en revanche une accumulation sur des sites distincts de la membrane perméabilisée faisant face à la cathode (figure 7.1D). Les molécules d'ADN semblaient s'agréger sur ces sites, et ce dès le déclenchement de l'impulsion électrique (figures 7.2A et 7.2B). De manière surprenante, ni le nombre ni la taille apparente de ces sites ne semblaient augmenter avec le nombre d'impulsions appliquées. Pendant l'application d'une impulsion, la fluorescence des sites augmentait linéairement avec le temps, indiquant que la quantité d'ADN piégé augmentait aussi linéairement (figure 7.1F). Comme cette même fluorescence n'augmentait pas en l'absence de champ électrique, nous pouvons conclure que l'accumulation d'ADN sur les sites d'interaction est principalement de nature électrophorétique.

La présence de sites stables, sièges de l'interaction ADN/membrane, était observée sur l'ensemble de la population cellulaire (figure 7.1D). La distance moyenne entre un site et son plus proche voisin était de l'ordre de $1 \mu\text{m}$, et le diamètre d'un site de l'ordre de 300-600 nm (borne inférieure due à la limite de diffraction). Comme le montre la figure 7.2C, la quantité totale d'ADN dans la région de la membrane croissait proportionnellement au nombre d'impulsions. La quantité finale d'ADN dans la région de la membrane était corrélée à la quantité d'ADN atteignant le noyau de la cel-

lule, comme estimé par le taux d'expression de la GFP entre 2 et 24 heures après l'électrotransfection (figure 7.3).

Comme on peut le voir sur les figures 7.1E et 7.1F, une large proportion de l'ADN restait fixée au site d'interaction après la fin de l'impulsion. Ceci pourrait être dû à une véritable interaction entre l'ADN et la membrane plasmique, ou bien au fait que l'ADN poussé par la force électrophorétique à travers la membrane soit virtuellement immobile dans la cellule en l'absence de champ électrique. Cette dernière observation montre que l'interaction ADN/membrane pourrait être causée, du moins en partie, par l'accumulation électrophorétique et une mobilité de l'ADN réduite à l'intérieur de la cellule dans la région du pore.

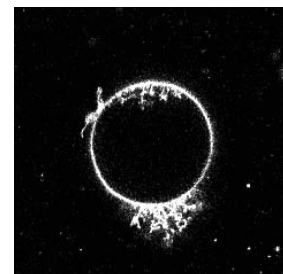
La mobilité des complexes d'ADN formés sur les sites d'interaction a aussi été étudiée, en mesurant le coefficient de diffusion latérale des spots par expériences de FRAP. Les résultats ont montré qu'aucun échange d'ADN entre les sites ou avec le milieu externe n'avait lieu, et que l'ADN était totalement immobile à l'échelle de temps de l'expérience, son coefficient de diffusion latérale étant inférieur à $10^{-16} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$. Ce pourrait être expliqué par la mobilité réduite des molécules d'ADN à l'intérieur de la cellule, ou parce que les molécules d'ADN forment des agrégats immobiles à cause de leur grande taille. Il est peu probable que cette immobilité soit due à une immobilité intrinsèque des pores, étant donné que la valeur mesurée pour le coefficient de diffusion est largement plus faible que celles typiquement rapportées dans la littérature pour des objets membranaires, tels que des protéines par exemple.

On pourrait prétendre qu'une polymérisation de l'actine autour des sites riches en ADN pourrait être responsable de leur immobilisation, ainsi que de la migration consécutive dans le cytoplasme. Cependant, la perturbation du cytosquelette d'actine par incubation des cellules avec de la Latrunculine A n'a pas semblé modifier les caractéristiques des spots d'ADN, leur création, leur stabilité ou leur immobilité (figure 7.4). Ceci implique que même si l'actine peut causer une importante diminution de la mobilité de gros fragments d'ADN dans le cytoplasme, la formation initiale des spots d'ADN et leur immobilité ne sont pas dues au réseau d'actine.

7.3 Analyse théorique

7.3.1 Modèle

Afin de mieux comprendre les caractéristiques de l'entrée d'ADN par électropériméabilisation, nous avons développé un modèle théorique à par-



tir duquel nous avons réalisé des simulations numériques. La membrane est traitée comme une surface non conductrice très fine, cette approximation étant valide vu que l'épaisseur de la membrane est petite devant le rayon de la cellule, et sa conductivité électrique σ_m petite devant celles des solutions interne σ_i et externe σ_e . Un champ électrique d'amplitude $|\mathbf{E}_0| = E_0$ est appliqué dans la direction z perpendiculaire aux électrodes, et le potentiel électrique ψ , dans le régime stationnaire, est donné par la solution de l'équation de Laplace [Landau 75]

$$\nabla \cdot \sigma \nabla \psi = 0, \quad (7.1)$$

avec la condition aux limites $\psi = -E_0 z$ quand $|z| \rightarrow \infty$ (le système est décomposé en deux parties, l'intérieur et l'extérieur de la cellule, pour chacune desquelles la conductivité σ est constante; l'équation 7.1 est donc bien équivalente à la forme plus courante de l'équation de Laplace $\nabla^2 \psi = 0$). Nous supposons par la suite que l'ADN est mu par le champ $-\nabla \psi$ solution de l'équation 7.1, et négligerons les champs additionnels éventuellement causés par l'accumulation de charge locale créée par l'ADN. Ceci est légitime car les champs appliqués sont d'intensité importante, et car les charges de l'ADN dans nos systèmes expérimentaux sont très écran-tées. Outre sa composante électrophorétique, le mouvement des molécules aura aussi une composante diffusive. La concentration locale $c(\mathbf{x}, t)$ est gouvernée par l'équation d'électrodifusion

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -\nabla \cdot \mathbf{j} \quad (7.2)$$

où \mathbf{j} est le courant thermodynamique $\mathbf{j} = -D\nabla c + \mu c \mathbf{E}$, D est le coefficient de diffusion de la molécule, noté D_e à l'extérieur de la cellule, D_i à l'intérieur, et D_m dans la membrane. Le terme μ désigne la mobilité électrophorétique de la molécule, et est défini *via* la vitesse stationnaire \mathbf{v} de la molécule dans un champ localement uniforme $\mathbf{E} = -\nabla \psi$ par

$$\mathbf{v} = \mu \mathbf{E} . \quad (7.3)$$

La valeur de μ , comme celle du coefficient de diffusion, dépendra de l'environnement local. Comme les électrodes sont en contact avec une grande quantité de la solution, nous imposons pour l'équation 7.2 les conditions aux limites $\nabla c = 0$ quand $|z| \rightarrow \infty$. Nous imposons aussi $D_m = 0$ et $\mu_m = 0$, ce qui signifie que l'ADN ne peut pas se déplacer dans les régions intactes de la membrane.

Les équations aux dérivées partielles 7.1 et 7.2 sont résolues numériquement par la méthode des éléments finis avec le logiciel Comsol. On obtient ainsi l'évolution de la concentration de la molécule d'intérêt en tout point du système.

7.3.2 Modélisation des pores

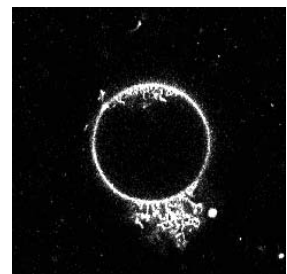
Nous supposons que quand le champ électrique est appliqué, la membrane se perméabilise et des pores microscopiques sont formés. Afin de simplifier les calculs numériques, nous nous intéresserons à ce qui se passe quand un pore circulaire est présent sur chaque pôle de la cellule face aux électrodes, pour la région angulaire $\vartheta \in [0, \vartheta_p]$ face à l'anode, et pour $\vartheta \in [\pi - \vartheta_p, \pi]$ face à la cathode. Dans ces régions, nous supposerons que la conductivité électrique vaut σ_i et le coefficient de diffusion D_i : ceci revient à remplacer la membrane par un matériau aux propriétés semblables à celles du cytoplasme. On calcule l'évolution de la concentration des molécules en fonction du temps en utilisant les mêmes amplitudes et durées d'impulsions que dans les expériences (on suppose que le processus de charge de la membrane est bien plus rapide que les processus de diffusion, ce qui est vrai, et on change donc le champ électrique instantanément).

7.3.3 Estimation des paramètres théoriques

La vitesse de l'ADN dans un champ électrique a été mesurée par examen des images de fluorescence. En utilisant l'équation 7.3, nous avons estimé la mobilité électrophorétique en solution : $\mu = 10^{-8} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$. Ceci est en accord avec des mesures plus précises rapportées dans la littérature [Stellwagen 97]. Pour le coefficient de diffusion de l'ADN en solution aqueuse, on prend $D_e = 10^{-12} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$, d'après [Lukacs 00].

La charge du PI en solution est $q = +2e$ et son coefficient de diffusion est obtenu en estimant son rayon effectif et en utilisant la formule de Stokes pour le coefficient de diffusion d'une sphère solide, ce qui conduit à $D_e = 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$. Sa mobilité électrophorétique est obtenue en utilisant la relation $\mu = qD/(k_B T)$, avec k_B la constante de Boltzmann et T la température.

Dans le cytoplasme, on estime que le coefficient de diffusion et la mobilité électrophorétique du PI sont diminués d'un facteur 10, et d'un facteur 1000 pour l'ADN. Ce facteur, qui représente en fait pour l'ADN une borne inférieure, est majoritairement dû aux interactions entre l'ADN et le cytosquelette d'actine [Lukacs 00, Dauty 05]. Enfin, le rayon de la cellule est estimé d'après la taille moyenne des cellules à $R = 8 \mu\text{m}$.



7.3.4 Résultats théoriques et comparaison avec les expériences

Nous supposons que la fluorescence du marqueur est proportionnelle à la concentration de la molécule $c(\mathbf{x}, t)$. Contrairement à ce qui était le cas avec le système artificiel du chapitre 6, ici le coefficient de proportionnalité n'est pas nécessairement le même que l'on soit à l'extérieur ou à l'intérieur de la cellule. Ceci ne posera toutefois pas de problème, car nous ne nous intéresserons pas à des concentrations relatives entre intérieur et extérieur de la cellule, mais simplement à la concentration dans la cellule c_{cell} . Pour comparer nos résultats à l'expérience, nous avons pris un angle de pore $\partial_p = 3.6^\circ$ en raison de la taille des spots d'interaction ADN/membrane observés. Nous avons calculé l'intensité de fluorescence moyenne dans la cellule d'après $I_{cell} \propto c_{cell}$. Les figures 7.1G et 7.1H montrent le comportement prédit pour la fluorescence de PI dans la cellule après une impulsion d'amplitude 50 kV/m et de durée 20 ms ; on voit que ce comportement est analogue à celui observé expérimentalement sur les figures 7.1E et 7.1F. De manière similaire, nous voyons sur ces mêmes figures que les courbes expérimentales et théoriques sont elles aussi semblables, dans le cas du transport d'ADN. La légère diminution de la fluorescence d'ADN observée expérimentalement après l'impulsion est plus prononcée que dans le cas de la simulation ; ce pourrait être en partie à cause d'un léger photoblanchiment du TOTO-1. Notons que bien que nous n'ayons simulé qu'un seul pore, la forme des courbes serait globalement la même pour plusieurs pores se comportant indépendamment (comme des canaux de conduction en parallèle), mis à part une hausse des niveaux absolus de fluorescence.

Dans le cas du PI, notre modèle reproduit aussi le comportement qualitativement observé dans les expériences. Les simulations montrent que le PI entre par le pôle de la vésicule face à l'anode pendant l'application de l'impulsion, et que son entrée par le pôle face à la cathode est légèrement différée, sans doute à cause de sa charge positive qui tend à l'éloigner de ce pôle.

Pour l'ADN, les simulations ont montré que juste après l'application du champ, il n'y a quasiment pas d'entrée d'ADN face à l'anode, mais que face à la cathode de l'ADN s'accumule près de la surface de la cellule, dans la région où se trouve le pore. Dans notre modèle, cette accumulation d'ADN est due à l'importante force électrophorétique (comparée à celle officiant sur le PI) qui pousse l'ADN à travers le pore face à la cathode, et à la mobilité réduite de l'ADN dans le cytoplasme. Pour l'ADN, la majeure partie de la contribution à la fluorescence de la cellule provient de la région proche de la membrane, ce qui justifie notre comparaison des figures 7.1E, 7.1F,

7.1G et 7.1H.

7.3.5 Nombre constant de sites d'interaction

Les expériences ont montré qu'après la formation des premiers sites d'interaction, aucun nouveau site n'est créé par l'application d'impulsions supplémentaires. Une explication à ce phénomène est que les pores formés sont conducteurs et qu'en conséquence le champ électrique dans les régions intactes de la membranes est abaissé. Un critère simple pour déterminer si une membrane peut être localement perméabilisée est l'examen de la tension de surface induite par le champ électrique. Si cette tension est supérieure à la tension de lyse de la membrane, alors celle-ci peut effectivement être perméabilisée. Ceci est équivalent au fait que la différence de potentiel transmembranaire induite par le champ, $\Delta\psi$, excède une valeur critique $\Delta\psi_c$, de l'ordre de 0.2-1 V selon les types de membranes considérés [Teissié 93, Portet 09]. Pour évaluer de quelle manière la présence d'un pore abaisse le potentiel transmembranaire induit, on peut considérer le cas simplifié d'une membrane non conductrice très fine et infiniment étendue, avec un pore conducteur de rayon a . La chute de potentiel à travers la membrane à une distance r du pore est donnée par

$$\Delta\psi(r) = \frac{2\Delta\psi_0}{\pi} \arctan\left(\frac{\sqrt{r^2 - a^2}}{a}\right), \quad (7.4)$$

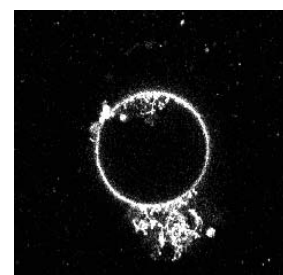
où $\Delta\psi_0$ est la différence de potentiel transmembranaire loin du pore (ou en son absence), avec $\Delta\psi_0 > \Delta\psi_c$ [Winterhalter 87]. Si les pores peuvent être uniquement formés dans les régions où $\Delta\psi > \Delta\psi_c$, alors on voit bien qu'aucun nouveau pore ne peut être créé trop près du pore initial, à une distance inférieure à

$$r_c = \frac{a}{\cos\left(\frac{\pi\Delta\psi_c}{2\Delta\psi_0}\right)}. \quad (7.5)$$

Bien qu'approximative, cette estimation montre que nous devons nous attendre à observer des pores séparés les uns des autres par une distance de l'ordre de leur taille. C'est en effet le cas : on peut s'en rendre compte sur la figure 7.2B, où la largeur des pics de fluorescence est équivalente à la distance entre les pics.

7.4 Discussion

Malgré la complexité du système étudié, bon nombre des observations expérimentales peuvent être expliquées par des arguments purement phy-



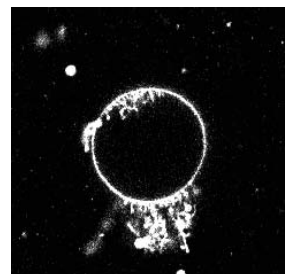
siques. D'après la théorie standard de l'électroperméabilisation, le champ électrique perméabilise la membrane *via* la création de pores microscopiques. Il agit aussi sur l'ADN par électrophorèse en l'entraînant vers la région de la cellule face à la cathode et, comme nos simulations l'ont montré, si des pores de taille suffisante sont présents il peut forcer le passage de l'ADN par ces pores. Cependant, une fois que l'ADN a atteint l'intérieur de la cellule, il reste très proche de la membrane, soit à cause de la réduction de son coefficient de diffusion et de sa mobilité électrophorétique par le cytosquelette, soit parce qu'il forme des agrégats immobiles à cause de leur grande taille. Le nombre de sites d'accumulation de l'ADN reste constant si l'on augmente le nombre d'impulsions électriques. Nous pensons que c'est car ces sites sont conducteurs ; dans ce cas, leur présence réduit le champ électrique dans le reste de la membrane et empêche donc la perméabilisation de nouvelles zones et la formation de nouveaux sites.

Nous avons observé la formation de sites d'accumulation de l'ADN dans des cellules au cytosquelette d'actine perturbé par la Latrunculine A. Nous en concluons que le mécanisme principal d'apparition des spots d'ADN est la formation d'agrégats où les molécules d'ADN sont liées entre elles et diffusent donc comme un objet macroscopique, avec un faible coefficient de diffusion. Un mécanisme éventuel pour cette agrégation est la présence de cations multivalents, déjà présents dans le cytoplasme, dans la région des pores où la concentration en ADN peut être localement très élevée [Bloomfield 99].

Nous sommes donc en mesure d'avancer une possible explication au succès du transfert de gène par électroperméabilisation. En principe, des agrégats d'ADN de taille microscopique seraient trop gros pour passer par les pores formés durant l'électroporation². Des molécules d'ADN individuelles, bien qu'elles puissent passer par des électropores, ont une mobilité limitée dans le cytoplasme et pourraient très bien être totalement dégradées avant d'atteindre le noyau. Il serait possible (et intéressant à étudier) que le cytosquelette d'actine réagisse à la présence d'agrégats d'ADN et joue un rôle dans le trafic intracellulaire suivant la transfection. Il semble raisonnable que seuls des agrégats de taille suffisante soient capables d'induire une réponse cellulaire et d'être transportés vers le noyau. De plus, le fait que l'ADN soit présent sous forme d'agrégats fait que certaines des molécules sont relativement bien protégées de la dégradation par les composés cytoplasmiques. Par conséquent, dans l'optique des thérapies géniques, il

2. Rappelons nous qu'ici nous parlons de cellules et non de GUVs. Des macropores comme ceux décrits au chapitre 5 sur des liposomes géants d'EggPC n'ont **jamais** été observés sur cellules.

est optimal que l'ADN pénètre dans la cellule sous forme de molécules individuelles. Toutefois le transport ultérieur est, pour des raisons biologique (induction possible d'une réponse du cytosquelette) et physique (diminution de la dégradation enzymatique) optimisé si l'ADN se trouve sous forme d'agrégats microscopiques. On voit donc que c'est une subtile, et sans doute fortuite, combinaison de facteurs biologiques, chimiques et physiques qui rend possible le transfert de gène par électroperméabilisation.



7.5 Figures du chapitre 7

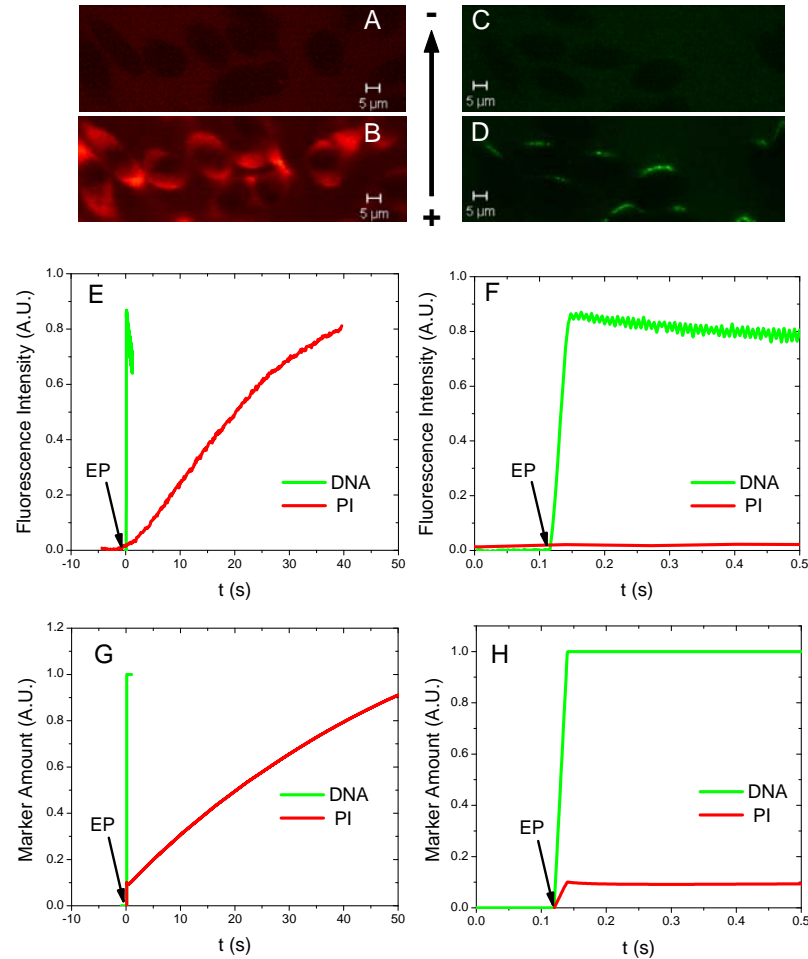


FIGURE 7.1: Résultats expérimentaux et prédictions théoriques pour l'entrée de PI et d'ADN dans des cellules CHO électroporées. **A, B** : Cellules en présence de PI et d'ADN avant électropulsion. Il n'y a clairement pas d'entrée, pour aucune des deux molécules. **C** : Entrée de PI après électropulsion. **D** : Interaction d'ADN au voisinage de la membrane, après électropulsion. **E** : Comportement aux temps longs de l'entrée de PI et d'ADN, mesurée par examen des intensités de fluorescence à l'intérieur des cellules. **F** : Mêmes données qu'en E sur une plus petite échelle de temps. **G** : Comportement aux temps longs de l'entrée de PI et d'ADN, prédite par le modèle d'électrodifusion. **H** : Mêmes données qu'en G sur une plus petite échelle de temps.

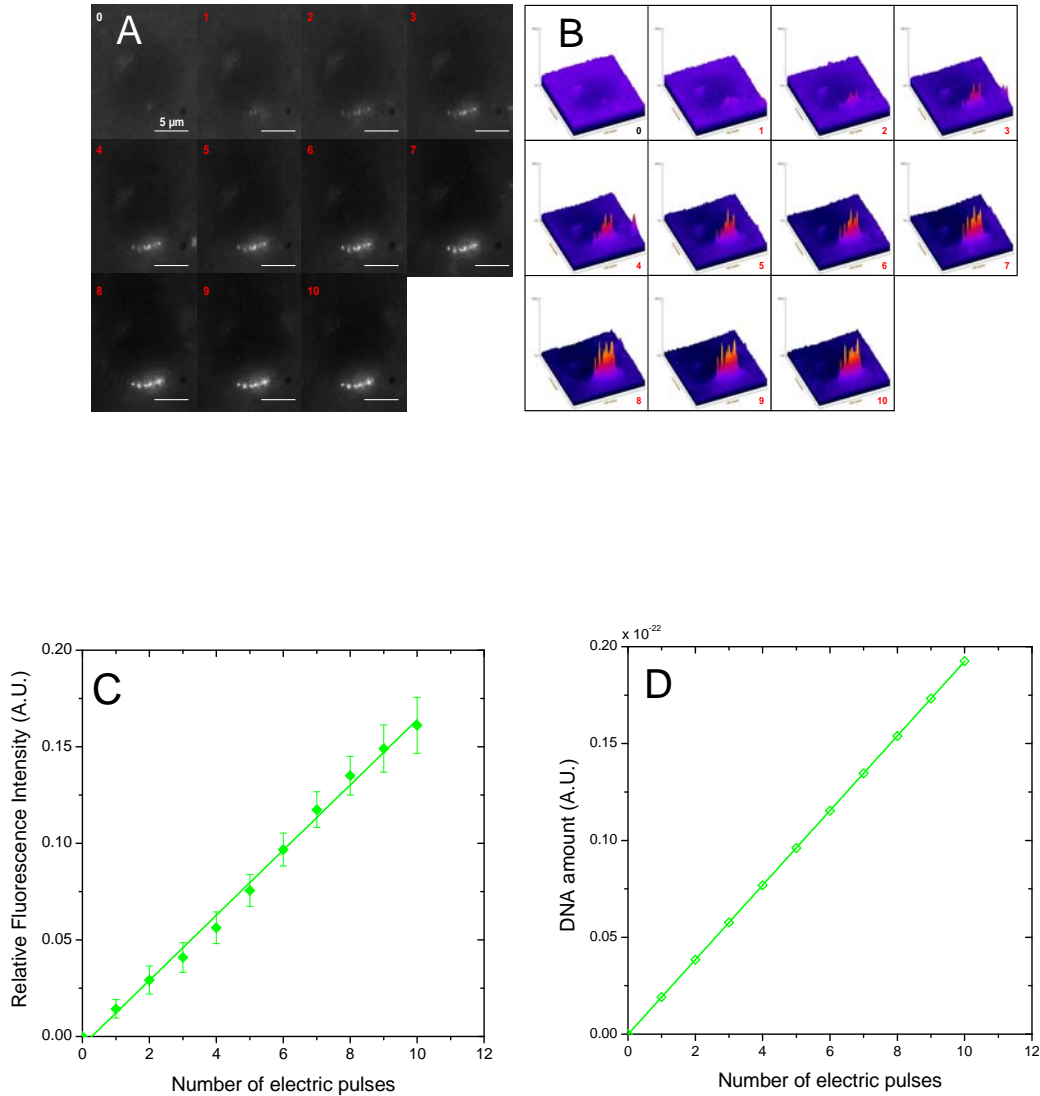
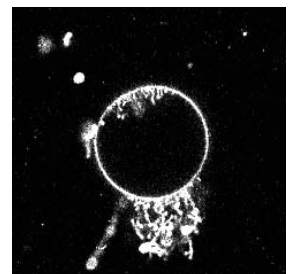


FIGURE 7.2: Évolution de la fluorescence de l'ADN marqué, au niveau des sites d'interaction, en fonction du nombre d'impulsions. **A** : Images brutes. **B** : Quantification de l'augmentation de fluorescence de l'ADN à partir des images en A. **C** : Augmentation de la fluorescence totale de l'ADN en fonction du nombre d'impulsions appliquées, mesure expérimentale. **D** : Augmentation de la fluorescence totale de l'ADN en fonction du nombre d'impulsions appliquées, prédiction théorique.



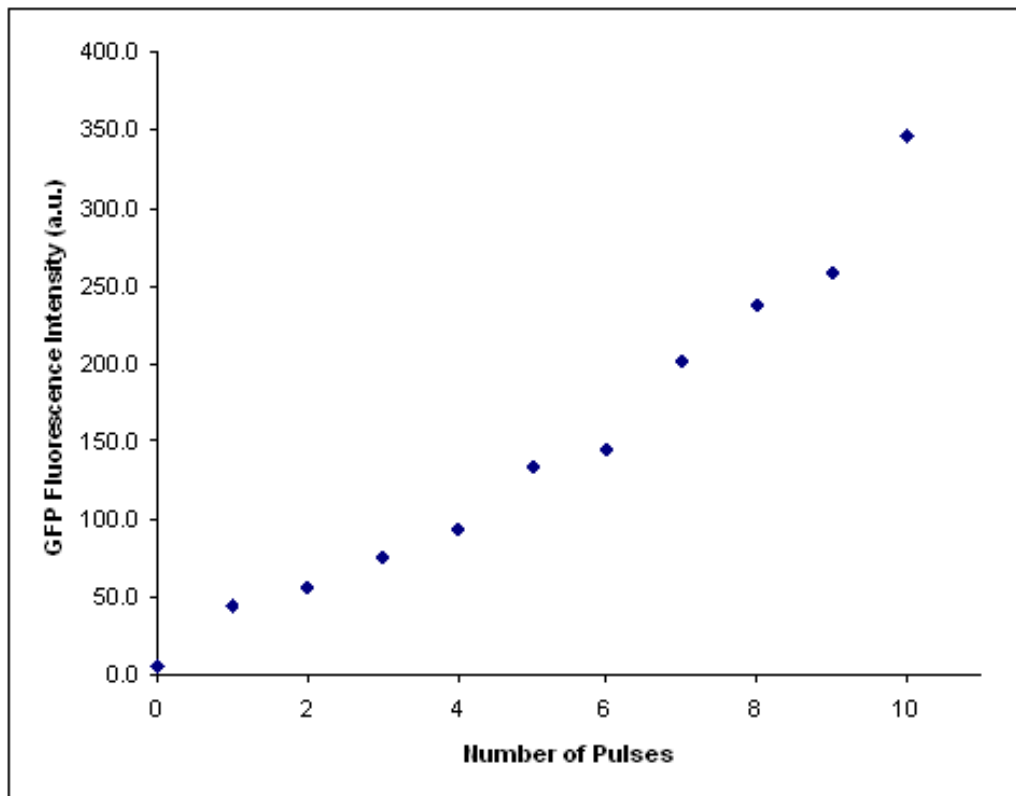


FIGURE 7.3: Niveau d'expression de la GFP 24 heures après l'électrotransfection des cellules, en fonction du nombre d'impulsions appliquées.

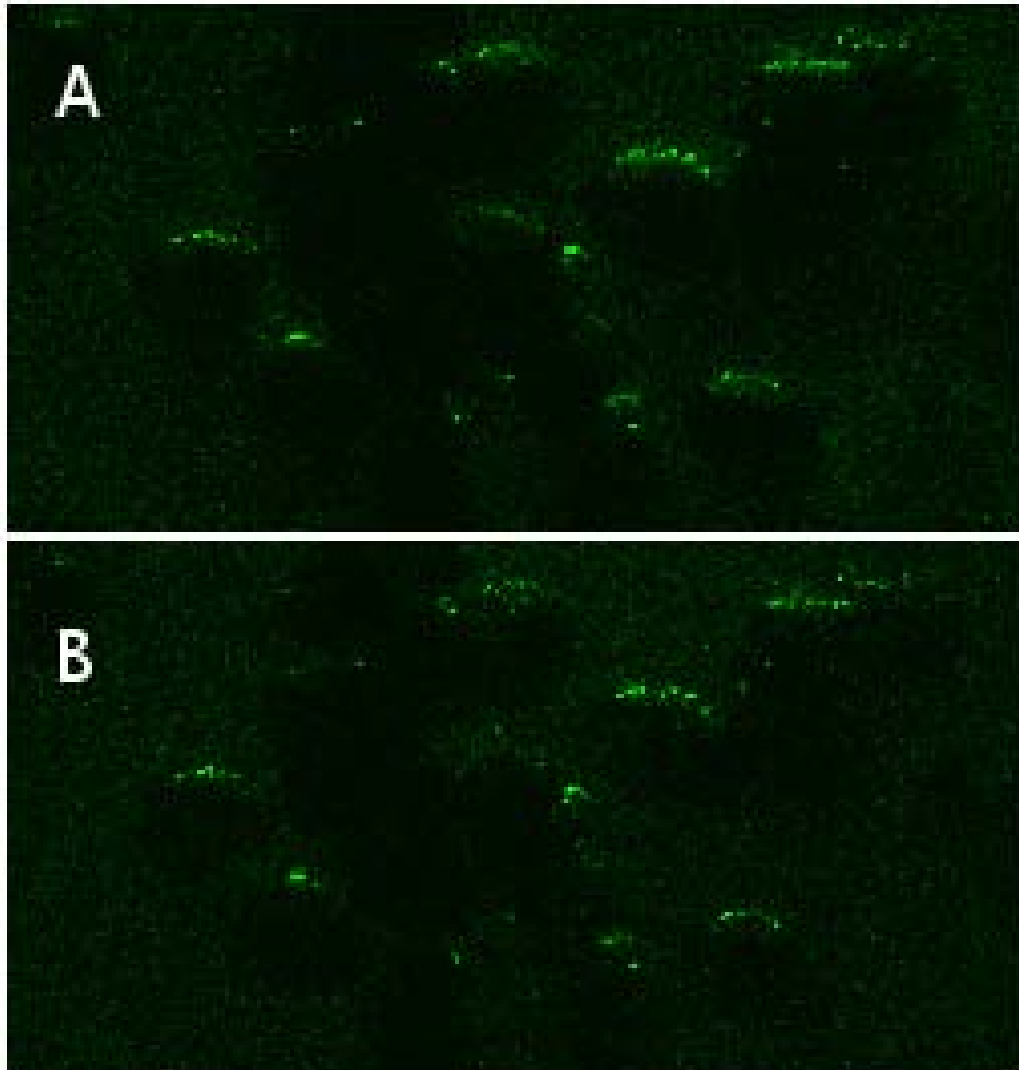
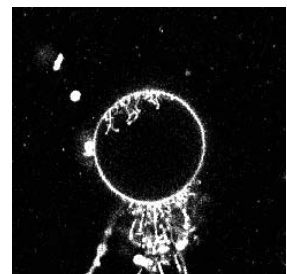
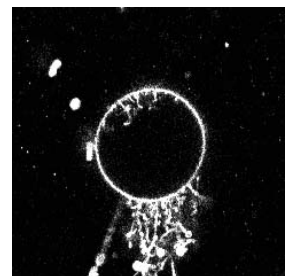


FIGURE 7.4: Cellules CHO traitées à la Latrunculine A et électropéabilisées en présence d'ADN. Les images ont été prises quelques secondes après l'électropéabilisation (A), et 10 minutes après (B).



Troisième partie

Conclusions



Chapitre 8

Bilan

Je vais dans ce chapitre récapituler brièvement les résultats présentés dans les chapitres 4 à 7, qui ont déjà été discutés dans les sections correspondantes. J'essaierai aussi d'expliquer en quoi ma thèse a permis d'améliorer notre compréhension de l'électroperméabilisation, ou du moins l'électroperméabilisation de vésicules géantes.

Nous avons vu tout d'abord que l'électropulsation de GUVs induisait une diminution de taille des vésicules, accompagnée de l'éjection de lipides. Cette éjection mettait en jeu des structures constituées de plusieurs lipides (petites vésicules, tubules) et non des molécules uniques. L'analyse quantitative du rétrécissement des liposomes à la lumière d'une simple théorie a permis de mesurer la quantité de membrane perdue par impulsion, et une différence de potentiel transmembranaire critique $\Delta\psi_c$ requise pour observer cette perte de lipides. Ce potentiel critique $\Delta\psi_c$ est vraisemblablement plus élevé que le seuil de perméabilisation minimal nécessaire pour observer le passage d'ions à travers la membrane.

Nous avons ensuite étudié le comportement de GUVs soumis à des impulsions longues à l'aide d'une caméra rapide, à des cadences de 5000–20000 images par seconde. Grâce à ces observations, nous avons établi que des macropores apparaissaient majoritairement sur l'hémisphère de la vésicule face à la cathode, la plupart du temps après l'impulsion. En suivant la dynamique de fermeture de ces pores, nous avons pu mesurer les tensions de bord de membranes de diverses compositions, et de manière surprenante nous avons trouvé que l'addition de 17 mol % de DOPE à des membranes de DOPC abaissait cette tension de bord. L'examen de la taille maximale des pores nous a aussi permis de mesurer la stabilité des bicouches, en dérivant un potentiel critique de poration noté là encore $\Delta\psi_c$. Ce potentiel est du même ordre que celui mesuré par suivi de la

décroissance de taille, mais légèrement plus élevé. Malgré la notation similaire, ces deux quantités ne correspondent pas nécessairement à la même grandeur et, répétons-le, ne sont pas des valeurs de potentiel minimales permettant d'observer la perméabilisation, mais des valeurs de potentiel minimales pour observer les phénomènes de poration ou de diminution de taille.

Après ceci, nous avons effectué des expériences d'électrotransfert d'ADN plasmidique (grosse molécule d'environ 3 MDa) dans des GUVs. Nous avons été en mesure de quantifier, par microscopie confocale, la quantité d'ADN introduite dans des GUVs de tailles diverses en fonction de la durée et de l'amplitude des impulsions. Nous avons trouvé que les quantités mesurées étaient en accord avec nos prédictions fondées sur une entrée de nature électrophorétique. Nous avons aussi observé que cette méthode de transfert était très efficace car elle permettait d'obtenir dans les liposomes des concentrations d'ADN supérieures aux concentrations dans le milieu externe. Une analyse de la diminution de taille des vésicules transférées a montré que le potentiel critique pour observer la perte de lipides était presque diminué d'un facteur 2 en présence d'ADN. Ceci suggère que la présence d'ADN contribue à déstabiliser les membranes.

Toutes ces expériences, réalisées principalement avec des lipides PC, nous permettent d'avancer le scénario suivant pour l'électroperméabilisation de vésicules géantes. Le champ électrique, pendant qu'il est appliqué, induit la formation de plusieurs défauts dans la membrane, suffisamment grands face à la cathode pour laisser passer des macromolécules, mais de taille plus petite face à l'anode. Une fois l'impulsion électrique achevée, ces défauts se rassemblent ou coalescent pour former un macropore, dans la majorité des cas face à la cathode. Pendant les quelques centaines de microsecondes suivant l'impulsion, au moment de la formation du macropore, des lipides sont éjectés de la membrane. Cette éjection qui conduit à une diminution de taille des GUVs se fait sous forme de structures collectives : des petites vésicules ou agrégats de lipides et des tubules. Les tubules étaient la plupart du temps créés face à l'anode. Ceci souligne encore une fois l'asymétrie entre les deux hémisphères des liposomes, déjà rapportée dans [Tekle 01] ou même dans [Tekle 94] sur des cellules vivantes. Le macropore face à la cathode, et les autres défauts éventuellement formés sur l'autre pôle se referment ensuite en quelques dizaines ou centaines de millisecondes, et la bicouche retrouve son intégrité.

Enfin nous avons simulé, par la résolution d'équations aux dérivées partielles pour le potentiel électrique et la concentration de molécules d'intérêt, l'électrotransfert de molécules chargées dans des cellules. Nos résul-

tats qualitatifs sont en accord avec les observations expérimentales :

- les petites molécules comme l'iodure de propidium, ayant sensiblement le même coefficient de diffusion (et donc une mobilité électrophorétique similaire) en solution et dans le cytoplasme, semblent capables de traverser librement la membrane perméabilisée, même après les impulsions ;
- les grosses molécules comme de l'ADN plasmidique, dont le coefficient de diffusion est diminué d'au moins un facteur mille une fois dans la cellule, pénètrent majoritairement dans la cellule pendant l'impulsion, et restent ensuite quasi-immobiles dans le voisinage de la membrane.

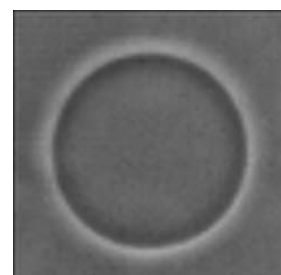
Nous pensons donc que le phénomène d'accumulation d'ADN au niveau de la membrane observé expérimentalement a plutôt une origine physique, et nous spéculons que l'ADN peut en fait former des agrégats de taille relativement importante et très peu mobiles, mais capables de protéger certains plasmides de la dégradation enzymatique.

Chapitre 9

Perspectives

Il reste vraisemblablement beaucoup de phénomènes intéressants à découvrir concernant l'électroperméabilisation de vésicules géantes. Le travail sur de tels objets a un double avantage. Non seulement il permet de nous aider à comprendre l'électroperméabilisation de cellules vivantes, mais il peut aussi donner lieu à des résultats plus généraux sur les bicouches lipidiques et aider à développer des méthodes de mesure de certaines propriétés physiques. Il est difficile de donner une direction de recherche *a priori*, tant de paramètres pouvant être variés. Rappelons par exemple qu'il existe bien d'autres lipides que les PC, et que les mélanges de type lipide à courte chaîne:lipide à longue chaîne:cholesterol montrent généralement des comportements intéressants.

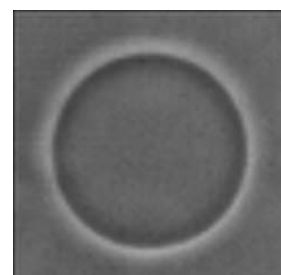
Le phénomène le plus frappant remarqué dans ces travaux est l'asymétrie entre les pôles des GUVs face à l'anode et face à la cathode. Arriver à la comprendre et à déterminer sa cause présente un défi intéressant. J'ai essayé de la mettre une fois encore en évidence en tentant d'électrotransférer des molécules chargées positivement (des poly-lysines) dans des GUVs, *ie* d'attaquer la membrane par l'autre hémisphère, mais sans succès. Soit je ne parvenais pas à voir les molécules, soit elles détruisaient les liposomes. J'ai aussi tenté de modifier le potentiel ζ des vésicules, initialement légèrement négatif, par l'addition de lipides cationiques DOTAP. Là encore, mes vésicules avaient des problèmes de stabilité. Je n'ai toutefois pas pu faire autant de tentatives que je le souhaitais, donc il pourrait être judicieux d'approfondir ces investigations. Outre les dipôles des têtes lipidiques qui sur un hémisphère sont bien orientés avec le champ électrique côté feuillet interne, et sur l'autre côté feuillet externe, les ions en solution créent aussi une asymétrie entre les deux pôles. Je n'ai pas étudié leur influence, mais j'imagine que ce pourrait être porteur.



Si le temps nous le permet, nous allons tenter maintenant de développer des modèles microscopiques pour l'électroperméabilisation de bicouches lipidiques. Il est possible d'explorer par des simulations Monte Carlo de type spins sur réseau les configurations de membranes soumises à un champ électrique. On espère ainsi pouvoir parvenir à une description cohérente de l'état et de la dynamique d'une membrane électroperméabilisée.

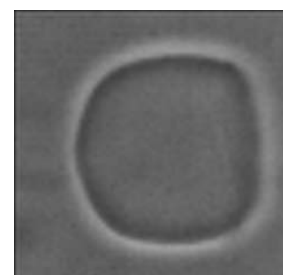
Bibliographie

- Abidor 93. I.G. Abidor, A.I. Barbul, D.V. Zhelev, P. Doinov, I.N. Bandrina, E.M. Osipova & S.I. Sukharev. *Electrical properties of cell pellets and cell electrofusion in a centrifuge*. Biochem. Biophys. Acta, vol. 1152, pages 207–18, 1993.
- Abidor 94. I.G. Abidor, L.H. Li & S.W. Hui. *Studies of cell pellets: II Osmotic properties, electroporation, and related phenomena: membrane interactions*. Biophys. J., vol. 67, pages 427–35, 1994.
- Akaneya 05. Y. Akaneya, B. Jiang & T. Tsumoto. *RNAi-induced gene silencing by local electroporation in targeting brain region*. J. Neurophysiol., vol. 93, pages 594–602, 2005.
- Angelova 86. M. I. Angelova & D. S. Dimitrov. *Liposome electroformation*. Faraday Discuss. Chem. Soc., vol. 81, pages 303–311, 1986.
- Angelova 99. M. I. Angelova & I. Tsoneva. *Interactions of DNA with giant liposomes*. Chem. Phys. Lip., vol. 101, pages 123–137, 1999.
- Antonov 80. V.F. Antonov, W. Petrov, A.A. Molnar, D.A. Predvoditelev & A.S. Ivanov. *Appearance of single-ion channels in unmodified lipid bilayer-membranes at the phase transition temperature*. Nature, vol. 283, pages 585–586, 1980.
- Aranda-Espinoza 08. S. Aranda-Espinoza, K.A. Riske, R. Lipowsky & R. Dimova. *Morphological transitions of vesicles induced by alternating electric fields*. Biophys. J., vol. 95, pages L19–L21, 2008.



- Ayuyan 06. A. G. Ayuyan & F. S. Cohen. *Lipid peroxides promote large rafts: Effects of excitation of probes in fluorescence microscopy and electrochemical reactions during vesicle formation*. *Biophys. J.*, vol. 91, no. 6, pages 2172–2183, 2006.
- Belehradek 93. M. Belehradek, C. Domenge, B. Luboinski, S. Orłowski, J. Belehradek Jr. & L.M. Mir. *Electrochemotherapy, a new antitumor treatment. First clinical phase I-II trial*. *Cancer*, vol. 72, pages 3694–3700, 1993.
- Bloomfield 99. V.A. Bloomfield, D.M. Crothers & I. Tinoco. *Nucleic acids: structures, properties and functions*. University Science Books, Sausalito, 1999.
- Boal 02. D. Boal. *Mechanics of the cell*. Cambridge University Press, New York, 2002.
- Böckmann 08. R.A. Böckmann, B.L. de Groot, S. Kakorin, E. Neumann & H. Grubmüller. *Kinetics, statistics and energetics of lipid membrane electroporation studied by molecular dynamics simulations*. *Biophys. J.*, vol. 95, pages 1837–1850, 2008.
- Brochard-Wyart 00. F. Brochard-Wyart, P.G. de Gennes & O. Sandre. *Transient pores in stretched vesicles: role of leak-out*. *Physica A*, vol. 278, pages 32–51, 2000.
- Carr 93. C.M. Carr & P.S. Kim. *A spring-loaded mechanism for the conformational change of influenza hemagglutinin*. *Cell*, vol. 73, pages 823–832, 1993.
- Chang 90. D. C. Chang & T. S. Reese. *Changes in membrane-structure induced by electroporation as revealed by rapid-freezing electron-microscopy*. *Biophys. J.*, vol. 58, no. 1, pages 1–12, 1990.
- Chernomordik 85. L.V. Chernomordik, M.M. Kozlov, G.B. Melikyan, I.G. Abidor, V.S. Markin & Y.A. Chizmadz-

- hev. *The shape of lipid molecules and monolayer membrane fusion*. Biochim. Biophys. Acta, vol. 812, pages 641–655, 1985.
- Chernomordik 90. L. V. Chernomordik, A. V. Sokolov & V. G. Budker. *Electrostimulated uptake of DNA by liposomes*. Biochim. Biophys. Acta, vol. 1024, pages 179–183, 1990.
- Chernomordik 03. L.V. Chernomordik & M.M. Kozlov. *Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes*. Annu. Rev. Biochem., vol. 72, pages 175–207, 2003.
- Chiantia 06. S. Chiantia, J. Ries, N. Kahya & P. Schwille. *Combined AFM and two-focus SFCS study of raft-exhibiting model membranes*. ChemPhysChem, vol. 7, pages 2409–2418, 2006.
- Chiu 99. D.T. Chiu, C.F. Wilson, F. Ryttsen, A. Stromberg, C. Farre, A. Karlsson, S. Nordholm, A. Gaggar, B.P. Modi, A. Moscho, R.A. Garza-Lopez, O. Orwar & R.N. Zare. *Chemical transformations in individual ultrasmall biomimetic containers*. Science, vol. 283, pages 1892–1895, 1999.
- Daud 08. A.I. Daud, R.C. DeConti, S. Andrews, P. Urbas, A.I. Riker, V.K. Sondack, P.N. Munster, D.M. Sullivan, K.E. Ugen, I.J. Messina & R. Heller. *Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma*. J. Clin. Oncol., vol. 26, pages 5896–5903, 2008.
- Dauty 05. E. Dauty & A. S. Verkman. *Actin cytoskeleton as the principal determinant of size-dependent DNA mobility in cytoplasm*. J. Biol. Chem., vol. 280, pages 7823–7828, 2005.
- de Joannis 06. J. de Joannis, F. Y. Jiang & J. T. Kindt. *Coarse-grained model simulations of mixed-lipid systems: composition and line tension of a stabilized bilayer edge*. Langmuir, vol. 22, pages 998–1005, 2006.



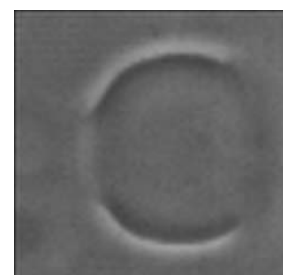
- Debrégeas 95. G. Debrégeas, P. Martin & F. Brochard-Wyart. *Viscous bursting of suspended films*. Phys. Rev. Lett., vol. 75, pages 3886–3889, 1995.
- Dimova 06. R. Dimova, S. Aranda, N. Bezlyepkina, V. Nikolov, K. A. Riske & R. Lipowsky. *A practical guide to giant vesicles. Probing the membrane nanoregime via optical microscopy*. J. Phys.: Condens. Matter, vol. 18, pages S1151–S1176, 2006.
- Dimova 07. R. Dimova, K. A. Riske, S. Aranda, N. Bezlyepkina, R. L. Knorr & R. Lipowsky. *Giant vesicles in electric fields*. Soft Matter, vol. 3, pages 817–827, 2007.
- Duwe 90. H. P. Duwe, J. Kaes & E. Sackmann. *Bending Elastic-Moduli of Lipid Bilayers - Modulation by Solutes*. J. Phys. IV, vol. 51, no. 10, pages 945–962, 1990.
- Eitzen 03. G. Eitzen. *Actin remodeling to facilitate membrane fusion*. Biochim. Biophys. Acta, vol. 1641, pages 175–181, 2003.
- Ellens 86. H. Ellens, J. Bentz & F. C. Szoka. *Fusion of phosphatidylethanolamine-containing liposomes and mechanism of the L α -H III phase-transition*. Biochemistry, vol. 25, no. 14, pages 4141–4147, 1986.
- Escoffre 09. J.-M. Escoffre, T. Portet, L. Wasungu, J. Teissié, D. S. Dean & M.-P. Rols. *What is (still not) known of the mechanism by which electroporation mediates gene transfer and expression in cells and tissues*. Mol. Biotechnol., vol. 41, pages 286–295, 2009.
- Estes 05. D.J. Estes & M. Mayer. *Giant liposomes in physiological buffer using electroformation in a flow chamber*. Biochim. Biophys. Acta, vol. 1712, pages 152–160, 2005.

- Evans 90. E. Evans & W. Rawicz. *Entropy-Driven Tension and Bending Elasticity in Condensed-Fluid Membranes*. Phys. Rev. Lett., vol. 64, no. 17, pages 2094-2097, 1990.
- Fournier 09. D. Fournier, N. Khalifat, N. Puff & M.I. Angelova. *Chemically triggered ejection of membrane tubules controlled by intermonolayer friction*. Phys. Rev. Lett., vol. 102, page 18102, 2009.
- Fromherz 86. P. Fromherz, C. Röcker & D. Ruppel. *From discoid micelles to spherical vesicles; the concept of edge activity*. Faraday Discuss., vol. 81, pages 39-48, 1986.
- Gabriel 99. B. Gabriel & J. Teissié. *Time courses of mammalian cell electropermeabilization observed by millisecond imaging of membrane property changes during the pulse*. Biophys. J., vol. 76, pages 2158-2165, 1999.
- García-Sáez 07. A. J. García-Sáez, S. Chiantia, J. Salgado & P. Schwille. *Pore formation by a Bax-derived peptide: effect on the line tension of the membrane probed by AFM*. Biophys. J., vol. 93, pages 103-112, 2007.
- Genco 93. I. Genco, A. Gliozzi, A. Relini, M. Robello & E. Scalas. *Electroporation in symmetric and asymmetric membranes*. Biochim. Biophys. Acta, vol. 1149, pages 10-18, 1993.
- Glass 96. L.F. Glass, N.A. Fenske, M. Jaroszeski, R. Perrott, D.T. Harvey, D.S. Reintgen & R. Heller. *Bleomycin-mediated electrochemotherapy of basal cell carcinoma*. J. Am. Acad. Dermatol., vol. 34, pages 82-86, 1996.
- Glass 97. L.F. Glass, M. Jaroszeski, R. Gilbert, D.S. Reintgen & R. Heller. *Intralesional bleomycin-mediated electrochemotherapy in 20 patients with basal cell carcinoma*. J. Am. Acad. Dermatol., vol. 37, pages 596-599, 1997.



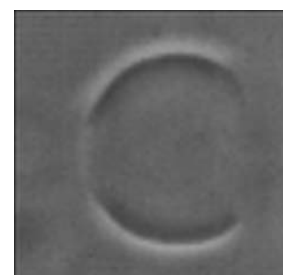
- Golzio 98. M. Golzio, M.P. Mora, C. Raynaud, C. Delteil, J. Teissié & M.-P. Rols. *Control by osmotic pressure of voltage-induced permeabilization and gene transfer in mammalian cells*. Biophys. J., vol. 74, pages 3015–22, 1998.
- Golzio 02. M. Golzio, J. Teissié & M.-P. Rols. *Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 99, pages 1292–7, 2002.
- Gracia 10. R. S. Gracia, N. Bezlyepkina, R. L. Knorr, R. Lipowsky & R. Dimova. *Effect of cholesterol on the rigidity of saturated and unsaturated membranes: fluctuation and electrodeformation analysis of giant vesicles*. Soft Matter, vol. 6, no. 7, pages 1472–1482, 2010.
- Haluska 06. C. K. Haluska, K. A. Riske, V. Marchi-Artzner, J.-M. Lehn, R. Lipowsky & R. Dimova. *Time scales of membrane fusion revealed by direct imaging of vesicle fusion with high temporal resolution*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 103, pages 15841–15846, 2006.
- Harbich 79. W. Harbich & W. Helfrich. *Alignment and opening of giant lecithin vesicles by electric fields*. Z. Naturforsch., vol. 34a, pages 1063–1065, 1979.
- Hay 07. J.C. Hay. *Calcium: a fundamental regulator of intracellular membrane fusion?* EMBO Rep., vol. 8, pages 236–240, 2007.
- Helfrich 73. W. Helfrich. *Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments*. Z. Naturforsch. C, vol. 28, pages 693–703, 1973.
- Heller 07. L.C. Heller, M.J. Jaroszeski, D. Coppola, A.N. McCray, J. Hickey & R. Heller. *Optimization of cutaneous electrically mediated plasmid DNA delivery using novel electrodes*. Gene Ther., vol. 14, pages 1275–1280, 2007.

- Helm 92. C.A. Helm, J.N. Israelachvili & P.M. McGuiggan. *Role of hydrophobic forces in bilayer adhesion and fusion*. *Biochemistry*, vol. 31, pages 1794–1805, 1992.
- Henriksen 06. J. Henriksen, A. C. Rowat, E. Brief, Y. W. Hsueh, J. L. Thewalt, M. J. Zuckermann & J. H. Ipsen. *Universal behavior of membranes with sterols*. *Biophys. J.*, vol. 90, no. 5, pages 1639–1649, 2006.
- Horger 09. K.S. Horger, D.J. Estes DJ, R. Capone R & M. Mayer. *Films of agarose enable rapid formation of giant liposomes in solutions of physiologic ionic strength*. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 131, pages 1810–1819, 2009.
- Israelachvili 80. J.N. Israelachvili, S. Marcelja & R.G. Horn. *Physical principles of membrane organization*. *Rev. Biophysics*, vol. 13, pages 121–200, 1980.
- Israelachvili 00. J. Israelachvili. *Intermolecular and surface forces*. Academic Press, San Diego, second edition, 2000.
- Jackson 75. J. D. Jackson. *Classical electrodynamics*. John Wiley & Sons, second edition, 1975.
- Jeremic 04. A. Jeremic, M. Kelly, J.A. Cho, S.J. Cho, J.K.H. Horber & B.P. Jena. *Calcium drives fusion of SNARE-apposed bilayers*. *Cell. Biol. Int.*, vol. 28, pages 19–31, 2004.
- Jiang 04. F. Y. Jiang, Y. Bouret & J. T. Kindt. *Molecular dynamics simulations of the lipid bilayer edge*. *Biophys. J.*, vol. 87, pages 182–192, 2004.
- Jiang 07. Y. Jiang & J. T. Kindt. *Simulations of edge behavior in a mixed-lipid bilayer: fluctuation analysis*. *J. Chem. Phys.*, vol. 126, page 045105, 2007.
- Karatekin 03. E. Karatekin, O. Sandre, H. Guitouni, N. Borghi, P.-H. Puech & F. Brochard-Wyart. *Cascade of transient pores in giant vesicles: line tension*



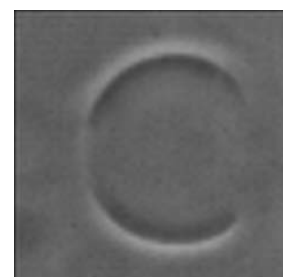
- and transport*. Biophys. J., vol. 84, pages 1734–1749, 2003.
- Khalifat 08. N. Khalifat, N. Puff, S. Bonneau, J.-B. Fournier & M.I. Angelova. *Membrane deformation under local pH gradient : mimicking mitochondrial cristae dynamics*. Biophys. J., vol. 95, pages 4924–4933, 2008.
- Kielian 06. M. Kielian & F.A. Rey. *Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin*. Nat. Rev. Microbiol., vol. 4, pages 67–76, 2006.
- Kinosita 77. K. Kinosita & T.Y. Tsong. *Formation and resealing of pores of controlled sizes in human erythrocyte membrane*. Nature, vol. 268, pages 438–41, 1977.
- Klenchin 91. V.A. Klenchin, S.I. Sukharev, S.M. Serov, L.V. Chernomordik & Y.A. Chizmadzhev. *Electrically induced DNA uptake by cells is a fast process involving DNA electrophoresis*. Biophys. J., vol. 60, pages 804–811, 1991.
- Kozlovsky 02. Y. Kozlovsky & M.M. Kozlov. *Stalk model of membrane fusion: solution of energy crisis*. Biophys. J., vol. 82, pages 882–895, 2002.
- Kummrow 91. M. Kummrow & W. Helfrich. *Deformation of giant lipid vesicles by electric fields*. Phys. Rev. A, vol. 44, pages 8356–60, 1991.
- Landau 75. L.D. Landau & E.M. Lifshitz. *Electrodynamics of continuous media*. Pergamon Press, Oxford, 1975.
- Lentz 94. B.R. Lentz. *Polymer-induced membrane fusion: potential mechanism and relation to cell fusion events*. Chem. Phys. Lip., vol. 73, pages 91–106, 1994.
- Lentz 00. B.R. Lentz, V. Malinin, M.E. Haque & K. Evans. *Protein machines and lipid assemblies: current*

- views of cell membrane fusion.* Curr. Opin. Struct. Biol., vol. 10, pages 607–615, 2000.
- Leontiadou 04. H. Leontiadou, A. E. Mark & S. J. Marrink. *Molecular dynamics simulations of hydrophilic pores in lipid bilayers.* Biophys. J., vol. 86, pages 2156–2164, 2004.
- Leontiadou 07. H. Leontiadou, A. E. Mark & S. J. Marrink. *Ion transport across transmembrane pores.* Biophys. J., vol. 92, pages 4209–4215, 2007.
- Lewis 93. R. N. A. H. Lewis & R. N. McElhaney. *Calorimetric and spectroscopic studies of the polymorphic phase-behavior of a homologous series of n-saturated 1,2-diacyl phosphatidylethanolamines.* Biophys. J., vol. 64, no. 4, pages 1081–1096, 1993.
- Litster 75. J. D. Litster. *Stability of lipid bilayers and red blood cell membranes.* Phys. Lett., vol. 53A, pages 193–194, 1975.
- Loi 02. Simona Loi, Gexiao Sun, Volker Franz & Hans-Jurgen Butt. *Rupture of molecular thin films observed in atomic force microscopy. II. Experiment.* Phys. Rev. E, vol. 66, no. 3 Pt 1, page 031602, 2002.
- Lopez 88. A. Lopez, M.-P. Rols & J. Teissié. *P-31 NMR analysis of membrane phospholipid organization in viable, reversibly electropermeabilized Chinese hamster ovary cells.* Biochemistry, vol. 27, pages 1222–1228, 1988.
- Luisi 00. P.L. Luisi & P. Walde. *Giant vesicles, volume 6 of Perspectives in supramolecular chemistry.* John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 2000.
- Lukacs 00. G. L. Lukacs, P. Haggie, O. Seksek, Lechardeur D., Freedman N. & Verkman A. S. *Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus.* J. Biol. Chem., vol. 275, pages 1625–1629, 2000.



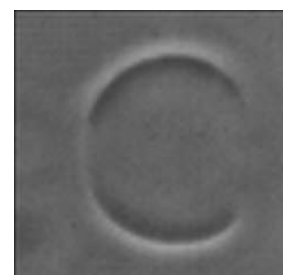
- Lurquin 00. P. F. Lurquin & K. Athanasiou. *Electric field-mediated DNA encapsulation into large liposomes*. Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 267, pages 838–841, 2000.
- Marsh 06. D. Marsh. *Elastic curvature constants of lipid monolayers and bilayers*. Chem. Phys. Lip., vol. 144, pages 146–159, 2006.
- Marszalek 95. P. Marszalek & T.Y. Tsong. *Cell fission and formation of mini cell bodies by high frequency alternating electric electric field*. Biophys. J., vol. 68, pages 1218–21, 1995.
- May 00. S. May. *A molecular model for the line tension of lipid membranes*. Eur. Phys. J. E, vol. 3, pages 37–44, 2000.
- Meleard 97. P. Meleard, C. Gerbeaud, T. Pott, L. FernandezPueente, I. Bivas, M. D. Mitov, J. Dufourcq & P. Bothorel. *Bending elasticities of model membranes: Influences of temperature and sterol content*. Biophys. J., vol. 72, no. 6, pages 2616–2629, 1997.
- Melikyan 90. G. B. Melikyan, N. S. Matinyan & V. B. Arakelian. *The influence of gangliosides on the hydrophilic pore edge line tension and monolayer fusion of lipid membranes*. Biochim. Biophys. Acta, vol. 1030, pages 11–15, 1990.
- Mir 91. L.M. Mir, S. Orłowski, J. Belehradec & C. Paoletti. *Electrochemotherapy potentiation of antitumour effect of bleomycin by local electric pulses*. Eur. J. Cancer, vol. 27, pages 68–72, 1991.
- Mir 97. L.M. Mir, P. Devauchelle, F. Quintin-Colonna, F. Delisle, S. Doliger, D. Fradelizi, J. Belehradec Jr & S. Orłowski. *First clinical trial of cat soft-tissue sarcomas treatment by electrochemotherapy*. Br. J. Cancer, vol. 76, pages 1617–1622, 1997.

- Mir 99. L.M. Mir, M.F. Bureau, J. Gehl, R. Rangara, D. Rouy, J.M. Caillaud, P. Delaere, D. Branellec, B. Schwartz & D. Scherman. *High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 96, pages 4262–4267, 1999.
- Mitov 93. M.D. Mitov, P. Méléard, M. Winterhalter, M.I. Angelova & P. Bothorel. *Electric-field-dependent thermal fluctuations of giant vesicles*. Phys. Rev. E, vol. 48, pages 628–631, 1993.
- Moldovan 07. D. Moldovan, D. Pinisetty & R. V. Devireddy. *Molecular dynamics simulation of pore growth in lipid bilayer membranes in the presence of edge-active agents*. Appl. Phys. Lett., vol. 91, page 204104, 2007.
- Montes 07. L.-R. Montes, A. Alonso, F.M. Goni FM & L.A. Bagatolli. *Giant unilamellar vesicles electroformed from native membranes and organic lipid mixtures under physiological conditions*. Biophys. J., vol. 93, pages 3548–3554, 2007.
- Moroz 97. J.D. Moroz & P. Nelson. *Dynamically stabilized pores in bilayer membranes*. Biophys. J., vol. 72, pages 2211–2216, 1997.
- Mouritsen 05. O. G. Mouritsen. *Life - as a matter of fat*. Springer, The Frontiers Collection, 2005.
- Nagle 00. J. F. Nagle & S. Tristram-Nagle. *Structure of lipid bilayers*. Biochim. Biophys. Acta, vol. 1469, no. 3, pages 159–195, 2000.
- Needham 89. D. Needham & R. M. Hochmuth. *Electromechanical permeabilization of lipid vesicles - Role of membrane tension and compressibility*. Biophys. J., vol. 55, pages 1001–1009, 1989.
- Neumann 72. E. Neumann & K. Rosenheck. *Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes*. J. Membr. Biol., vol. 10, pages 279–90, 1972.



- Neumann 89. E. Neumann, A. E. Sowers & C. A. Jordan. *Electroporation and electrofusion in cell biology*. Plenum, New York, 1989.
- Newman 07. C. M. H. Newman & T. Bettinger. *Gene therapy progress and prospects: ultrasound for gene transfer*. *Gene Ther.*, vol. 14, pages 465–475, 2007.
- Olbrich 00. K. Olbrich, W. Rawicz, D. Needham & E. Evans. *Water permeability and mechanical strength of polyunsaturated lipid bilayers*. *Biophys. J.*, vol. 79, no. 1, pages 321–327, 2000.
- Pabst 07. G. Pabst, A. Hodzic, J. Strancar, S. Danner, M. Rappolt & P. Laggner. *Rigidification of neutral lipid bilayers in the presence of salts*. *Biophys. J.*, vol. 93, no. 8, pages 2688–2696, 2007.
- Pan 08a. J. Pan, S. Tristram-Nagle, N. Kucerka & J. F. Nagle. *Temperature dependence of structure, bending rigidity, and bilayer interactions of dioleoylphosphatidylcholine bilayers*. *Biophys. J.*, vol. 94, no. 1, pages 117–124, 2008.
- Pan 08b. J. J. Pan, T. T. Mills, S. Tristram-Nagle & J. F. Nagle. *Cholesterol perturbs lipid bilayers nonuniversally*. *Phys. Rev. Lett.*, vol. 100, no. 19, page 198103, 2008.
- Pan 09. J. J. Pan, S. Tristram-Nagle & J. F. Nagle. *Effect of cholesterol on structural and mechanical properties of membranes depends on lipid chain saturation*. *Phys. Rev. E*, vol. 80, no. 2, 2009.
- Parsegian 69. V.A. Parsegian. *Energy of an ion crossing of a low dielectric membrane: Solutions to four relevant electrostatic problems*. *Nature*, vol. 221, pages 844–846, 1969.
- Pasenkiewicz-Gierula 99. M. Pasenkiewicz-Gierula, Y. Takaoka, H. Miyagawa, K. Kitamura & A. Kusumi. *Charge pairing of headgroups in phosphatidylcholine mem-*

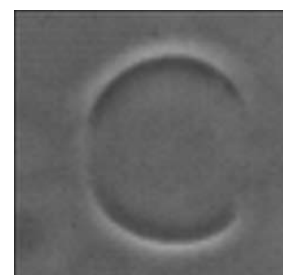
- branes: a molecular dynamics simulation study.* Biophys. J., vol. 76, pages 1228-1240, 1999.
- Pastushenko 79. V.F. Pastushenko, Y.A. Chizmadzhev & V.B. Arekelyan. *Electric breakdown of bilayer membranes II. Calculation of the membrane lifetime in the steady-state diffusion approximation.* Bioelectrochem. Bioenerg., vol. 6, pages 53-62, 1979.
- Peng 07. B. Peng, Y. Zhao, L. Xu & Y. Xu. *Electric pulses applied prior to intramuscular DNA vaccination greatly improve the vaccine immunogenicity.* Vaccine, vol. 25, pages 2064-2073, 2007.
- Phez 05. É. Phez. *Mécanisme de l'électrotransfert de gènes dans les cellules animales : Caractérisation des domaines d'interaction de l'ADN à la membrane et étude des conséquences intracellulaires.* PhD thesis, Université Paul Sabatier, 2005.
- Piknova 93. B. Piknova, E. Pérochon & J.-F. Tocanne. *Hydrophobic mismatch and long-range protein/lipid interactions in bacteriorhodopsin/phosphatidylcholine vesicles.* Eur. J. Biochem., vol. 218, pages 385-396, 1993.
- Pink 98. David A. Pink, Stew McNeil, Bonnie Quinn & Martin J. Zuckermann. *A model of hydrogen bond formation in phosphatidylethanolamine bilayers.* Biochim. Biophys. Acta, vol. 1368, no. 2, pages 289-305, 1998.
- Portet 09. T. Portet, F. Camps, J.-M. Escoffre, C. Favard, M.-P. Rols & D. S. Dean. *Visualization of membrane loss during the shrinkage of giant vesicles under electropulsation.* Biophys. J., vol. 96, pages 4109-4121, 2009.
- Portet 10. T. Portet, C. Mauroy, V. Démary, T. Houles, J.-M. Escoffre, D.S. Dean & M.-P. Rols. *Destabilizing Giant Liposomes with Electric Fields: An*



Overview of Current Applications. C.R. Physique, vol. in press, 2010.

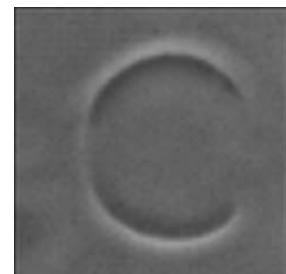
- Pott 08. T. Pott, H. Bouvrais & P. Méléard. *Giant unilamellar vesicle formation under physiologically relevant conditions*. Chem. Phys. Lip., vol. 154, pages 115–119, 2008.
- Powell 86. K.T. Powell & J.C. Weaver. *Transient aqueous pores in bilayer membranes : a statistical theory*. Bioelectrochem. Bioenerg., vol. 15, pages 211–27, 1986.
- Pringle 07. I.A. Pringle, G. McLachlan, D.D.S. Collie, S.G. Summer-Jones, A.E. Lawton, P. Tennant, A. Baker, C. Gordon, , R. Blundell, A. Varathalingam, L.A. Davies, R.A. Schmid, S.H. Cheng, D.J. Porteous, D.R. Gill & S.C. Hyde. *Electroporation enhances reporter gene expression following delivery of naked plasmid DNA to the lung*. J. Gene Med., vol. 9, pages 369–380, 2007.
- Pucihar 06. G. Pucihar, T. Kotnik, B. Valič & D. Miklavčič. *Numerical determination of transmembrane voltage induced on irregularly shaped cells*. Ann. Biomed. Eng., vol. 34, pages 642–652, 2006.
- Puech 03. P.-H. Puech, N. Borghi, E. Karatekin & F. Brochard-Wyart. *Line thermodynamics: adsorption at a membrane edge*. Phys. Rev. Lett., vol. 90, page 128304, 2003.
- Raffy 99. S. Raffy & J. Teissié. *Control of lipid membrane stability by cholesterol content*. Biophys. J., vol. 76, pages 2072–2080, 1999.
- Ridler 78. T. W. Ridler & S. Calvard. *Picture thresholding using an iterative selection method*. IEEE Trans. Syst. Man. Cybern., vol. 8, pages 630–632, 1978.
- Riske 05. K. A. Riske & R. Dimova. *Electro-deformation and poration of giant vesicles viewed with high*

- temporal resolution*. *Biophys. J.*, vol. 88, pages 1143-1155, 2005.
- Riske 06. K. A. Riske & R. Dimova. *Electric pulses induce cylindrical deformations on giant vesicles in salt solutions*. *Biophys. J.*, vol. 91, pages 1778-1786, 2006.
- Riske 09. K.A. Riske, R.L. Knorr & R. Dimova. *Bursting of charged multicomponent vesicles subjected to electric pulses*. *Soft Matter*, vol. 5, pages 1983-1986, 2009.
- Rodriguez 05. N. Rodriguez, F. Pincet & S. Cribier. *Giant vesicles formed by gentle hydration and electroformation: a comparison by fluorescence microscopy*. *Colloids Surf. B*, vol. 42, pages 125-130, 2005.
- Rodriguez 06. N. Rodriguez, S. Cribier & F. Pincet. *Transition from long- to short-lived transient pores in giant vesicles in an aqueous medium*. *Phys. Rev. E*, vol. 74, pages 061902.1-.10, 2006.
- Rols 89. M.P. Rols & J. Teissié. *Ionic-strength modulation of electrically induced permeabilization and associated fusion of mammalian cells*. *Eur. J. Biochem.*, vol. 179, pages 109-115, 1989.
- Rols 98. M.-P. Rols & J. Teissié. *Electropermeabilization of mammalian cells to macromolecules: control by pulse duration*. *Biophys. J.*, vol. 75, pages 1415-1423, 1998.
- Rols 02. M.-P. Rols, Y. Tamzali & J. Teissié. *Electrochemotherapy of horses. A preliminary clinical report*. *Bioelectrochemistry*, vol. 55, pages 101-105, 2002.
- Rols 06. M.-P. Rols. *Electropermeabilization, a physical method for the delivery of therapeutic molecules into cells*. *Biochim. Biophys. Acta.*, vol. 1758, pages 423-428, 2006.



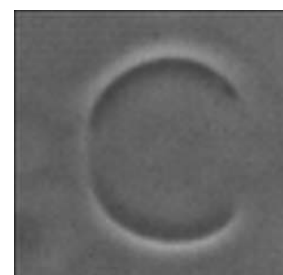
- Sandre 99. O. Sandre, L. Moreaux & F. Brochard-Wyart. *Dynamics of transient pores in stretched vesicles*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 96, pages 10591–10596, 1999.
- Sato 03. Y. Sato, S. M. Nomura & K. Yoshikawa. *Enhanced uptake of giant DNA in cell-sized liposomes*. Chem. Phys. Lett., vol. 380, pages 279–285, 2003.
- Schneider 84. M.B. Schneider, J.T. Jenkins & W.W. Webb. *Thermal fluctuations of large quasi-spherical bimolecular phospholipid-vesicles*. J. Phys., vol. 45, pages 1457–1472, 1984.
- Sersa 95. G. Sersa, M. Cemazar & D. Miklavcic. *Anti-tumor effectiveness of electrochemotherapy with cis-diamminedichloroplatinum(II) in mice*. Cancer Research, vol. 55, pages 3450–3455, 1995.
- Shechter 00. E Shechter. *Biochimie et biophysique des membranes - Aspects structuraux et fonctionnels*. Dunod, 2000.
- Simons 97. K. Simons & E. Ikonen. *Functional rafts in cell membranes*. Nature, vol. 387, pages 569–572, 1997.
- Singer 72. S.J. Singer & G.L. Nicolson. *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes*. Science, vol. 175, pages 720–731, 1972.
- Song 93. J. B. Song & R. E. Waugh. *Bending Rigidity of Sopc Membranes Containing Cholesterol*. Biophys. J., vol. 64, no. 6, pages 1967–1970, 1993.
- Sowers 86. A.E. Sowers. *A long-lived fusogenic state is induced in erythrocyte ghosts by electric pulses*. J. Cell. Biol., vol. 102, pages 1358–1362, 1986.
- Staykova 08. M. Staykova, R. Lipowsky & R. Dimova. *Membrane flow patterns in multicomponent giant vesicles induced by alternating electric fields*. Soft Matter, vol. 4, pages 2168–2171, 2008.

- Stellwagen 97. N. C. Stellwagen, C. Gelfi & P. G. Righetti. *The free solution mobility of DNA*. Biopolymers, vol. 42, pages 687–703, 1997.
- Sternberg 83. S. Sternberg. *Biomedical image processing*. IEEE Comput., vol. 16, pages 22–34, 1983.
- Sukharev 92. S.I. Sukharev, V.A. Klenchin, S.M. Serov, L.V. Chernomordik & Y.A. Chizmadzhev. *Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells. The effect of DNA interaction with electropores*. Biophys. J., vol. 63, pages 1320–1327, 1992.
- Tamm 03. L.K. Tamm, J. Crane & V. Kiessling. *Membrane fusion: a structural perspective on the interplay of lipids and proteins*. Curr. Opin. Struct. Biol., vol. 13, pages 453–466, 2003.
- Tarek 05. M. Tarek. *Membrane electroporation: A molecular dynamics simulation*. Biophys. J., vol. 88, pages 4045–4053, 2005.
- Taupin 75. C. Taupin, M. Dvolaitzky & C. Sauterey. *Osmotic pressure induced pores in phospholipid vesicles*. Biochem. USA, vol. 14, pages 4771–4775, 1975.
- Teissié 86. J. Teissié & M.P. Rols. *Fusion of mammalian cells in culture is obtained by creating the contact between cells after their electroporation*. Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 140, pages 258–266, 1986.
- Teissié 93. J. Teissié & M.-P. Rols. *An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electroporation*. Biophys. J., vol. 65, pages 409–413, 1993.
- Teissié 05. J. Teissié, M. Golzio & M.-P. Rols. *Mechanisms of cell membrane electroporation: a mini-review of our present (lack of?) knowledge*. Biochim. Biophys. Acta., vol. 1724, pages 270–80, 2005.



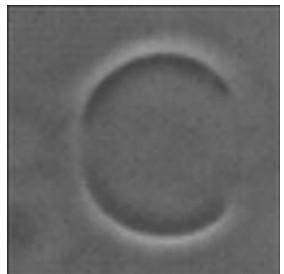
- Tekle 94. E. Tekle, R. D. Astumian & P. B. Chock. *Selective and asymmetric molecular transport across electroporated cell membranes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 91, pages 11512–11516, 1994.
- Tekle 01. E. Tekle, R. D. Astumian, W. A. Friauf & P. B. Chock. *Asymmetric pore distribution and loss of membrane lipid in electroporated DOPC vesicles*. Biophys. J., vol. 81, pages 960–968, 2001.
- Tieleman 04. D. P. Tieleman. *The molecular basis of electroporation*. BMC Biochem., vol. 5, page 10, 2004.
- Tieleman 06. D. P. Tieleman. *Computer simulations of transport through membranes: passive diffusion, pores, channels and transporters*. Clin. Exp. Pharm. Phys., vol. 33, pages 893–903, 2006.
- Tolpekina 04. T. V. Tolpekina, W. K. den Otter & W. J. Briels. *Simulations of stable pores in membranes: system size dependence and line tension*. J. Chem. Phys., vol. 121, pages 8014–8020, 2004.
- Tristram-Nagle 10. S. Tristram-Nagle. *Communications personnelles avec S. Tristram-Nagle. Pour d'avantage de sources, voir par exemple <http://lipid.phys.cmu.edu/papers08/SummaryofAreas.ppt>*. 2010.
- Tsong 91. T. Y. Tsong. *Electroporation of cell-membranes*. Biophys. J., vol. 60, pages 297–306, 1991.
- Ugen 06. K.E. Ugen, M.A. Kutzler, B. Marrero, J. Westover, D. Coppola, D.B. Weiner & R. Heller. *Regression of subcutaneous B16 melanoma tumors after intratumoral delivery of an IL-15 expressing plasmid followed by in vivo electroporation*. Cancer Gene Ther., vol. 13, pages 969–974, 2006.
- Veatch 03. S. L. Veatch & S. L. Keller. *A closer look at the canonical 'raft mixture' in model membrane studies*. Biophys. J., vol. 84, no. 1, pages 725–726, 2003.

- Vernier 03. P.T. Vernier, Y. Sun, L. Marcu, S. Salemi, C.M. Craft & M.A. Gundersen. *Calcium bursts induced by nanosecond electric pulses*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 310, pages 286–295, 2003.
- Vernier 04. P. T. Vernier, Y. Sun, L. Marcu, C. M. Craft & M. A. Gundersen. *Nanoelectropulse-induced phosphatidylserine translocation*. *Biophys. J.*, vol. 86, pages 4040–4048, 2004.
- Vernier 06. P.T. Vernier, M.J. Ziegler, Y. Sun, W.V. Chang, M.A. Gundersen & D.P. Tieleman. *Nanopore formation and phosphatidylserine externalization in a phospholipid bilayer at high transmembrane potential*. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, pages 6288–6289, 2006.
- Vlahovska 09. P.M. Vlahovska, R.S. Gracia, S. Aranda-Espinoza & R. Dimova. *Electrohydrodynamic model of vesicle deformation in alternating electric fields*. *Biophys. J.*, vol. 96, pages 4789–4803, 2009.
- Weaver 95. J. C. Weaver. *Electroporation theory. Concepts and mechanisms*. *Methods Mol. Biol.*, vol. 55, pages 3–28, 1995.
- Weaver 96. J. C. Weaver & Y. A. Chizmadzhev. *Theory of electroporation: a review*. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, vol. 41, pages 135–160, 1996.
- Weissenhorn 07. W. Weissenhorn, A. Hinz & Y. Gaudin. *Virus membrane fusion*. *FEBS Lett.*, vol. 581, pages 2150–2155, 2007.
- Westh 03. P. Westh. *Unilamellar DMPC vesicles in aqueous glycerol: preferential interactions and thermochemistry*. *Biophys. J.*, vol. 84, pages 341–349, 2003.
- Winterhalter 87. M. Winterhalter & W. Helfrich. *Effect of voltage on pores in membranes*. *Phys. Rev. A*, vol. 36, pages 5874–76, 1987.



- Winterhalter 88. M. Winterhalter & W. Helfrich. *Deformation of spherical vesicles by electric fields*. J. Colloid Interface Sci., vol. 122, pages 583–586, 1988.
- Wohlert 06. J. Wohlert, W.K. den Otter, O. Edholm & Briels WJ. *Free energy of a trans-membrane pore calculated from atomist molecular dynamics simulations*. J. Chem. Phys., vol. 124, pages 154905–14, 2006.
- Yang 09. P. Yang, R. Lipowsky & R. Dimova. *Nanoparticle formation in giant vesicles: synthesis in biomimetic compartments*. Small, vol. 5, pages 2033–2037, 2009.
- Yu 94. Y.G. Yu, D.S. King & Y.K. Shin. *Insertion of a coiled-coil peptide from influenza virus hemagglutinin into membranes*. Science, vol. 266, pages 274–276, 1994.
- Zhao 07. J. Zhao, J. Wu, H. L. Shao, F. Kong, N. Jain, G. Hunt & G. Feigenson. *Phase studies of model biomembranes: Macroscopic coexistence of L α plus L β , with light-induced coexistence of L α plus L α Phases*. Biochim. Biophys. Acta, vol. 1768, no. 11, pages 2777–2786, 2007.
- Zhelev 93. D.V. Zhelev & D. Needham. *Tension stabilized pores in giant vesicles: determination of pore size and pore line tensions*. Biophys. Acta., vol. 1147, pages 89–104, 1993.
- Ziegler 08. M.J. Ziegler & P.T. Vernier. *Interface water dynamics and porating electric fields for phospholipid bilayers*. J. Phys. Chem. B, vol. 112, pages 13588–13596, 2008.
- Zimmermann 82. U. Zimmermann. *Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena*. Biochim. Biophys. Acta, vol. 694, pages 227–277, 1982.

Annexes



Annexe A

Méthodes expérimentales

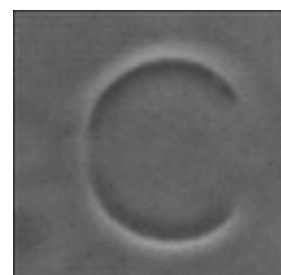
A.1 Produits

Les lipides utilisés (EggPC, DOPC, DOPE, Rhodamine PE) provenaient de chez Avanti, le cholestérol de chez Sigma. Les sucres, Hepes, tampon phosphate venaient de divers fournisseurs classiques (Sigma, Merck...), le TOTO-1 et le DiIC₁₈ de chez Molecular Probes. J'utilisais de l'eau milli-Q de résistivité 18 M Ω .cm.

A.2 Solutions

Les lipides utilisés pour l'électroformation (cf annexe A.3) étaient dilués dans du chloroforme à 0.5 mg/mL, et si besoin le marqueur fluorescent (le plus souvent de la Rhodamine PE) était ajouté à 0.5–1 mol %.

Classiquement, la solution interne des GUVs (le milieu de formation) était une solution aqueuse de 240 mM saccharose, et la solution externe (milieu de pulsation) une solution aqueuse de 260 mM glucose. Le milieu de pulsation contenait également, en général, 1 mM NaCl pour avoir une conductivité électrique σ_e de l'ordre de quelques centaines de $\mu\text{S}/\text{cm}$, alors que celle du tampon de formation σ_i n'était que de quelques dizaines de $\mu\text{S}/\text{cm}$. Les osmolarités étaient d'environ 280 et 260 mOsm/kg, respectivement. Pour stabiliser le pH (la plupart du temps à 7) j'utilisais au début de la thèse du tampon phosphate $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ à 1 mM, puis à la fin de l'Hepes à 1mM. Dans les expériences de transfert d'ADN, le plasmide décrit à l'annexe A.4 était ajouté au milieu de formation à la concentration massique de 1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$.



A.3 Électroformation des GUVs

Les GUVs étaient préparés par électroformation [Angelova 86]. Les lipides que j'utilisais étaient en général en phase fluide à la température de la pièce, je pouvais donc travailler à température ambiante. Deux fois 15 μL de la solution, décrite plus haut, de lipides à 0.5 mg/mL dans du chloroforme, étaient déposés avec précaution sur deux zones d'environ 4 cm^2 sur la surface conductrice de lames de verre ITO. Les lames étaient ensuite séchées sous vide pendant 2 heures pour évaporer au maximum le solvant organique. Une chambre était constituée en intercalant entre les deux lames un joint en silicone de 1 mm d'épaisseur et en maintenant le tout à l'aide de pinces. La chambre était alors remplie avec le milieu de formation, puis immédiatement connectée à un générateur de fonctions. La tension sinusoïdale de 10 Hz était augmentée graduellement de 100 mV à 2 V pendant une heure. Elle était ensuite maintenue pendant quelques heures (entre une heure et une nuit), puis les vésicules étaient détachées des lames en appliquant une tension carrée à 5 Hz pendant une trentaine de minutes.

Unilamellarité Il a été vérifié expérimentalement que la majorité des liposomes obtenus par électroformation étaient unilamellaires [Rodriguez 05]. J'ai pour ma part vérifié par simple examen des niveaux de fluorescence sur des images confocales que les GUVs de DOPC avaient bien le même nombre de bicouches. On peut raisonnablement affirmer que ce nombre était de 1 bicouche.

A.4 ADN

L'ADN utilisé dans les expériences d'électrotransfert sur GUVs est un plasmide de 4700 paires de bases pEGFP-C1 (Clontech, Mountain View, CA) codant le gène pour la GFP. C'est le même plasmide que celui pour lequel la formation de spots d'interaction ADN/membrane est observée sur cellules [Golzio 02]. Il était purifié à partir de bactéries *Escherichia coli* transfectées, avec un kit de purification d'ADN Maxiprep (Qiagen, Chatsworth, CA). L'ADN était marqué au TOTO-1, à un rapport de 1 molécule de TOTO-1 pour 20 paires de bases, par une incubation pendant 1 heure sur de la glace. Il était ensuite ajouté au milieu de pulsation à la même concentration massique que celle typiquement utilisée sur cellules CHO, 1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$.

A.5 Microscopie

Au cours de ma thèse je me suis déplacé dans différents endroits où j'ai utilisé divers microscopes qu'il serait long de lister ici. C'étaient majoritairement des Zeiss ou des Leica, à champ large ou confocaux, mais toujours inversés. Selon mes besoins, j'observais les GUVs en microscopie de fluorescence, ou par contraste de phase.

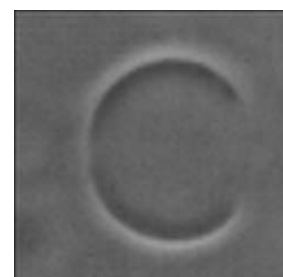
Pour visualiser la membrane par fluorescence, j'utilisais principalement de la Rhodamine PE, avec le jeu de filtres adéquat. J'utilisais une caméra CCD classique pour les observations de routine, ou sinon la caméra EMCCD pour les séquences d'images plus rapides, comme dans la figure 5.2. Les expériences du chapitre 4 étaient en majorité réalisées sous un microscope confocal Zeiss LSM 510 équipé d'un objectif 63× Zeiss. La Rhodamine PE était excitée à 543 nm avec un laser HeNe, et un filtre d'émission passe-long de 560 nm était employé.

Les expériences du chapitre 6 sur l'électrotransfert d'ADN dans les GUVs étaient réalisées sous le même microscope confocal Zeiss LSM 510. Le premier canal, pour la visualisation de la membrane, était identique à celui décrit plus haut. Le second comportait une excitation à 488 nm avec un laser Ar, et un filtre passe-bande 500–530 nm pour observer l'ADN. L'acquisition était réalisée de manière séquentielle.

Les observations ultrarapides en contraste de phase du chapitre 5 étaient réalisées sur un microscope inversé Zeiss Axiovert 135 équipé d'un objectif 20× Ph2. Les images étaient acquises à des cadences de 5000, 10000 ou 20000 images par seconde, avec une caméra rapide HG-100K (Redlake, San Diego, CA). Pour les observations de routine, une lampe halogène était utilisée, et pour les acquisitions, une lampe à mercure HBO W/2. Le temps d'éclairage avec cette lampe n'excédait pas quelques secondes, et on ne détectait pas d'élévation de température significative dans l'échantillon.

A.6 Électropulsation

Les impulsions étaient délivrées directement sur la platine du microscope, dans une chambre de pulsation fabriquée de la manière suivante. Deux électrodes de cuivres étaient collées parallèlement, à 5 ou 10 mm de distance, sur une lame de microscopie en verre. Une cavité de quelques centaines de μm de hauteur était constituée en fixant une lamelle de verre sur la lame avec un peu de parafilm chauffé. La chambre de pulsation était remplie du milieu de pulsation, puis on ajoutait quelques μL de solution



de GUVs provenant de la chambre de formation.

La chambre de pulsation était connectée à un générateur d'impulsions, le plus souvent un générateur β tech, modèle GHT_Bi500. Des impulsions de durée 5 ms étaient majoritairement employées. Dans le cas d'une séquence d'impulsions, la fréquence de répétition était de l'ordre de 0.3–1 Hz. L'amplitude des impulsions E_0 était réglée en fonction du rayon R_0 de la vésicule de manière à induire une différence de potentiel transmembranaire $\Delta\psi_0 = (3/2)R_0E_0$ de l'ordre de 0.5–2 V. Les champs appliqués étaient de l'ordre de 10–100 kV/m.

Annexe B

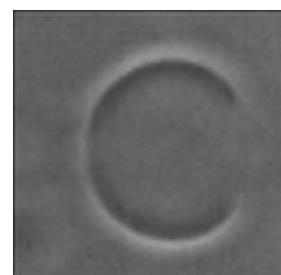
Méthodes numériques

B.1 Traitement des images pour la mesure des tensions de bord

La procédure d'analyse d'image comporte deux étapes : la détection de la membrane et la mesure de la taille du pore.

Pour la première étape, nous avons commencé par une correction du fond de l'image en utilisant l'algorithme de soustraction de fond par "balle roulante" (rolling-ball algorithm) [Sternberg 83]. Ensuite, la membrane était localisée par application d'un algorithme de Sobel, technique classique pour repérer les forts gradients d'intensité. Les images en contraste de phase de GUVs contenant du saccharose observés dans un milieu contenant du glucose montrent un halo lumineux clair autour de la vésicule, et une région plus sombre du côté du feuillet interne de la bicouche, voir figure 5.1. La membrane se situe à l'interface entre ces deux régions, à l'endroit où l'amplitude du gradient d'intensité de l'image est maximal. Quand un pore est présent dans la membrane, les solutions interne et externe se mélangent, ce qui conduit à une annulation du gradient d'intensité dans la région du pore. La dernière phase de la détection de la membrane était la binarisation de l'image, où la valeur seuil était calculée avec l'algorithme Isodata [Ridler 78]. Dans l'image binaire, le cercle extérieur blanc correspond à la frontière entre le halo lumineux entourant le GUV et le fond gris de la solution externe, alors que le cercle interne indique la position de la membrane, voir figure 5.1. Comme nous nous sommes intéressés uniquement aux pores faisant face à la cathode, seul ce côté de la vésicule était analysé. Toutes ces opérations ont été réalisées avec le logiciel ImageJ.

La mesure effective de la taille du pore était effectuée à l'aide d'un algorithme maison, fondé sur la détection d'agrégats de pixels et sur la mesure



de distance entre les pixels aux extrémités de ces agrégats. La précision de la méthode a été vérifiée sur plusieurs cas individuels.

B.2 Traitement des images pour l'analyse d'électrotransfert d'ADN dans des GUVs

Lors de l'analyse des expériences d'électrotransfert d'ADN dans des GUVs, nous nous sommes intéressés à deux quantités, toutes deux mesurables en microscopie confocale : le rayon de la vésicule R et le rapport des concentrations d'ADN à l'intérieur et à l'extérieur du liposome c/c_0 . Comme nous travaillons dans des solutions aqueuses diluées avec des propriétés physicochimiques similaires, la concentration des molécules marquées en fluorescence était simplement proportionnelle à l'intensité de fluorescence moyenne mesurée, et par conséquent la quantité c/c_0 était directement égale au rapport I/I_0 des intensités de fluorescence moyenne dans et hors du GUV.

Nos images étaient composées de deux canaux : le rouge pour la Rhodamine PE (membrane lipidique) et le vert pour le TOTO-1 (ADN). Les mesures de taille des liposomes étaient donc réalisées sur le canal rouge et les mesures de c/c_0 sur le canal vert, en calculant l'intensité de fluorescence moyenne sur un disque à l'intérieur de la vésicule, de rayon égal à 80 % de celui du GUV (nous avons testé des valeurs allant de 60 à 90 % sans remarquer de différence probante). Cette procédure était répétée pour chaque image, ainsi pouvions nous suivre l'évolution avec le nombre d'impulsions de la taille des liposomes et des quantités d'ADN encapsulées. Nous avons aussi calculé la fluorescence moyenne à l'extérieur des vésicules I_0 . Comme sa valeur ne changeait pas significativement au cours de la séquence d'impulsions, nous avons utilisé la quantité obtenue avec la première image de chaque expérience.

Toutes les images avaient une intensité de fluorescence moyenne non nulle, même à l'intérieur d'une vésicule non électropulsée où il n'y avait pas d'ADN, ou même dans des chambres de pulsation remplies uniquement d'eau. Ceci était dû aux capteurs du microscope confocal et au bruit de fond. Afin de mesurer des concentrations d'ADN fiables, nous avons estimé ce niveau de base de fluorescence à l'intérieur d'un GUV non perméabilisé et avons soustrait cette quantité aux valeurs de fluorescence moyenne obtenues à l'intérieur et à l'extérieur des liposomes. Ce niveau de base est représenté par la ligne horizontale noire dans la figure 6.1G,H.

Les données pour c/c_0 montraient d'importantes fluctuations et ont

été lissées par un filtre à moyenne de glissante de largeur 3. Les barres d'erreur de la figure 6.3 ont été obtenues en calculant l'écart type de c/c_0 après la séquence d'impulsions (car cette quantité restait alors constante), pour chaque expérience. Les tâches décrites ci-dessus étaient réalisées avec Matlab et ImageJ.

B.3 Calcul du flux du champ électrique à travers une surface perméabilisée

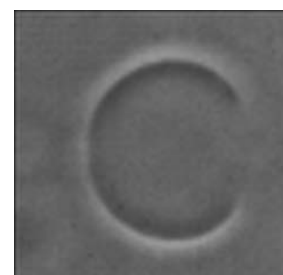
Comme indiqué à la section 6.4, nous voulons estimer la valeur du flux du champ électrique $\mathbf{E} = -\nabla\psi$ à travers une région perméabilisée dans une vésicule géante. Cette région perméabilisée prend la forme d'une calotte sphérique d'angle ϑ face à la cathode. Nous calculons numériquement le flux ϕ en fonction de ϑ par la méthode des éléments finis, à l'aide du logiciel Comsol.

La vésicule est représentée par une coquille sphérique de rayon R et de conductivité interne σ_i , dans une solution aqueuse de conductivité σ_e . L'équation pour le potentiel électrique ψ [Jackson 75]

$$\nabla \cdot \sigma \nabla \psi = 0 , \quad (\text{B.1})$$

de la forme de l'équation de Laplace dans les deux régions où $\sigma = \text{cte}$, est résolue numériquement dans une boîte cylindrique de rayon L et de hauteur $2L$, en utilisant la symétrie axiale du problème. Un champ électrique d'amplitude $E_0 = V_0/L$ est appliqué dans la direction de l'axe du cylindre, en imposant les conditions aux limites de Dirichlet $\psi = V_0$ et $\psi = -V_0$ sur les faces supérieure (anode) et inférieure (cathode) du cylindre. La membrane est modélisée par l'utilisation d'une condition aux limites de couche mince, avec une épaisseur $d = 4 \text{ nm}$ et une conductivité $\sigma_m = 5 \times 10^{-7} \text{ S/m}$, comme décrit dans [Pucihar 06]. Pour la représentation de la région perméabilisée, on remplace la conductivité de la membrane σ_m par la conductivité externe σ_e sur une calotte sphérique d'angle ϑ . L'intégration numérique de \mathbf{E} sur cette surface donne donc ϕ en fonction de ϑ .

Différentes valeurs des paramètres R , E_0 , σ_i et σ_e du même ordre que dans les expériences sont utilisées. Elles sont données dans les légendes des figures 6.4 et 6.5. Des valeurs typiques sont $R = 10 \text{ }\mu\text{m}$, $E_0 = 50 \text{ kV/m}$, $\sigma_i = 10^{-2} \text{ S/m}$ and $\sigma_e = 4 \times 10^{-2} \text{ S/m}$.



Annexe C

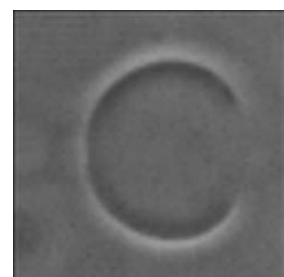
Travaux réalisés lors de mon séjour à Los Angeles

Contexte

Durant ma dernière année de thèse, j'ai eu la chance de passer trois mois dans le groupe de P. Thomas Vernier, à l'Université de Californie du Sud (USC) à Los Angeles. J'y ai été brièvement initié aux simulations de dynamique moléculaire, mais j'ai passé la plupart de mon temps à étudier l'effet d'impulsions électriques ultra-courtes de durée 4 ou 30 nanosecondes et de quelques MV/m d'amplitude (nano-impulsions) sur des vésicules géantes.

Il semble que ces nano-impulsions n'aient pas d'effet facilement détectable sur les GUVs. Je n'ai pas remarqué de phénomènes dramatiques tels que la perte de lipide ou la formation de macropores décrits aux chapitres 4 et 5, et la technique usuelle d'étude de la perméabilisation par contraste de phase ne donnait rien de probant. J'ai aussi essayé de mettre en place une méthode de visualisation de la perméabilisation par techniques de fluorescence, mais là encore je n'ai rien obtenu de probant. Je manquais de temps, et j'avais de grosses difficultés à travailler dans les tous petits canaux ($\sim 200 \mu\text{m}$ de largeur) nécessaires à l'application d'impulsions suffisamment intenses.

Toutefois, j'ai pu faire une observation intéressante lors de ma dernière semaine en Californie. Si l'on applique un train de nano-impulsions à une fréquence de l'ordre du kHz, on peut voir que les GUVs se déforment dans la direction perpendiculaire au champ électrique. Cette déformation semble stable durant la durée de la séquence, et son degré augmente avec l'amplitude du champ. Ce genre de phénomènes est connu et bien décrit quand



on applique des impulsions plus longues ou bien un champ électrique alternatif (cf chapitre 2), mais n'a à ma connaissance jamais été rapporté dans le cas d'une séquence d'impulsions très rapprochées dans le temps. Malheureusement je n'ai découvert ceci qu'à la toute fin de mon séjour, et je n'ai pas pu étudier ce phénomène de manière systématique. Une telle étude pourrait s'avérer intéressante et représente une future direction de recherche potentielle.

Un compte-rendu succinct de mes travaux à Los Angeles est inséré dans les pages qui suivent. La courte morale de cette histoire est que les GUVs de DOPC semblent beaucoup plus robustes que des cellules et bien plus difficiles à perméabiliser avec des nano-impulsions.

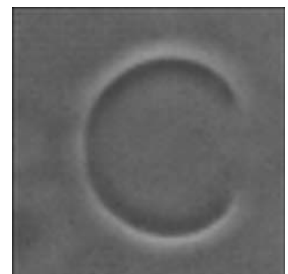
Giant vesicles and nanopulses

Thomas Portet

May 27, 2010

Contents

1	A short introduction	2
2	Materials and methods	2
2.1	Lipids and solutions	2
2.2	Electroformation	3
2.3	Electropulsation...	3
2.3.1	... under the microscope	3
2.3.2	... in cuvettes	6
2.3.3	... inducing GUVs deformation	6
3	(Non-)permeabilization experiments...	6
3.1	... under the microscope	6
3.2	... in cuvettes	7
4	Electrodeformation experiments	7
5	Discussion	11
	References	13



1 A short introduction

In the past few years, electric pulses of nanosecond-range duration (nanopulses) have become more and more popular among the electroporation community because of their ability to permeabilize internal and plasma cell membranes. Giant unilamellar vesicles (GUVs) are useful model systems whose behavior when subjected to millisecond and microsecond electric pulses has already been studied for more than ten years. However nobody reported results on the effects of nanopulses on GUVs, at least to my knowledge. I tried to investigate these effects during my stay at USC between March and May 2010.

The experiments I conducted are presented in this document. It starts with detailed explanations about the materials, protocols and experimental procedures I used for producing and manipulating GUVs; you may find this section 2 useful if you plan to work with giant liposomes. After that, sections 3 and 4 recapitulate my observations about the effects of nanopulses on the vesicles. These findings are then discussed in the last section 5.

This document is just a brief summary of my experiments, and hopefully an introductory guide to GUVs fabrication and handling. If you need further help, do not hesitate to contact me, I will be glad to help you. I want to emphasize that what you are reading *is not* a scientific paper. It does not contain much references to previous works, or a real scientific introduction to GUVs or nanopulse technology. For the nanopulse technology, I think you already know way more than I do. If you are interested in reading about giant vesicles and their behavior in electric fields, I recommend the reviews by Dimova's group [1, 2, 3]. We also recently wrote a review article about the effects of electric fields on giant liposomes, and their applications [4].

2 Materials and methods

2.1 Lipids and solutions

DOPC and the membrane fluorescent dye Rhodamine PE were stored at -20°C in chloroform solutions at 2.5 g/L and 1 g/L, in borosilicate glass flasks. The solution used for producing the GUVs (lipid solution) was a 0.5 g/L DOPC solution in chloroform. When fluorescence labeling of the membrane was needed, Rhodamine PE was also added to the lipid solution, at 1 mol %.

The solution used for forming the vesicles (formation solution) was the solution that was entrapped in the vesicles. It was a 260 mM sucrose solution in distilled water. The solution in which the vesicles were observed and submitted to electric pulses (pulsation solution) was a 240 mM glucose solution, with 1mM NaCl. The glucose/sucrose asymmetry causes sedimentation of the vesicles at the bottom of the pulsation chamber, and the addition of salt ensures electrical conductivity of the external medium.

For both solutions, the pH was adjusted at a value of 7 using Hepes buffer and NaOH. When I tried to monitor permeabilization via fluorescence techniques, 10 μM of calcium green cell impermeant (CG) or calcein was added to the formation solution, and 1 mM of

MnCl₂ or CoCl₂ to the pulsation solution, in order to quench the fluorescence of CG or calcein. For electrodeformation experiments, the salt concentration of the pulsation solution was raised to 50 mM so as to decrease the conductivity ratio $x = \lambda_{in}/\lambda_{ex}$ and thus enhance the deformation of the vesicle [5].

2.2 Electroformation

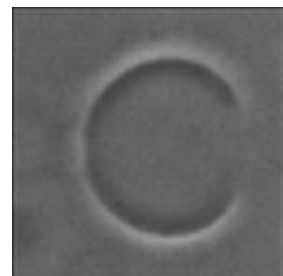
During the eighties, Angelova and Dimitrov developed an efficient protocol for GUV production known as electroformation [6], which was later shown to indeed produce *unilamellar* vesicles [7]. A number of obstacles in the preparation of giant liposomes under physiological conditions (*i.e.* with salts) have recently been overcome, with electroformation and other methods [8, 9, 10, 11].

I always produced vesicles by electroformation, which I describe here. 15 μL of the lipid solution were gently deposited with a microsyringe on a 4 cm² square region on the conducting side of an ITO glass slide, trying to make the film as uniform as possible. This operation was repeated with a second ITO slide, and both slides were put in the oven at 60°C for 30 minutes in order to evaporate the organic solvent. Usually, people rather do that under a vacuum. I did not do so because of my bad experience with the desiccator shortly after my arrival, and because the electroformation procedure indeed worked with this slight modification. However, for a more systematic study and publication purposes, I would recommend to do it under a vacuum. After this drying step, the two ITO slides were assembled into a formation chamber, using a 1 mm-thick silicon spacer and two clamps, as depicted in figure 1. This chamber was then filled with the formation solution, and immediately (to avoid spontaneous swelling of the lipid film) connected to a function generator delivering a sinusoidal voltage of 100 mV peak to peak amplitude at 10 Hz frequency. The voltage was increased within one hour in 150 mV steps up to a value of 3 V. This final voltage was maintained at least during one hour (most of time overnight) to obtain GUVs of appropriate size ($\sim 30 \mu\text{m}$ diameter). For helping the vesicles detach from the slides, a square voltage of 3 V and 5 Hz frequency was applied for another 30 minutes. Finally, the medium inside the chamber (now denoted as GUV solution) was gently pipetted, and stored in borosilicate glass flasks at 4°C. The GUVs were stable for several days, but for all the experiments I used vesicles at most 3 days old. When using fluorescent dyes in the membrane or in the formation solution, the electroformation procedure was carried out in a opaque box so as to avoid photobleaching.

2.3 Electropulsation...

2.3.1 ... under the microscope

Most of my experiments were performed directly under the microscope, hence I had to build pulsation chambers. I had difficulties producing neat chambers using platinum foils, as Sharon does. I thus designed another type of chamber (which I now regret, see discussion in section 5), by depositing two strips of copper tape on a microscopy glass slide, at a distance of



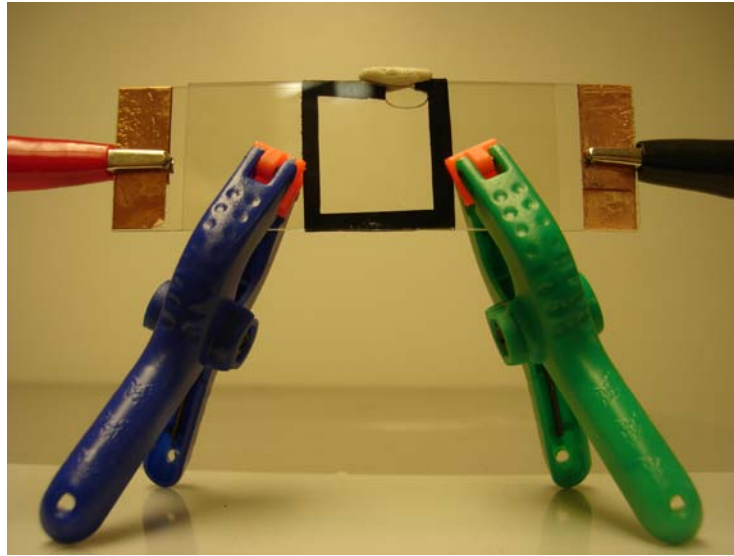


Figure 1: Photography of the formation chamber.

200-300 μm apart. A glass coverslip was then stuck on this channel, using heated parafilm strips aligned on the electrodes and located as far as possible from the cavity. A photography of this type of chamber is given in figure 2. However, despite the fact that they were quite easy to produce, such chambers had disadvantages. After having been filled and emptied about 5-6 times, it was very hard to fill them completely again, probably because of the sugars contained in the GUV and pulsation solutions, and also because of the very narrow dimensions of the channel. Much later I also noticed that they were quite susceptible to show electric arcs, mainly in the region where the electrodes exceed the coverslip. As a consequence, I modified the chamber design. I gave up sticking the coverslip, which was just deposited on the electrodes after loading the channel, and which remained in place *via* capillarity phenomena. This avoided the need to use a new chamber after a few experiments. I also used shorter electrodes, which seemed to diminish the occurrence of electric arcs. An example of this new version of the pulsation chambers can be seen in figure 3. Chambers cavities were completely filled with the GUV solution diluted ten times in the pulsation solution. I used Jason's hybrid core pulse generator, which delivered pulses of 4 ns duration. I tried to use different number of pulses or repetition frequency, which did not result in different liposomes' behaviors. The maximal pulse amplitude I used was 10 MV/m. For higher amplitudes obtained with another generator (the one in the black box; I do not know how to call it), I had electric arcs problems, which could probably be avoided with better chamber designs, but I did not realize that at that time.

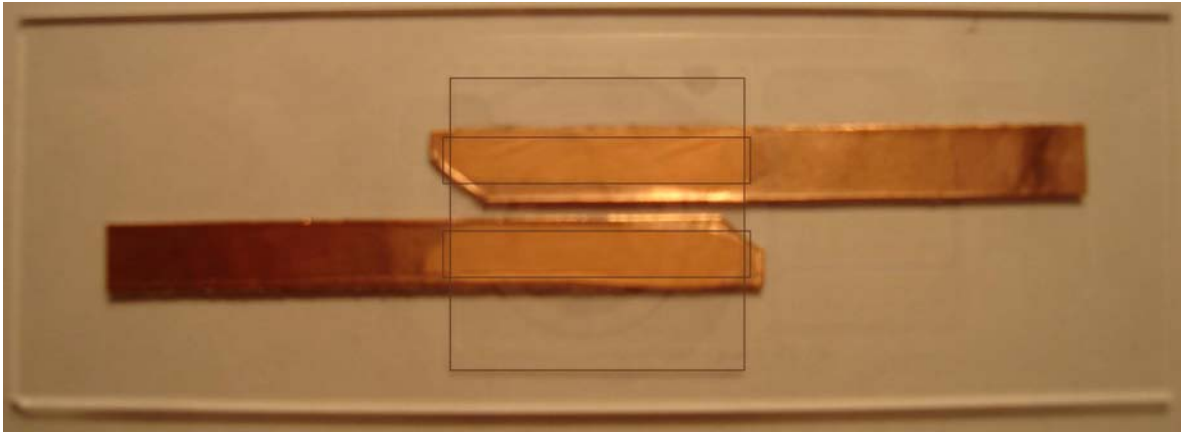


Figure 2: Photography of the pulsation chamber, version 1. For clarity, the positions of the glass coverslip and of the parafilm strips were highlighted.

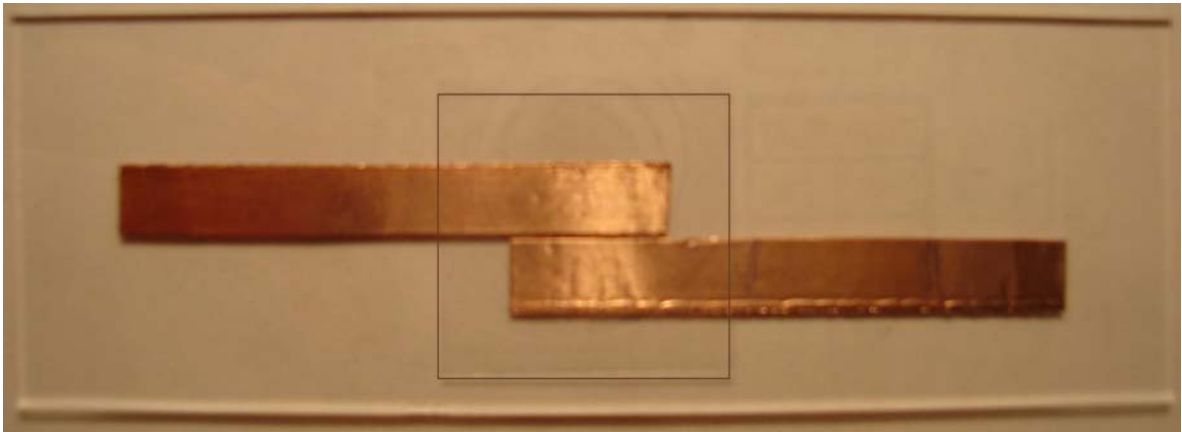
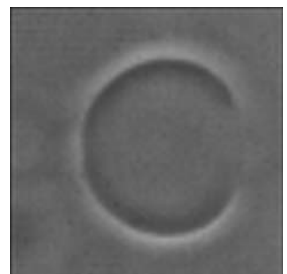


Figure 3: Photography of the pulsation chamber, version 2. For clarity, the position of the glass coverslip was highlighted.



2.3.2 ... in cuvettes

I also carried out electropulsation experiments in cuvettes. The 1 mm-wide cavity was filled with 120 μL of the GUV solution diluted 10 times in the pulsation solution, and the solution was gently agitated with the pipette right before electropulsation in order to ensure that the vesicles were still in suspension when the pulses were delivered. I applied 100 pulses of 30 ns duration and 5 MV/m amplitude at a repetition frequency of 50 Hz. This frequency was the maximal frequency available with the generator, and this amplitude was the highest amplitude producing a pulse of acceptable shape.

2.3.3 ... inducing GUVs deformation

Electrodeformation experiments were performed at the very end of my stay, directly on the microscope stage, in pulsation chambers version 2, as shown in figure 3. As indicated above, the pulsation solution contained not 1 but 50 mM NaCl, in order to increase the deformation. The GUV solution was diluted in the same volume of the pulsation solution, which yielded an outer salt concentration of 25 mM. Despite decreasing the conductivity ratio, the addition of salt also contributed to deflate the vesicles, the outer solution having now higher osmolarity. The sequence of electric pulses was applied using Jason's hybrid core pulse generator. 10000 pulses of 4 ns duration and 5 or 6.7 MV/m amplitude were delivered at a repetition frequency of 1 kHz. The total pulse sequence thus lasted ten seconds.

3 (Non-)permeabilization experiments...

3.1 ... under the microscope

The application of nanopulses to DOPC vesicles did not lead to any obvious GUV permeabilization monitored by phase contrast, or membrane reorganization, as had been reported to occur for longer pulses [12, 13]. This was quite disappointing for me, but still has an interpretation: pure DOPC GUVs are harder to permeabilize than heterogenous cell membranes. This can be clearly seen in figure 4, which shows images of a mixture of cells and vesicles before and after electric treatment. Liposomes were unaffected by the pulses, whereas cells exhibited the typical swelling occurring after successful cell electropermeabilization.

Another more sensitive way to detect GUV permeabilization is the use of fluorescence techniques. One can make GUVs in a solution containing a fluorescent dye, such as CG or calcein. Calcein is a natively fluorescent compound, and the CG is fluorescent due to the calcium residues in formation solution. Vesicles electroformed in presence of such molecules thus exhibit fluorescence, which can be quenched by the appropriate ions (Mn^{2+} or Co^{2+}). As a consequence, pulsing vesicles in a medium containing these ions would result in a decrease of the fluorescence inside the liposome, if it gets indeed permeabilized to these ions. I tried to apply these techniques, but my attempts were unsuccessful. It seemed that the GUVs containing calcein were quite fragile and burst when I loaded the chamber. CG-containing vesicles were more stable, but CG has a fast photobleaching rate, and I could not state

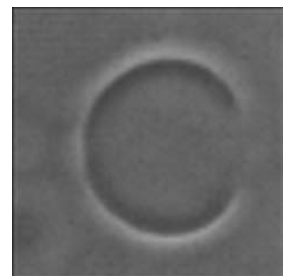
for sure that the slight fluorescence decays I sometimes saw were attributed to membrane electropermeabilization. Anyway, I lacked time to carefully repeat these experiments several times; this is something that may require further investigation.

3.2 ... in cuvettes

I also investigated the effect of 100 longer pulses of 30 ns duration and 5 MV/m amplitude applied in electropulsation cuvettes at 50 Hz, as described in section 2. As is shown in figure 5, the results are the same than those in home-made chambers: no permeabilization detectable by phase contrast. However these results are questionable because of the very small number of vesicles that I could observe after having transferred the sample in an observation chamber. I could not use higher field magnitudes, because otherwise the pulse shape looked very strange. I would have also liked to try these experiments with 300 μ s pulses (that I know for sure can permeabilize DOPC vesicles), but Jesse's long pulse generator did not work anymore at that time, even though I had repaired it before. It would have been useful to run this control experiments in order to be sure that one can monitor permeabilization with this cuvette setup.

4 Electrodeformation experiments

At the very end of my stay, I did some more experiments involving both cells and GUVs in order to get a nicer picture (actually the one from figure 4). When applying a long sequence of pulses, I noticed that a big vesicle ($\sim 100 \mu$ m diameter) would deform into an oblate ellipsoid (*i.e.* an ellipsoid with its major axis perpendicular to the field direction). However, the external medium for this experiments was not controlled precisely: it contained altogether pulsation solution, GUV solution, and cell culture medium in equivalent amounts. As it has been reported in [5] that this kind of deformations depend crucially on the conductivity ratio $x = \lambda_{in}/\lambda_{ex}$, *i.e.* on the ratio of the salt concentration inside and outside the vesicle, I needed to perform this experiment in a well controlled environment. Hence I diluted twice the GUV solution in a pulsation solution containing an additional 50 mM NaCl (see section 2), and conducted the following experiment: applying two sequences of pulses of 6.7 and 5 MV/m amplitude well separated in time while taking pictures, before, during and after the pulse trains. I observed that the vesicle deformed almost immediately after the onset of the pulse sequence, kept the same shape during the whole sequence, and then recovered its initial spherical shape. This behavior is shown in figure 6. Denoting by a and b the length of the ellipsoid axes parallel and perpendicular to the field direction respectively, I measured a deformation ratio $a/b = 0.86$ for the highest field magnitude, and $a/b = 0.89$ for the lowest. This is consistent with the intuition that higher fields would result in more pronounced deformations, *i.e.* with a/b being further than the deformation ratio $a/b = 1$ of a sphere.



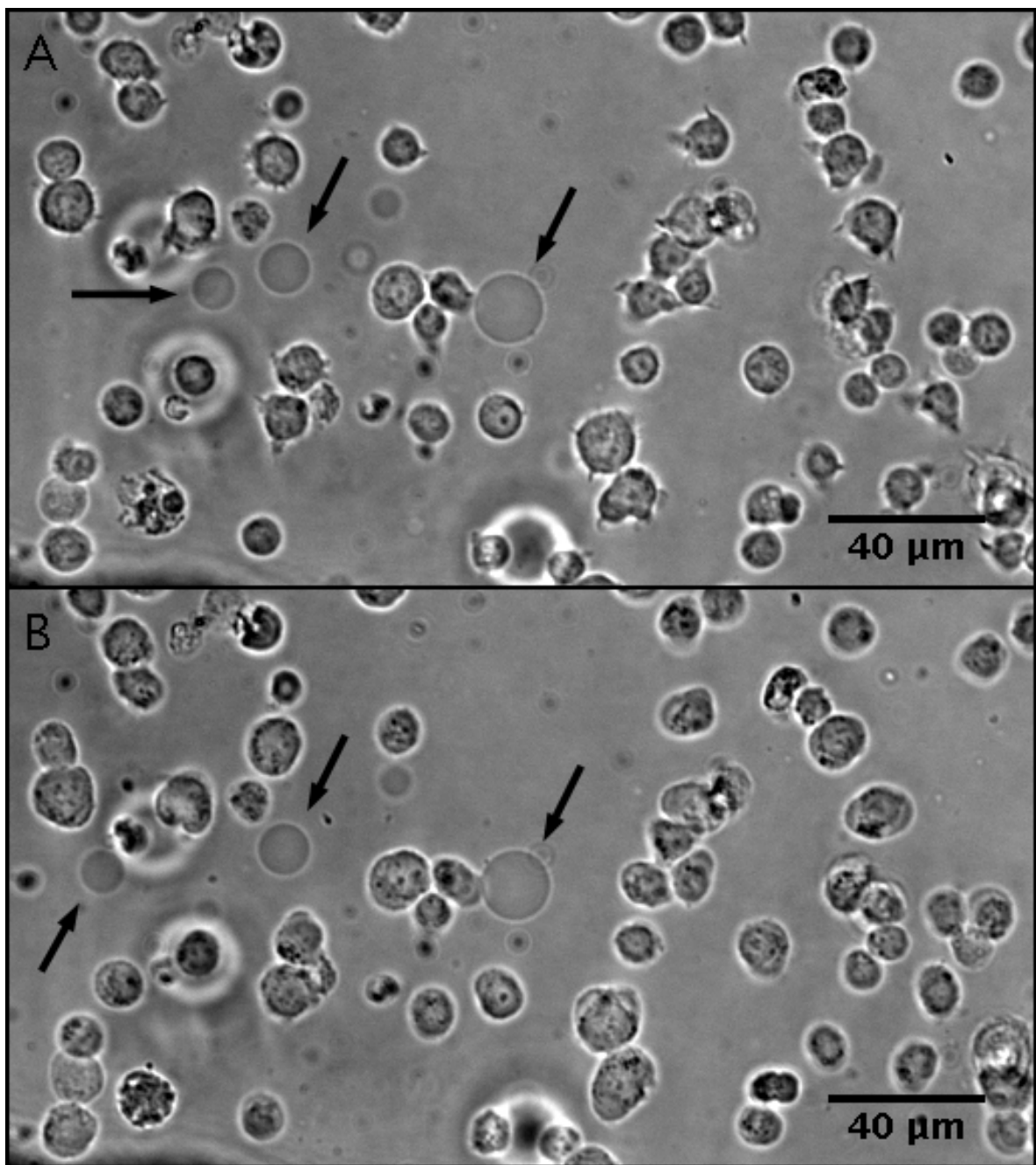


Figure 4: **A**: Photography of a mixture of cells and GUVs (some liposomes are indicated by the black arrows) before electric treatment. **B**: Same field of view after application of 20000 pulses of 4 ns duration and 6.7 MV/m amplitude, at 1 kHz repetition frequency. One can see that the cells have swollen (which indicates that they were indeed permeabilized), whereas the GUVs have not been affected by the electric treatment and still exhibit the characteristic contrast associated with the glucose/sucrose asymmetry of non-permeabilized vesicles.

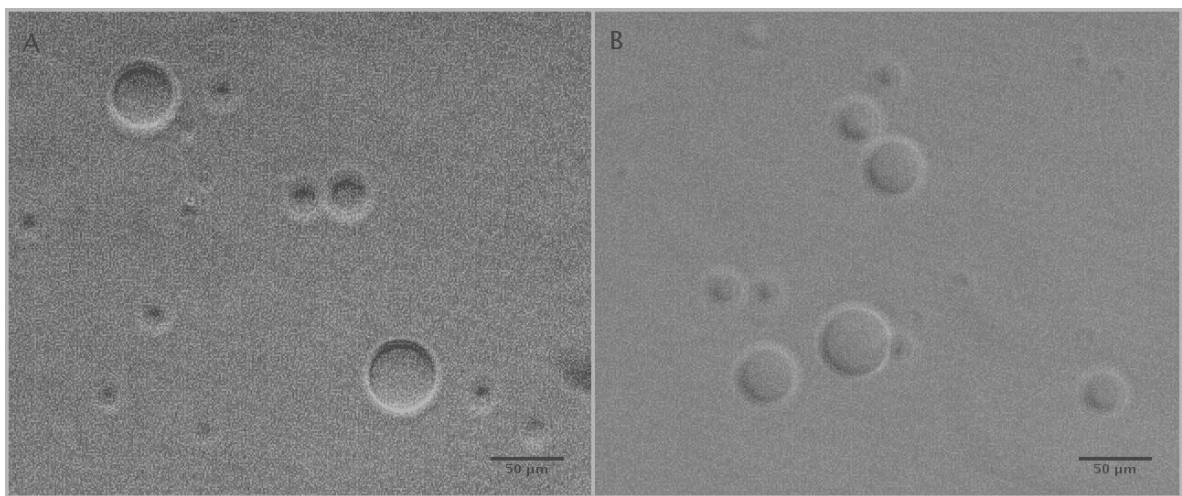
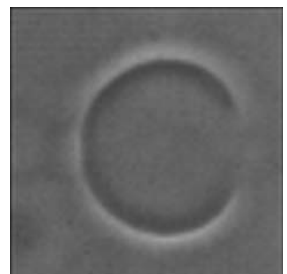


Figure 5: **A**: Photography of GUVs without electric treatment. **B**: Photography of GUVs after electric treatment by 100 pulses of 30 ns duration, 5 MV/m amplitude and 50 Hz repetition frequency, in an electroporation cuvette.



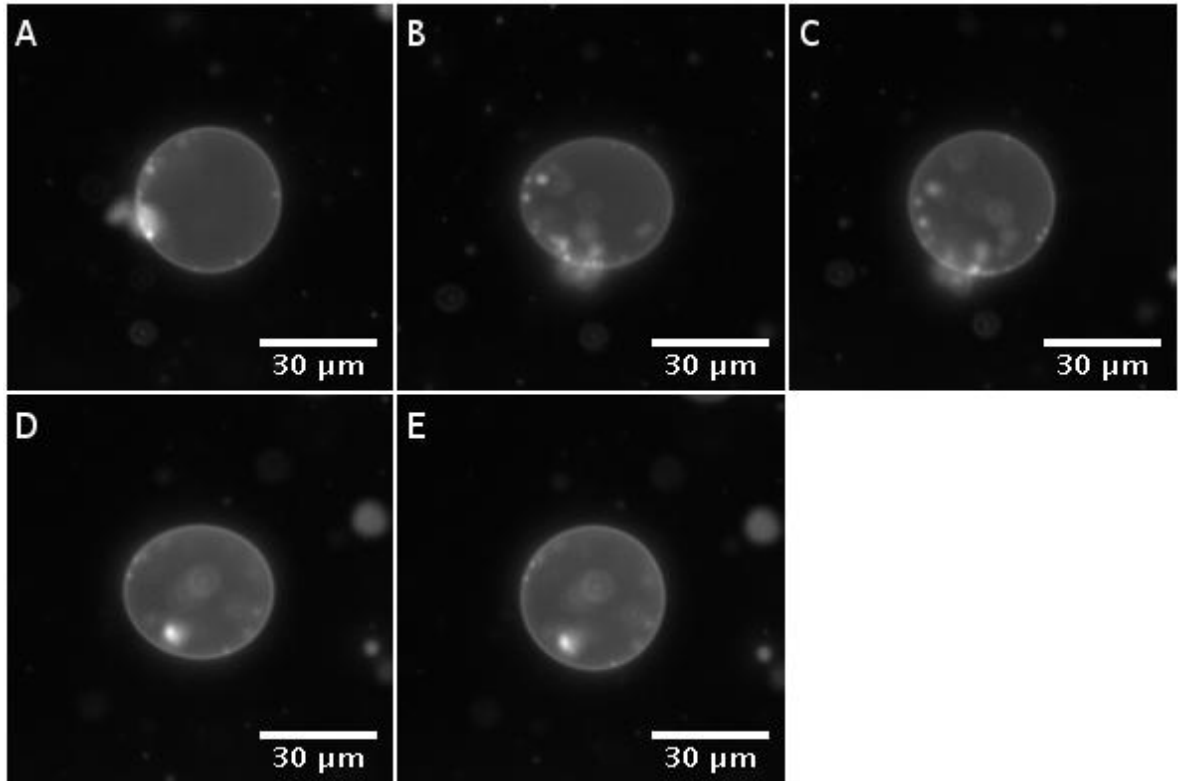
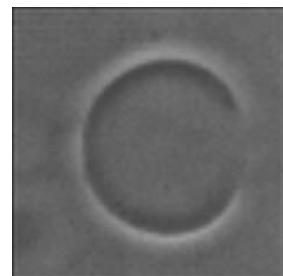


Figure 6: Photography showing the deformation of a GUV during a sequence of nanopulses of 4 ns duration and 1 kHz repetition frequency. **A**: liposome before application of the first sequence. **B**: liposome during a sequence of electric pulses of 6.7 MV/m amplitude; deformation ratio a/b , introduced in text, is 0.86. **C**: after the pulse sequence, the GUV has recovered its spherical shape characterized by $a/b = 1$. **D**: liposome during a sequence of electric pulses of 5 MV/m amplitude; $a/b = 0.89$, the GUV is less deformed than in panel B. **E**: after the second pulse sequence, the vesicle has recovered its original spherical shape.

5 Discussion

My results can be summarized in one sentence: DOPC GUVs are much more harder to permeabilize than real cells, with nanosecond electric pulses. Nevertheless, I want to stress that we do not have a similar method (*i.e.* with the same accuracy) to detect permeabilization in these two different kinds of objects. I tried to apply sensitive fluorescence methods, but failed. I know for sure that can be done. Another PhD student in Toulouse did so, but it took her several months to design this kind of setup, and I did not manage to do this in a few weeks here. Also, I lost much time using the first version of my home-made permeabilization chambers. It took me long to realize that these chambers were not perfect at all, and quite often subjected to electric arcs. For further studies, I would recommend to use the same chambers as Sharon does. I had difficulties producing this type of chambers, but I wish I had taken more time to manage to do it.

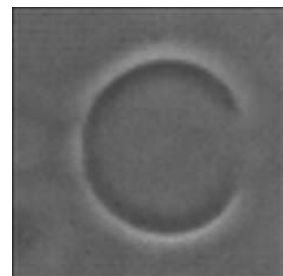
At the end of my stay I managed to see something happening when applying a train of pulses. The GUVs deformed into oblate ellipsoids, and this deformation was observed to be related to the electric field magnitude. This phenomenon is well understood in the case of sinusoidal AC fields, and a theory describing these deformations [14] agrees well with an experimental morphological phase diagram [5]. (For a more thorough discussion of this topic of vesicle deformations in electric fields, you might want to have a look at sections 2.1 and 3.1 in [4].) These deformations can be used to measure the vesicle's initial surface tension and the lipid bilayer bending modulus [15, 16]. They have also been predicted [17] and observed [18] to occur in the case of longer DC pulses. However, these observations were done with ultrafast microscopy imaging, and with a single pulse. To my knowledge, steady state deformations as shown in figure 6 have never been reported before. It would be interesting to know if the shapes I observed were the maximal deformation of the vesicles attained at the end of each pulse, or some kind of "averaged" shape. It would also be interesting to know if these deformations are truly ellipsoidal or are other types of deviations from the initial spherical shape, and if they are correctly predicted by current theories.



References

- [1] R. Dimova, S. Aranda, N. Bezlyepkina, V. Nikolov, K. A. Riske, and R. Lipowsky. A practical guide to giant vesicles. probing the membrane nanoregime via optical microscopy. *J. Phys.: Condens. Matter*, 18:S1151–S1176, 2006.
- [2] R. Dimova, K. A. Riske, S. Aranda, N. Bezlyepkina, R. L. Knorr, and R. Lipowsky. Giant vesicles in electric fields. *Soft Matter*, 3:817–827, 2007.
- [3] R. Dimova, N. Bezlyepkina, M. Domange Jordö, R. L. Knorr, K. A. Riske, M. Staykova, P.M. Vlahovska, T. Yamamoto, P. Yang, and R. Lipowsky. Vesicles in electric fields: Some novel aspects of membrane behavior. *Soft Matter*, 5:3201–3212, 2009.
- [4] T. Portet, C. Mauroy, V. Démery, T. Houles, J.-M. Escoffre, D.S. Dean, and M.-P. Rols. Destabilizing giant liposomes with electric fields: an overview of current applications. *accepted by Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Physique*.
- [5] S. Aranda, K. A. Riske, R. Lipowsky, and R. Dimova. Morphological transitions of vesicles induced by alternating electric fields. *Biophys. J.*, 95:L19–L21, 2008.
- [6] M. I. Angelova and D. S. Dimitrov. Liposome electroformation. *Faraday Discuss. Chem. Soc.*, 81:303–311, 1986.
- [7] N. Rodriguez, F. Pincet, and S. Cribier. Giant vesicles formed by gentle hydration and electroformation: a comparison by fluorescence microscopy. *Colloids Surf. B*, 42:125–130, 2005.
- [8] D.J. Estes and M. Mayer. Giant liposomes in physiological buffer using electroformation in a flow chamber. *Biochim. Biophys. Acta*, 1712:152–160, 2005.
- [9] L.-R. Montes, A. Alonso, F.M. Goñi, and L.A. Bagatolli. Giant unilamellar vesicles electroformed from native membranes and organic lipid mixtures under physiological conditions. *Biophys. J.*, 93:3548–3554, 2007.
- [10] T. Pott, H. Bouvrais, and P. Méléard. Giant unilamellar vesicle formation under physiologically relevant conditions. *Chem. Phys. Lip.*, 154:115–119, 2008.
- [11] K.S. Horgan, D.J. Estes, R. Capone, and M. Mayer. Films of agarose enable rapid formation of giant liposomes in solutions of physiologic ionic strength. *J. Am. Chem. Soc.*, 131:1810–1819, 2009.
- [12] E. Tekle, R. D. Astumian, W. A. Friauf, and P. B. Chock. Asymmetric pore distribution and loss of membrane lipid in electroporated dopc vesicles. *Biophys. J.*, 81:960–968, 2001.

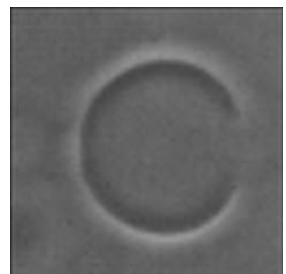
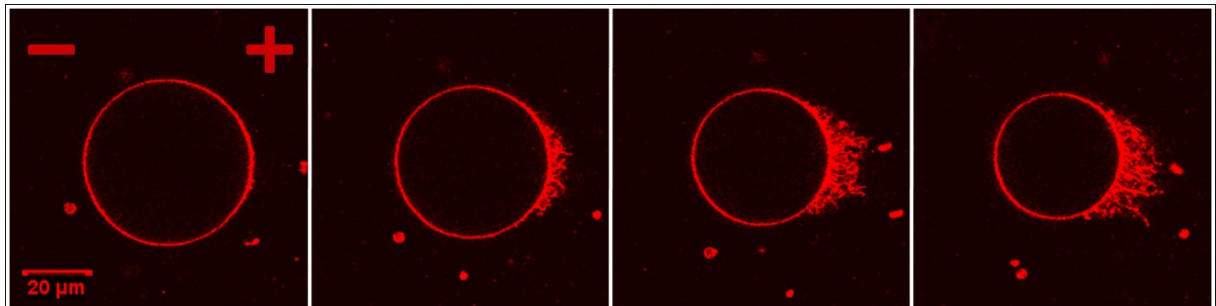
- [13] T. Portet, F. Camps, J.-M. Escoffre, C. Favard, M.-P. Rols, and D. S. Dean. Visualization of membrane loss during the shrinkage of giant vesicles under electropulsation. *Biophys. J.*, 96:4109–4121, 2009.
- [14] P. M. Vlahovska, R. S. Gracià, S. Aranda-Espinoza, and R. Dimova. Electrohydrodynamic model of vesicle deformation in alternating electric fields. *Biophys. J.*, 96:4789–4803, 2009.
- [15] M. Kummrow and W. Helfrich. Deformation of giant lipid vesicles by electric fields. *Phys. Rev. A*, 44:8356–60, 1991.
- [16] R.S. Gracià, N. Bezlyepkina, R.L. Knorr, R. Lipowsky, and R. Dimova. Effect of cholesterol on the rigidity of saturated and unsaturated membranes determined from fluctuation and electrodeformation analysis on giant vesicles. *Soft Matter*, in press.
- [17] M. Winterhalter and W. Helfrich. Deformation of spherical vesicles by electric fields. *J. Colloid Interface Sci.*, 122:583–586, 1988.
- [18] K. A. Riske and R. Dimova. Electro-deformation and poration of giant vesicles viewed with high temporal resolution. *Biophys. J.*, 88:1143–1155, 2005.



Annexe C. Travaux réalisés lors de mon séjour à Los Angeles

Annexe D

Publication sur la décroissance de taille



Visualization of Membrane Loss during the Shrinkage of Giant Vesicles under Electropulsation

Thomas Portet,^{†‡} Franc Camps i Febrer,[†] Jean-Michel Escoffre,[†] Cyril Favard,[§] Marie-Pierre Rols,[†] and David S. Dean^{†*}

[†]Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 5089, and [‡]Laboratoire de Physique Théorique, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 5152, Université Paul Sabatier, Toulouse, France; and [§]Institut Fresnel, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 6133, Marseille, France

ABSTRACT We study the effect of permeabilizing electric fields applied to two different types of giant unilamellar vesicles, the first formed from EggPC lipids and the second formed from DOPC lipids. Experiments on vesicles of both lipid types show a decrease in vesicle radius, which is interpreted as being due to lipid loss during the permeabilization process. We show that the decrease in size can be qualitatively explained as a loss of lipid area, which is proportional to the area of the vesicle that is permeabilized. Three possible modes of membrane loss were directly observed: pore formation, vesicle formation, and tubule formation.

INTRODUCTION

Electropermeabilization is a commonly used physical method in which electric pulses are applied to cells and vesicles, and has been widely reviewed in the literature (1–7). An effect of major importance is that, under certain circumstances, the electric pulses can induce the transient permeabilization of the cell plasma membrane. This permeabilization manifests itself via the crossing of the cell membrane by molecules that would normally not be able to permeate the cell membrane. When subjected to sufficiently large electric fields, vesicle membranes become permeable to small molecules (8,9) and flat membranes show a marked increase in their electrical conductance (10). Small molecules appear to cross the permeabilized membranes via simple diffusion. However, complex processes, such as electrophoresis and direct interactions with the membrane, come into play for larger molecules such as DNA. Electropermeabilization is now regularly employed as a delivery method for a large variety of molecules such as drugs, antibodies, oligonucleotides, RNA, and DNA (6,9,11–13). Initial studies were carried out *in vitro* on cells in culture, but as the technique has developed, an increasing amount of data has been obtained *in vivo* on tissues (14–16); this method is being adapted to the clinical context (17,18). Clearly the method has a huge potential in the fields of cancer treatment and gene therapy, offering, in some cases, more efficient, more controllable, and safer treatment protocols (when compared to viral transfection methods, for example). From a purely physical point of view, the application of an electric field to a lipid membrane has two notable effects. The first is a mechanical one in which the stresses caused by the field can deform the membrane; for instance, causing a spherical vesicle to deform into an ellipsoidal or

cylindrical one (19–22). This deformation can be thoroughly understood in terms of a macroscopic continuum description of the cell membrane in terms of its bulk electrical and mechanical properties. The second phenomenon of electropermeabilization is much less well understood. Despite its increasing popularity as a therapeutic method, there are still many open questions about the underlying physical mechanisms involved in electropermeabilization. Indeed, at the simplest level, the basic structural changes induced by the field on the membrane structure are still to be fully understood. A number of physical theories have been put forward to explain the phenomenon of electropermeabilization. Historically, the first explanations of electropermeabilization were based on classical continuum theories, which predict dielectric breakdown of the membrane at a critical field strength (23–28). The main problem with such theories is that, although predicting a dielectric/mechanical breakdown transition, they do not provide a description of the physical state of the permeabilized membrane. Currently, the most popular explanation for electropermeabilization is that pores are formed because of a local increase in the surface tension due to the electric field (29–33). This increase in surface tension energetically favors the formation of pores, which is otherwise energetically disfavored by their line tension. A similar theory was first introduced to explain the rupture of soap films (34). In this theory, the pores can become stabilized in a hydrophobic-to-hydrophilic pore transition via the rearrangement of the lipids at the pore edges. Because the permeabilization is explained by the formation of pores, the phenomenon described by this theory is referred to as electroporation. Recently, numerical simulations have confirmed that pores can be induced by strong electric fields (35–41); typically, the systems simulated are small, and no significant lipid loss during pore formation has been reported.

Submitted May 29, 2008, and accepted for publication February 20, 2009.

*Correspondence: dean@irsamc.ups-tlse.fr

Editor: Petra Schwillie.

© 2009 by the Biophysical Society
0006-3495/09/05/4109/13 \$2.00

doi: 10.1016/j.bpj.2009.02.063

When discussing the phenomenon of electropermeabilization, we must distinguish between two key stages of the process:

Step 1. The physical change induced in the membrane by the field (in the absence of molecules to be transported).

Step 2. The interaction of the molecules that are to be transported with the modified membrane.

At the simplest level, combination of Steps 1 and 2 can be observed experimentally as a transport phenomenon using marked molecules or via conductivity experiments. In this article, we demonstrate that Step 1 can be indirectly detected via a change in the size of giant liposomes under electropulsation and an associated direct visualization of the expulsion of lipids from the liposomes. Concretely we study the effect of a series of permeabilizing pulses, well separated in time, on the size of giant unilamellar vesicles (GUVs). In the experiments, the radius of the GUV is measured after each pulse and we find that each GUV studied shows, on average, a decrease in its radius down to a critical radius beyond which its size no longer changes. This decrease in size points to the fact that, during the physical processes leading to electropermeabilization, lipids are lost from the vesicle—thus leading to a reduction in their size.

Our experiments are not a direct study of permeabilization; however, they constitute an indirect method of studying electropermeabilization that is relatively straightforward to carry out and interpret in terms of simple physical models that are relatively well established. From an experimental point of view, the crucial advantage of using GUVs is that their composition can be varied and controlled, and in addition, their membrane is not subjected to internal mechanical constraints, as is the case for living cells with cellular cytoskeletons. Furthermore, their size is similar to that of mammalian cells, which allows a direct visualization by an optical microscope.

Lipid loss during electropermeabilization seems likely as if, for instance, pores are formed the lipids near the edges of these pores will be subject to strong variations in the local electric potential and the electric field. Charges and dipole moments on lipids will interact strongly with the electric field and variations of the electric field, respectively. The forces involved may well be capable of tearing lipids from the membrane structure. However, our experiments suggest that the mechanism of lipid loss is a collective one, which involves the formation of small structures such as tubules and vesicles as well as pores. A simple comparison of electrostatic (dipole electric field interaction) energy and hydrophobic free energy suggests that individual lipids cannot be removed from the membrane.

The phenomenon of lipid loss due to an applied field has previously been studied in Tekle et al. (42) but from quite a different point of view (in that study, the effect of single pulses was examined). DOPC vesicles of sizes of $\sim 20 \mu\text{m}$

TABLE 1 Abbreviations used

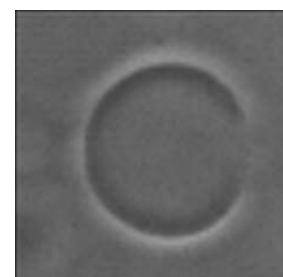
a	Membrane thickness.
a_e	Membrane electrical thickness.
A	Area of the vesicle.
A_p	Permeabilized area.
C	Constant depending on R , a , and the various conductivities of the problem.
DiI C_{18}	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate.
DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine.
EggPC	L- α -Phosphatidylcholine (egg, chicken).
E	Magnitude of the applied electric field.
l	Length of the hydrocarbon chain.
N_c	Number of pulses needed to enter the shrinking regime.
p	Dipole moment of the PC headgroup.
PR	Preshrinking regime.
q	Probability that one pulse induces a transition from the pre-shrinking to the shrinking regime.
R_c	Critical radius.
λ	Fraction of the permeabilized area lost per pulse.
Rhodamine PE	L- α -Phosphatidylethanolamine- <i>n</i> -(Egg Lissamine Rhodamine PE).
$R(n)$	Radius of the vesicle after n pulses.
W_c	Rescaled critical radius, $R_c/R(0)$
SR	Shrinking regime.
$W(n)$	Rescaled radius of the vesicle after n pulses, $R(n)/R(0)$
$\Delta\Psi$	Transmembrane voltage.
$\Delta\Psi_0$	Initial transmembrane voltage induced by the first pulse at the poles of the liposomes.
$\Delta\Psi_c$	Critical transmembrane voltage n : number of pulses.
θ	Angle on the cell surface with respect to the direction of the applied field.
θ_c	Critical angle.
Σ_0	Initial surface tension.
Σ_{et}	Surface tension induced by the electric field.
Σ_{lys}	Lysis tension.
ϵ_m	Membrane dielectric constant.
ρ	Effective radius of the lipid hydrocarbon tail viewed as a cylinder.
μ	Lipid tail hydrophobic free energy per unit of area.

were subjected to pulsed electric fields of $\sim 1 \text{ kV/cm}$ and duration $700 \mu\text{s}$. The vesicles were observed using a standard fluorescent microscope and at the cathode-facing side, single pores of the size of $\sim 7 \mu\text{m}$ were observed. Such pores were, however, seldom found on the anode-facing side. However, it was inferred that this side was also permeabilized but that the pores responsible were too small to be observed. In the experiments, it was also noted that up to 14% of the vesicle surface could be lost during the process of pore formation/permeabilization.

See Table 1 for a list of terms and parameters used in this article.

EXPERIMENTAL SETUP

We decided to work with two different lipids. However, we wanted phospholipids with identical head groups to obtain the same dipole behavior. Thus, we used DOPC and EggPC, purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). The formation medium is an aqueous solution with 240 mM sucrose. The pulsation buffer is an aqueous solution of 260 mM glucose



that also contains 1 mM phosphate buffer $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (Merck, Darmstadt, Germany) to impose a physiological pH of 7.4, and 1 mM sodium chloride (Prolabo, Briare, France) to achieve an electrical conductivity in the range of a few hundreds of $\mu\text{S}/\text{cm}$. Conductivities of internal and external solutions are measured with an HI 8820 conductimeter (Hanna Instruments, Lingolsheim, France), and have the values $\sigma_i \approx 15 \mu\text{S}/\text{cm}$ and $\sigma_e \approx 460 \mu\text{S}/\text{cm}$, respectively. The osmolarities are 285 mOsm/kg for the formation medium, and 305 mOsm/kg for the pulsation buffer. These measurements were performed with an Osmomat 030 osmometer (Gonotec, Berlin, Germany). The different refractive indexes of the internal and external media yields a contrast which enables the vesicles to be visualized using a microscope, and the density difference allows the sedimentation of the vesicles on the bottom of the chamber, thus reducing their distance from the objective. EggPC liposomes are visualized by phase contrast, and DOPC liposomes by fluorescence microscopy. We worked with two different dyes (Rhodamine PE (Avanti Polar Lipids) and DiIC₁₈ (Molecular Probes, Eugene, OR)) without any noticeable change in our experimental results. The vesicle formation method employed here is electroformation, as described in Angelova and Dimitrov (43). We chose this technique because it is simple, easily reproducible, and has a good yield. Furthermore, a large amount of the produced vesicles is unilamellar, as demonstrated in Rodriguez et al. (44).

Electroformation

Lipid solution

The lipids are diluted in chloroform, at a mass concentration of 0.5 mg/mL. For DOPC vesicles, the fluorescent probe is added at 0.005 mg/mL. This preparation and the following steps can be performed at room temperature, because the gel-phase/liquid-phase transition temperature of the lipids used is much lower.

Formation chamber

The chamber is made of two glass layers covered with Indium Tin Oxide to ensure the electrical conductivity of the surface. The two layers are separated by an adhesive silicone joint of 1 mm width. The connection with the generator (model 128, AC Exact; Hillsboro, OR) is maintained by two wires, each one soldered on a small copper strip stuck on the ITO slide. Then, 15 μL of lipid solution is deposited on the conducting sides of the glass slides. The deposition is carried out slowly and at constant rate in a chamber held at 4°C to slowly evaporate the chloroform and then the slides are dried under vacuum for a couple of hours to entirely remove the remaining solvent molecules.

Finally, the slides are sealed together, and the chamber is filled with the formation medium.

Voltage application

We apply a sinusoidal voltage of 25 mV peak to peak at 8 Hz. The voltage is increased by 100 mV steps every 5 min, up to a value of 1225 mV. It is maintained under these conditions overnight. Next, we apply a square wave of same amplitude at 4 Hz for 1 h to detach the liposomes from the slides.

Electropulsation

Pulsation chamber

The chamber where the GUVs are subjected to the electric field is composed of a glass slide and a coverslip. Two parallel copper strips of thickness 70 μm are stuck on the slide at a distance of 1-cm apart. The coverslip is then stuck onto the slide and strips with heated parafilm. The chamber is 1-cm long (between electrodes), 2.6-cm wide (width of the coverslip), and 250- μm high (value estimated via measurements with a microscope). We first introduce 60 μL of pulsation buffer between the slide and the coverslip, while taking care of filling the whole chamber to ensure the conductivity of

our medium. Next, we add 5 μL of our GUV preparation. Capillarity phenomena prevent the solution from leaking out of the chamber.

The electrode thickness is about the size of our biggest liposomes, which represents only a quarter of the chamber height. We could not a priori be certain of the homogeneity of the field. However, we solved numerically Laplace's equation with the finite element software Comsol Multiphysics (Comsol, Burlington, MA) for the case of our geometry. We found that the field was almost homogeneous in the bottom part of the chamber between the electrodes, and that the size and shape of the permeabilized area were not significantly different from that computed for a geometry with much bigger electrodes (data not shown).

Pulsation method

Electropulsation is carried out using a CNRS cell electropulsator (Jouan, St. Herblain, France), which delivered square-wave electric pulses. An oscilloscope (Enertec, St. Etienne, France) is used to monitor the pulse shape and amplitude. The process of electropulsation is performed directly under the microscope. For the phase contrast visualization, we used an inverted epifluorescence microscope (Leica model No. DM IRB; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with a camera (Princeton model No. RTE/CCD-1317-K/0; Princeton Instruments, Trenton, NJ) and a 40 \times Leica phase contrast objective, and an inverted confocal microscope (Zeiss model No. LSM 510; Carl Zeiss, Jena, Germany) with a 63 \times Zeiss objective for fluorescence imaging. Excitation at 543 nm was provided by a HeNe laser, and emission filter was a 560-nm long-pass. The pulse duration was not set to a few hundreds of microseconds as in the literature (21,22,42), but to 5 ms, because this value is commonly used for gene transfer protocols in mammalian cells (9). In most cases, we apply pulses at 0.5 Hz. However, we sometimes have to interrupt the pulse train for a few seconds to recenter the image on the liposome of interest. Indeed, the observed vesicle does not always stay immobile. It often experiences a translational motion toward the positive electrode, because of which we sometimes have to modify the centering. This displacement was always directed toward the anode, irrespective of the net electric charge of the fluorescent probe that we used (negative for Rhodamine PE and positive for DiIC₁₈). As we will see later, the direction of this motion is coherent with the sign of the ζ -potentials of the vesicles, which does not depend on the type of dye chosen. Due to the need to recenter the image from time to time, the frequency of the pulses is not constant over a whole experiment, but we checked that this did not affect our results. The time delay between two consecutive pulses is of the same order of magnitude, ranging from 2 s to a few tens of seconds. This duration seems to be much longer than the time needed by the vesicle to relax after one pulse, therefore it does not matter if pulses are separated by 2 or 20 s. Direct observation showed that vesicles were distorted rapidly after the pulse application, but as far as the eye could see, there was no visible size or shape change between two consecutive pulses. The pulse amplitude is chosen according to the rule $ED = (4/3)\Delta\Psi_0 = \text{Const}$ (see details later for this choice), where E denotes the amplitude of the electric field, and D the initial diameter of the GUV. The constant is chosen to be 1.7 V. This choice means that at the beginning of every experiment the potential difference drop, $\Delta\Psi_0$, across the GUV membrane at the poles facing the electrodes is theoretically (see later) equal to ~ 1.3 V; this value is well beyond the value of 200 mV typically cited as the permeabilization threshold for Chinese hamster ovary cells (45,46) and of the order of that cited for artificial vesicles and other cell types (3,26,47). In the pulsation chamber, the distance between the electrodes is 1 cm and so the potential applied between the electrodes is $1.7/D$ V, where D is measured in centimeters or conveniently $17/D$ kV if we measure D in μm . The idea behind this large choice of initial transmembrane potential $\Delta\Psi_0$ is that the field will initially permeabilize the membrane and continue to do so until the vesicle size becomes significantly smaller than the initial one. We note that our protocol yields initial transmembrane potentials that are slightly lower but of the same order as those in the experiments of Tekle et al. (42), which varied between 1.4 and 2.5 V.

The experimental strategy is simple. We focus on a liposome and we measure its initial diameter. We then tune the voltage amplitude according

to the rule described above, and we apply a pulse train until the GUV does not shrink anymore. We acquire one image between two consecutive pulses (~ 1 s after each pulse), so we are sure that the vesicle has experienced an electric pulse between two consecutive values of the diameters we measure. Image processing tasks are performed with ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

ζ -Potentials measurements

We measured the average ζ -potentials of our GUVs by photon correlation spectroscopy (Zetasizer 3000 HS; Malvern, Worcestershire, United Kingdom), using the following method. We diluted 1 mL of the GUV solution obtained after electroformation in 2 mL of a special buffer containing 240 mM sucrose, 1.5 mM phosphate buffer, and 1.5 mM sodium chloride. Vesicles are thus suspended in a medium containing 1 mM sodium chloride, 1 mM phosphate buffer, and 240 mM sucrose. This composition is the same as that of our pulsation medium, except for the 260 mM glucose replaced by 240 mM sucrose to avoid sedimentation of the vesicles, which would make the measurement impossible. We then split the 3 mL into two samples, on which we performed two series of 10 measurements each.

THEORY

The basic theory that explains electroporation is based on the modeling of the vesicle electrode system in terms of a weakly conductive cell membrane of conductivity denoted by σ_m , with external and internal media of much higher conductivities denoted by σ_e and σ_i , respectively. We denote by R the radius of the vesicle assumed spherical, and which stays spherical throughout the experiments. In our experiments, R lies typically between 10 and 100 μm . The thickness of the vesicle membrane is denoted by a and typically has the value of 4 nm. In the steady state, which is achieved on time-scales much shorter than the time over which the pulse is applied, the electric potential Ψ obeys Laplace's equation, and if θ denotes the angle on the cell surface with respect to the direction of the applied field, which is of magnitude E , then the potential drop across the membrane at that point is given by (see (1) for instance for a detailed derivation)

$$\Delta\Psi = -CRE \cos(\theta), \quad (1)$$

where C is a constant depending on R , a , and the various conductivities of the problem. In the limits where $\sigma_m \ll \sigma_i$, $\sigma_m \ll \sigma_e$, and $a \ll R$, the constant C becomes very simple and takes the value $C = 3/2$. For the parameters of the experiments carried out here, we are close to the limit where C takes this limiting value. The most important point for our analysis here is that C is independent of R . We thus find that, for a thin membrane, the electric field inside the membrane and normal to its surface, denoted by E_n , is given by

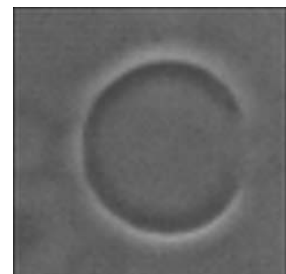
$$E_n(\theta) = \frac{CRE \cos(\theta)}{a}. \quad (2)$$

Equation 2 demonstrates that there is a huge amplification of the externally applied field across the membrane. This huge electric field internal to the membrane causes structural changes. Whether this structural change corresponds to the formation of pores, dielectric breakdown, or the formation

of defects or vesicles, is still open to debate. However, in experiments where permeabilization is measured either via conductivity measurements of planar membranes or by direct optical observation of the entry of marker molecules, a consensus exists that permeabilization occurs locally in the membrane when the magnitude of the potential drop across the membrane $\Delta\Psi$ exceeds a certain threshold $\Delta\Psi_c$, which is estimated to be $\sim 0.25\text{--}1.0$ V (3,26,45–47). This corresponds to a field within the membrane of $\sim 50\text{--}250,000$ kV/m (for a membrane of thickness 4 nm). This critical threshold is seemingly quite universal, being largely independent of cell and vesicle composition. There is an alternative though largely equivalent physical explanation of field-induced breakdown of the membrane. The effect of a local potential drop $\Delta\Psi$ across the membrane is to induce a local electrical surface tension Σ_{el} , which can be computed via the Maxwell stress tensor and is given by $\Sigma_{el} = \epsilon_m \Delta\Psi^2 a / 2a_e^2$, where ϵ_m is the dielectric constant of the membrane, a is its thickness, and a_e its electrical thickness (7,26). If the initial surface tension of the membrane is Σ_0 , then, upon applying the field, the total tension is $\Sigma = \Sigma_0 + \Sigma_{el}$. The tension of rupture of a lipid membrane is called the lysis tension Σ_{lys} and thus, when the local tension Σ exceeds Σ_{lys} , we expect the membrane to be destabilized. This formulation is strictly equivalent to the existence of a critical value of the local electric field in the membrane at which breakdown will occur. However, in this formulation we see that $\Delta\Psi_c$ will depend on the initial surface tension of the vesicle Σ_0 . Indeed, such a dependence on Σ_0 has been reported experimentally (21). In terms of the initial and lysis tension, the critical potential is given by

$$\Delta\Psi_c = \sqrt{\frac{2a_e^2}{\epsilon_m a} (\Sigma_{lys} - \Sigma_0)}, \quad (3)$$

and thus, we see that the value of the applied field required to affect the membrane will depend on the initial tension of the vesicle. In our study, we are interested in the mechanism of lipid loss, and the $\Delta\Psi_c$ that induces lipid loss does not necessarily correspond to that necessary to induce permeabilization; however, it is reasonable to expect that the two critical potentials have the same order of magnitude. Studies of electroporation phenomena show that the critical potential depends on the duration of the applied pulse, the critical potential being smaller for longer pulses (11). This means that the underlying physical mechanisms rely on activated processes such as nucleation events for first-order phase transitions. This means that an applied pulse may have no effect with some probability, and this probability should decrease with the amplitude and duration of the pulse. In our experimental setup, the liposomes are visibly under an initial tension, and we expect that there is some distribution of initial tensions even for vesicles of the same composition and similar sizes. The critical potential for each vesicle should therefore be expected to vary.



As we are looking at vesicles, we can neglect any possible modification of the transmembrane potential due to cellular activity and thus assume that it is given purely by Eq. 1. Assuming that the mechanical and electric membrane thickness a and a_c remains constant, there is a critical transmembrane potential drop beyond which the membrane becomes permeabilized or susceptible to lipid loss. Clearly, at fixed electric field parameters (amplitude and duration), a cell can no longer be permeabilized when its radius is smaller than a certain critical radius R_c , beyond which no part of the cell is permeabilized. We thus expect that the permeabilization and thus, vesicle shrinkage will stop once the vesicle has this critical radius. The region where the magnitude of $\Delta\Psi$ is maximal is clearly that facing the electrodes, corresponding to $\theta = 0$ and $\theta = \pi$, and so these are the last points where the membrane is permeabilizable. The value of R_c is thus given by

$$\Delta\Psi_c = CER_c. \quad (4)$$

If we are in the situation where $R > R_c$, then about the pole at $\theta = 0$ the region where θ is between 0 and θ_c is permeabilized and θ_c is given by

$$\theta_c = \arccos\left(\frac{\Delta\Psi_c}{CRE}\right). \quad (5)$$

This region gives one-half of the total permeabilized area of the vesicle, which we denote by A_p . We thus find that

$$\frac{1}{2}A_p = 2\pi \int_0^{\theta_c} R^2 \sin(\theta) d\theta = 2\pi R^2 \left(1 - \frac{R_c}{R}\right). \quad (6)$$

Now we consider how the area loss upon a pulsation can be related to the physical parameters of the system. The simplest idea is to assume that the area lost is simply proportional to the permeabilized membrane area. This does not presuppose the mechanism of lipid loss; we simply assume that, in the region where the field exceeds the critical value, the membrane structure is altered. This alteration can be interpreted as a form of dielectric breakdown, and where it occurs, we assume that lipids can be effectively lost from the membrane surface.

If n denotes the number of pulses, treating n as a continuous variable, we can write that, on average,

$$\frac{dA}{dn} = -\lambda A_p, \quad (7)$$

that is to say, the average area lost per pulse is simply proportional to the area where the critical membrane potential (or equivalently surface tension) is exceeded. Note that we should really use a discrete difference equation rather than the continuous one above; however, we have, numerically, checked that the difference behavior is insignificant when compared to the typical experimental errors. Now if we assume that $\Delta\Psi_c$ remains constant throughout the experiment, Eq. 7 can be solved using $A = 4\pi R^2$ to obtain

$$R(n) = R_c + (R(0) - R_c) \exp\left(-\frac{\lambda}{2} n\right). \quad (8)$$

Thus, we expect an exponential decay to the critical value of R_c , as given by Eq. 4. If we define the dimensionless variable

$$W(n) = \frac{R(n)}{R(0)}, \quad (9)$$

then $W(n)$ obeys

$$W(n) = W_c + (1 - W_c) \exp\left(-\frac{\lambda}{2} n\right), \quad (10)$$

and W_c is the asymptotic value of W after a large number of pulses have been applied and beyond which the vesicle is no longer permeabilizable; it is given by

$$W_c = \frac{R_c}{R(0)} = \frac{\Delta\Psi_c}{CER(0)}. \quad (11)$$

Now, in the experiments, if we choose to apply fields E such that $ER(0)$ is constant, then if $\Delta\Psi_c$ and C are constant we find that

$$W_c = \frac{\Delta\Psi_c}{\Delta\Psi_0}, \quad (12)$$

where $\Delta\Psi_0$ is the initial experimentally imposed potential drop at the poles of the cells and is by construction (i.e., via the choice of E) the same for all vesicles. With this choice of E , all plots of W as a function of the number of pulses n should collapse onto the same curve if $\Delta\Psi_c$ remains constant during the experiment and if it is the same for all vesicles. All plots will have $W(0) = 1$, and should attain the asymptotic value W_c after the same characteristic number of pulses (as we have assumed that λ is independent of R).

We stress here that, if $ER(0)$ is taken to be constant, then the normal component of the electric field within the membrane is the same for every vesicle studied at the beginning of each experiment and thus, independently of any theory used to analyze the results, we are always looking at systems where the local electric fields in the membranes are the same.

Clearly three sources of additional complexity are neglected in the above analysis:

1. The surface tension will fluctuate during the permeabilization/lipid loss process.
2. The local electric field seen by the vesicles will fluctuate due to the presence of other vesicles (48).
3. We shall see in the section on experimental results that several mechanisms can be involved in the process of lipid loss (pore, vesicle, and tubule formation) and clearly, the choice of a single fitting parameter for lipid loss per permeabilized area λ is another simplification. Indeed, λ should be interpreted as an average area loss

parameter due to the (at least) three visualized mechanisms of lipid expulsion.

The initial surface tension (which will have some distribution about an average value) will also play a role in the initiation of the permeabilization and lipid loss process. The extent to which the vesicle retains a memory of this initial tension, is an important point. If, after each pulse, it had the same tension, then the distribution of the values of W_c would be a direct reflection of this initial surface tension distribution. However, it is likely that the tension will vary after each pulse and indeed, that the tension is a dynamical variable. Our experimental results imply that the reduction of the radius is due to expulsion of lipid from the main vesicle, but that some expelled lipid is still in contact with the main vesicle (as in the case of tubules). These attached lipids will constitute a reservoir, which will modify the effective surface tension of the main vesicle, and this tension itself will evolve if the system has not had time to equilibrate between pulses. We conclude that, in fitting the data with the simple model presented here, we should find a scatter in the resulting values of λ and W_c due to points 1–3, mentioned above.

EXPERIMENTAL RESULTS

Observations and data fitting

The existence of the critical radius R_c was confirmed by the two following observations:

Observation 1. After a sufficiently large number of pulses had been applied, all the vesicles we could find in our sample had sizes lower than the one of the initial liposome of interest.

Observation 2. We noticed that a liposome that had reached its critical radius could experience another shrinkage if the field magnitude was increased.

We should mention that we sometimes saw vesicles disintegrating, and thus we could not observe the size stabilization. We only kept data corresponding to shrinking and stabilizing GUVs, and we finally gathered 51 data sets for DOPC and 47 for EggPC. Another fact that must be mentioned is the following. In some cases, the size diminution did not begin immediately after the first pulse. We had to apply several electric pulses before being able to detect radius decrease. A possible explanation for this fact is that, like the permeabilization process, the mechanism for lipid loss requires a change in the physical state of the membrane—the formation of defects or pores, for example. The effect of the field is therefore twofold; it allows for the formation of defects, and once defects are present, the field, along with the presence of the defects, allows for lipid loss. We may assume that the creation of defects is an activated process, and at each pulse, the membrane develops defects with some probability q . Note that we assume it is only the

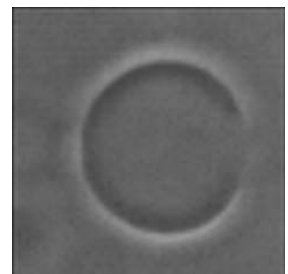
defect creation process that has this probabilistic nature (once the vesicle size has begun to decrease, lipids are expelled after each pulse as long as the vesicle radius is $>R_c$). To describe this phenomenon, we suppose that one vesicle can be found either in a preshrinking (no defects) or in a shrinking (with defects) regime (preshrinking regime, i.e., PR or shrinking regime, i.e., SR, respectively), the transition to the SR after a pulse being a stochastic event occurring with constant probability q , independent of the number of pulses applied before. This hypothesis of a random event is legitimate because our model should incorporate the intrinsic stochastic nature of permeabilization processes (3). The fact that q does not depend on n is justified if we assume that a vesicle having experienced a harmless pulse recovers the same state it had in the PR. Within this modified framework, the former expression of the scaled variable $W(n)$ (Eq. 10) now reads

$$W(n) = H(N_c - n - 1) + H(n + 1 - N_c) \left[W_c^{\text{fit}} + (1 - W_c^{\text{fit}}) \exp\left(-\frac{\lambda^{\text{fit}}}{2}n\right) \right], \quad (13)$$

where H denotes a Heaviside function taking the value 1 for a positive argument and 0 otherwise, and N_c the critical number of pulses needed before entrance in the SR. This means that the fitted curve will be constant up until N_c , and then decay exponentially after $n = N_c$. We have denoted the critical value of W_c given by the fit as W_c^{fit} and the effective value of λ estimated from fitting is denoted by λ^{fit} . In terms of our theory, we expect the average value of W_c^{fit} to be concentrated at W_c with fluctuations around this value. All fits were performed with the formula given by Eq. 13, so we obtained values of N_c , W_c^{fit} , and λ^{fit} for each of the 51 DOPC data sets. With assumptions described above, the random variable N_c should follow a geometric (discrete and memory-less) distribution. We checked this by plotting the normalized histogram of N_c , and as Fig. 1 shows, the values of N_c are well fitted by a geometric distribution of the form

$$\text{Probability}(N_c = n) = q(1 - q)^{n-1}. \quad (14)$$

The shown fit yields the value $q = 0.33$, which means that N_c has the average value $\langle N_c \rangle = 1/q = 3$. In Fig. 2, we present four examples of data sets (*crosses*) and associated fits (*full lines*). Diamond marks correspond to the images shown later in Figs. 5 and 6 depicting the different mechanisms of lipid loss (see details below). Except for liposome C that immediately starts to shrink, we can clearly identify the PRs, the SRs, and the stabilization of sizes. Detailed information about pulse spacing for data from Fig. 2, which is not constant over a whole experiment because of the lateral motion of the vesicles, can be found in Table S1 in the Supporting Material.



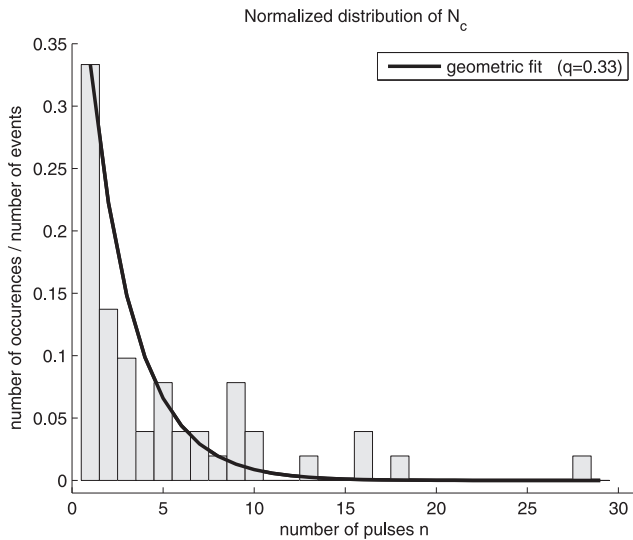


FIGURE 1 Normalized distribution of the values of N_c obtained after fitting of experimental data for DOPC vesicles. Solid line is a fit to a geometric distribution of the form given in Eq. 14, yielding the value $q = 0.33$.

Quantitative analysis—DOPC

As a first step in our data analysis, we can take the average of all the experimental curves and then carry out a fit; this yields the values $\lambda = 0.16$ and $W_c = 0.65$. The fit also yields the number of pulses necessary to put the liposome in the active state, where lipid loss can be induced, to be $N_c = 1.73$. The experimental data was also examined to see whether there was any correlation between the fitted value of W_c and λ with the initial vesicle radius $R(0)$. No appreciable correlation was seen, thus validating our hypothesis that the vesicle shrinkage can be well described in terms of the rescaled (dimensionless) quantity $W(n)$. A second way to estimate the parameters of the model is to fit λ and W_c for each curve individually to obtain $\langle \lambda^{\text{fit}} \rangle$, $\langle W_c^{\text{fit}} \rangle$, and $\langle N_c \rangle$, with the average value of the fitting parameters averaged over the individual experiments. The values obtained were $\langle \lambda^{\text{fit}} \rangle = 0.25$, $\langle W_c^{\text{fit}} \rangle = 0.58$, and $\langle N_c \rangle = 4.99$. This value of $\langle N_c \rangle$

agrees well with that of 3, estimated by the geometric distribution fit to the histogram of the fitted values for N_c .

Figs. 3 and 4 show the histograms of λ^{fit} and W_c^{fit} , respectively. As mentioned in the section called Theory, in fitting the data with our simple model we should expect to see variation in the values of λ and W_c obtained due to fluctuations of the surface tension (both initial and during the permeabilization process), local electric field, and possibly the effective number of defects created after the N_c pulses needed to enter into the permeabilized state. We note that it has been demonstrated in the literature (21,22) that the critical potential necessary to induce permeabilization is indeed dependent on the surface tension.

Quantitative analysis—EggPC

The experiments with EggPC were performed first and at that time, we had not yet made the considerations about the PR and the SR. We only kept data sets corresponding to immediately shrinking vesicles, therefore in this section $N_c = 1$ for each liposome. Despite this simplification, we did the same data processing as that described for DOPC. The fit on the average of all experimental curves yields the values $\lambda = 0.27$ and $W_c = 0.77$. The values of the fitting parameters averaged over the individual experiments are $\langle \lambda^{\text{fit}} \rangle = 0.31$ and $\langle W_c^{\text{fit}} \rangle = 0.69$.

About the anode-directed motion of the vesicles

The translational motion we observed was always directed toward the anode, suggesting that the GUVs could carry a net negative charge, even with a positively charged fluorescent dye. We checked this by measuring the ζ -potential of the vesicles in a medium with ionic composition equivalent to that of our pulsation medium, the sugar composition being different to avoid vesicle sedimentation making the measure impossible. We examined four different types of vesicles: EggPC alone, DOPC alone, DOPC labeled with Rhodamine PE, and DOPC labeled with DiI_{C18}. We did not use EggPC vesicles with a fluorescent dye, because our experiments

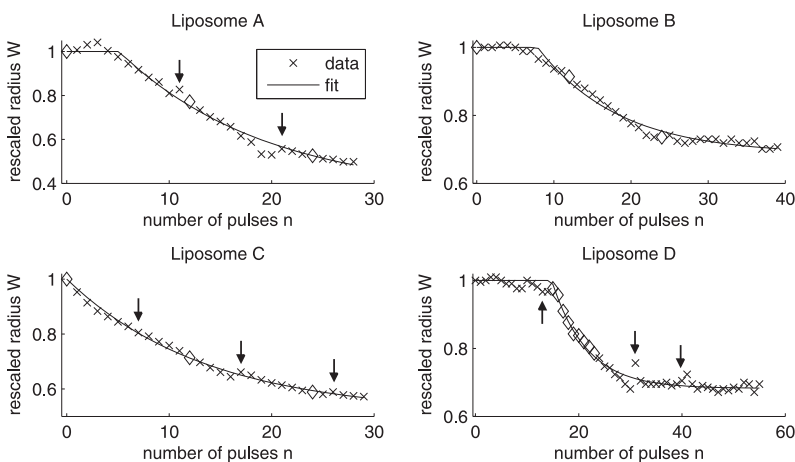


FIGURE 2 Examples of experimental data and corresponding fits for DOPC liposomes. (Top left) Liposome A; fit results are $N_c = 6$, $\lambda = 0.13$, and $W_c^{\text{fit}} = 0.35$. (Top right) Liposome B; fit results are $N_c = 9$, $\lambda = 0.19$, and $W_c^{\text{fit}} = 0.69$. (Bottom left) Liposome C; fit results are $N_c = 1$, $\lambda = 0.15$, and $W_c^{\text{fit}} = 0.51$. (Bottom right) Liposome D; fit results are $N_c = 16$, $\lambda = 0.30$, and $W_c^{\text{fit}} = 0.68$. Pulse magnitudes are 290, 360, 235, and 300 V/cm, respectively. Pulse duration is 5 ms. Arrows, if present, indicate data just before which we had to recenter the image on the liposome of interest. There is thus a time interval of ≈ 10 s before the indicated point, instead of 2 s as in all other cases.

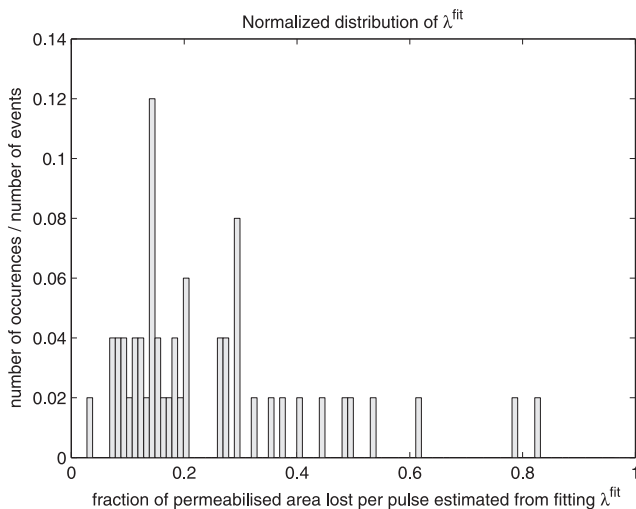


FIGURE 3 Distribution of the values of λ^{fit} obtained after data fitting for DOPC liposomes.

involving EggPC were performed via phase contrast microscopy, without any probe.

For all four vesicle compositions, we find an average ζ -potential of ~ -20 mV, a value in agreement with that found in Carvalho et al. (49) for DOPC GUVs, and whose sign is consistent with our observations. This corresponds to a negligible negative surface charge for the GUVs, < 1 elementary charge per thousand of lipids. This residual electric charge possibly due to lipid impurities manifests itself only via the anode-directed motion of the vesicles, because of the large magnitude of the applied electric field.

About the initial pH asymmetry

Internal and external media of our GUVs were not at the same pH conditions (6.6 and 7.4, respectively). It was thus

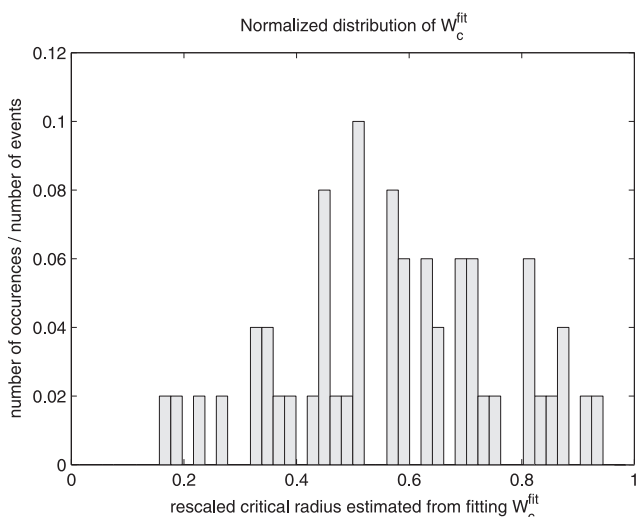


FIGURE 4 Distribution of the values of W_c^{fit} obtained after data fitting for DOPC liposomes.

questionable whether this pH asymmetry had any significant influence in our experiments. The answer is no, based on the three following arguments. First, it is true that local pH gradients can induce the formation of tubular structures (50). However, such gradients have a magnitude of ~ 4 pH units, much higher than our 0.8 pH units. Second, as can be seen on our phase contrast images (data not shown), GUVs become permeabilized during pulsation, and experience a mixing of their internal and external media. Thus, the initial pH asymmetry should disappear after a few permeabilizing pulses. Third, the observation that the vesicles are stable and do not exhibit any shape changes until the electric field is applied corroborates the fact that the initial pH asymmetry of our GUVs has no significant effect.

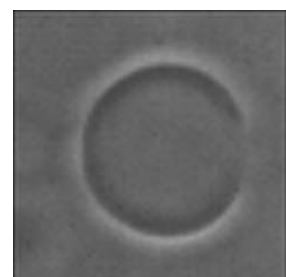
Mechanisms of lipid loss

One of the most fascinating aspects of the experiments is the wide variety of mechanisms of lipid loss that can be observed. Three different mechanisms of lipid loss are observed when the lipids are fluorescently marked, as is the case on our experiments on DOPC liposomes (these observed mechanisms do not show any appreciable dependence on the probe employed). (We emphasize here that the term “lipid loss” implies loss of lipid from the bulk spherical part of the vesicle; the lipid ejected appears, in most cases, to remain attached to or close to the parent vesicle.)

The three basic mechanisms are shown in Figs. 5 and 6. Images were taken with the confocal microscope.

The first and most frequent mechanism is the formation of small vesicles at both the anode- and cathode-facing poles. Those vesicles are mainly thrown out of the GUVs, but some of them were also driven inside the GUVs. Liposomes A and C of Fig. 5 lost their lipids in such a manner (Movie S1 in the Supporting Material shows that mechanism for another GUV). Interestingly, a similar phenomenon has been reported when high-frequency alternating electric fields are applied to sea urchin eggs (51)—firstly, the cell is deformed and elongated by the field; and secondly, this cell splits into two smaller cells and a number of much smaller vesicles.

The second phenomenon we could observe (see photographs for liposome B in Fig. 5) was the creation of lipid tubules on the exterior of the anode-facing hemisphere (Movie S2 shows that mechanism for liposome B). DOPC molecules expelled from the membrane rearranged in the form of tubular structures, whose lengths grew with the number of applied pulses. These structures initiated from the pole facing the positive electrode and remained attached to the vesicle. However, they then appeared to diffuse away from the pole toward the equator (while remaining attached to the membrane) and appeared to cover most of the anode-facing hemisphere, as shown in Fig. 5. We also saw on the cathode-facing side of Fig. 6 that tubules can grow on the interior surface of the liposome. These structures also diffuse toward the equatorial regions, the number and size of tubules,



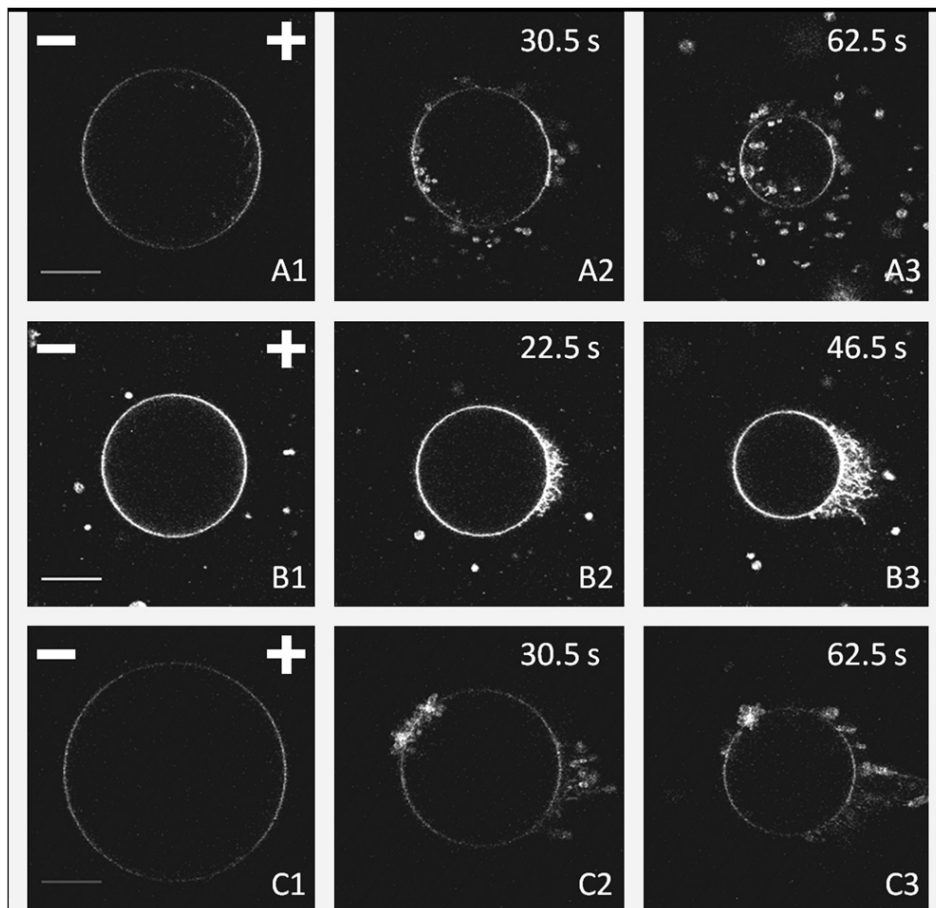


FIGURE 5 Images of liposomes A, B, and C, composed of DOPC and labeled with Rhodamine PE, at times indicated by the diamonds in Fig. 2, corresponding to 0, 12, and 24 applied pulses. Liposomes A and C lose lipids by formation of vesicles, and liposome B by formation of tubules. Scalebars (20- μm length) and positions of the electrodes appear in the first photograph of each vesicle. Pulse magnitudes are 290, 360, and 235 V/cm, respectively. Pulse duration is 5 ms. Times in upper-right corners indicate when images were acquired, the time origin being the onset of the first pulse. No time indication means that the picture was taken before the first pulse.

however, being smaller. This mechanism of tubule formation appears to be stronger on the anode-facing hemisphere.

Finally, we also noticed the presence of pores on the cathode-facing hemisphere (as did (42)). This was a quite rare observation, but it is normal because our acquisition times were of a few hundreds of milliseconds, the same order of magnitude as the lifetimes of such pores (42). Liposome D, which has entered the SR after 16 pulses, is found to have pores after 16 and 18 pulses, as shown by images D2 and D4 of Fig. 6. On the next images, we can see the beginning of the formation of the tubular structures described previously. We thus conclude that those two mechanisms could occur together for a same vesicle. The fact that we detected only a few GUVs exhibiting pore formation is certainly due to the too-low acquisition speed of our experimental setup. Recently, it has been shown that pore formation can be induced in vesicles by solubilizing the membrane (52), and that this process of pore formation is also associated with membrane loss and thus, vesicle shrinkage. An animation of the shrinkage of liposome D associated with pores and tubules formation is available in Movie S3.

The eventual long-term evolution of the structures described above (after pulsation has been stopped) varied from one experiment to another. The small vesicles, in most cases,

diffused away from the liposome and the vesicle radius stayed constant. However, the behavior of the tubular structures exhibited wide variation. Some of the tubules broke away from the GUV and diffused away, sometimes forming vesicles and sometimes not. Other tubules remained attached to the vesicles, exhibiting polymerlike fluctuations. In some cases, they were reabsorbed into the GUV membrane after a time of approximately minutes. In fact, the eventual fate of tubules was strongly dependent on their environment, notably on whether other vesicles came in contact with them or not. In the cases where tubules were reabsorbed, the volume of the vesicle they were attached to increased, and the final state of the vesicle was often nonspherical, and appeared to be under little tension (in agreement with the idea that the attached lipids act as reservoir of lipid for the main vesicle).

DISCUSSION

Giant liposomes subjected to pulsed DC electric fields diminish in size and lose lipids via several observable mechanisms—vesicle ejection, tubule formation, and pore formation. This is quite different to what is observed in living cells, which tend to swell under electroporation (53–56). The experiments, along with the associated model, provide us

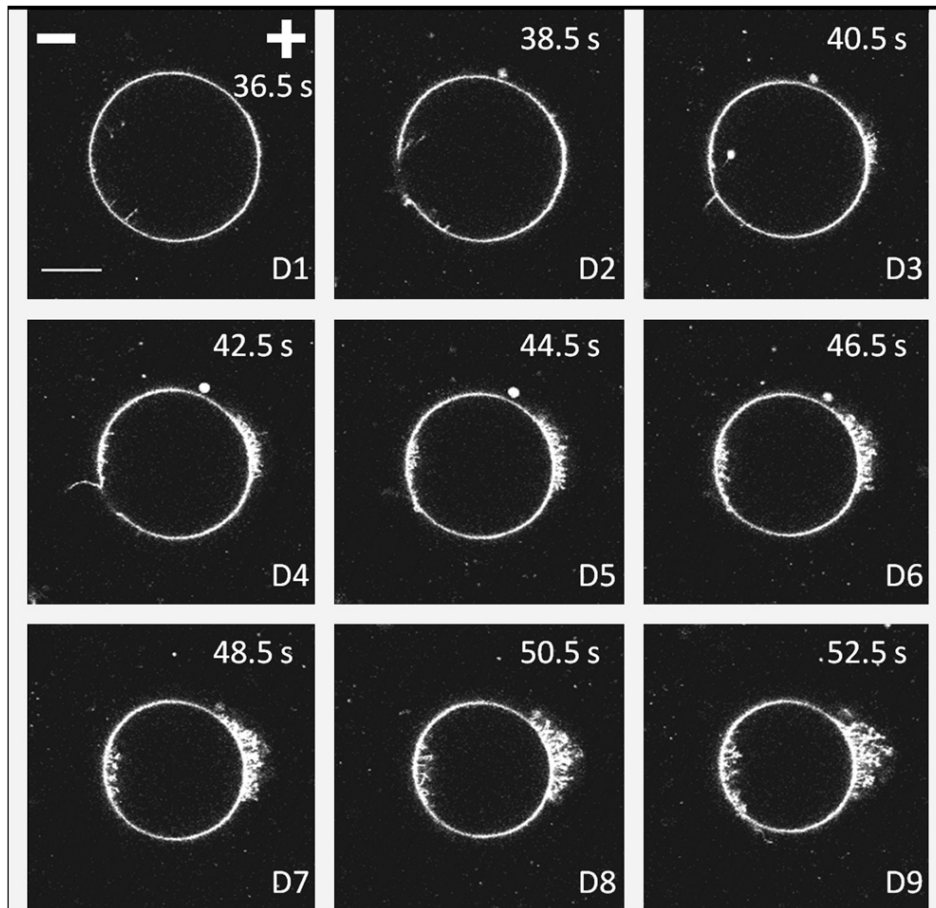


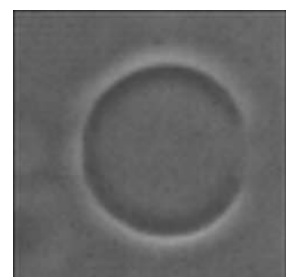
FIGURE 6 Images of liposome D, composed of DOPC and labeled with Rhodamine PE, at times indicated by the diamonds in Fig. 2. Image D1 is acquired after 15 pulses, D2 after 16 pulses, D3 after 17 pulses, etc. We can see pores on pictures D2 and D4 on the cathode-facing hemisphere. Scalebar ($20\ \mu\text{m}$ length) and position of the electrodes appear in the first photograph. Pulse magnitude and duration are $300\ \text{V}/\text{cm}$ and $5\ \text{ms}$. Times in upper-right corners indicate when images were acquired, the time origin being the onset of the first pulse.

with the following picture of lipid loss due to applied pulses. The lipid loss proceeds by a two-stage process. First, if the applied field is high enough, a membrane passes from an inactive state where it has no induced defects to one where defects are present. We have seen that this process is of an exponential character reminiscent of radioactive decay. Secondly, for DOPC composed vesicles, once defects are present the membrane loss per pulse is $\sim\lambda \approx 0.20$ of the area in which the transmembrane potential exceeds the critical value, denoted here by $\Delta\Psi_c$. From our estimate $W_c = 0.65$ obtained by fitting the average of all curves, we find that, on average, $\Delta\Psi_c = W_c \times \Delta\Psi_0 = 0.65 \times 1.3\ \text{V} \approx 0.85\ \text{V}$. If we use the average value of $\langle W_c^{\text{fit}} \rangle$ obtained by fitting the individual curves, we obtain $\Delta\Psi_c \approx 0.75\ \text{V}$.

These values of $\Delta\Psi_c$ are to be compared with those reported for certain cell membranes $\Delta\Psi_c \approx 1\ \text{V}$ (3,47) and tension free vesicles (1-stearoyl-2-oleoyl phosphatidylcholine and dioleoyl phosphatidylglycerol) (26), where $\Delta\Psi_c \approx 1.1\ \text{V}$. Similar results apply for EggPC but in this case, $\lambda \approx 0.29$ and there is thus, with comparison to DOPC, more lipid loss per unit area of where the critical transmembrane potential is exceeded. The estimated value of W_c obtained by fitting the average of all curves is 0.77 , which gives a critical transmembrane voltage of $1\ \text{V}$. The

estimate from the average values obtained over individual fits yields a value of 0.69 for W_c , thus leading to a critical transmembrane voltage $\Delta\Psi_c \approx 0.89\ \text{V}$.

Recently numerical simulations have provided much insight into the membrane organization occurring during the membrane permeabilization process (35–41). The picture emerging is one where the strong electric field present in the membrane causes water molecules (via their dipole interaction with the applied field) to penetrate into the membrane. There is an initial formation of so-called hydrophobic pores because the water molecules are in proximity to the hydrophobic core of the membrane. Subsequently, the lipid head dipoles reorient to form hydrophilic pores where the lipid heads line the inside of the pore. The mechanism behind this reorientation involves hydrophobic effects and electrostatic effects. For example, dipole moments that are oriented normal to the membrane surface (which is roughly the case for DOPC) are favorably aligned on one side of the membrane but not on the other. This means that, on the side where they are well oriented, the field keeps them straight toward the normal. However, on the side where they are maloriented, they can lower their energy by turning in toward the core of the membrane. This tendency to turn inside the membrane lowers their electrostatic energy and



aids the formation of hydrophilic pores. The same effect is clearly present before water penetration into the bilayer core, and helps to form defects that favor penetration by water molecules. This explains why formation appears to be initiated from a particular membrane side in electrically neutral membranes. However, in numerical simulations, lipid loss from the membrane is not generally observed during pore formation and pore resealing. This could be because the timescales over which the simulations are carried out are too short. Indeed, it is difficult to see, if we accept the above image of the pore formation mechanism, how lipid loss to the extent observed in our experiments can be explained by such processes. The main differences between the experiments here and numerical simulations is that the system here is much larger and that the pores formed are an order-of-magnitude larger than those seen in simulations (which can be interpreted as prepores). We have seen that vesicle formation seems to make a major contribution to the observed lipid loss, and there is presumably a minimal size that a vesicle can have (for thermodynamic and mechanical reasons); thus, if the simulated system contains less lipids than required to build a vesicle of minimal size, then lipid loss by vesiculation cannot be observed. Another possible mechanism for lipid loss is that lipid headgroup dipoles, which are maloriented, instead of turning into the membrane to be better oriented, are simply expelled from the membrane. This expulsion will increase the free energy of the lipid due to hydrophobic interactions but lower the electrostatic energy. The hydrophobic component of the free energy increase could be lowered by the formation of small vesicles into which these expelled lipids could be incorporated. We recall that, in smaller vesicles, the electrostatic energy of maloriented lipid headgroup dipoles is much smaller due to the scaling with R , the vesicle radius, of the potential drop across the membrane. The idea that single lipids can be extracted due to the field turns out to be unrealistic. The dipole moment p of the PC headgroup is ~ 20 Debye (see (57) and references therein), which means that the maximal electrostatic energy of a maloriented dipole is $\sim E_D \approx p(\Delta\Psi/a)$, where $\Delta\Psi$ is the potential drop across the membrane. However, the hydrophobic energy of a lipid tail placed in water is given by $E_{\text{hydro}} \approx 2\pi\rho l\mu$, where l is the total length of the hydrocarbon chain and ρ is its effective radius (viewed as a cylinder). Clearly, the tail length is approximately related to the membrane thickness by $l \approx a/2$. The term μ is a hydrophobic free energy per unit of area and takes a value of ~ 40 mJ/m² (58). The effective cylindrical radius of the lipid hydrocarbon tail is estimated at 0.8 nm (there is, of course, really two tails each of radius ~ 0.4 nm (58)). Equating these two energies yields a critical transmembrane potential beyond which lipids can be torn out directly by the field as

$$\Delta\Psi^* \approx \frac{\pi a^2 \rho \mu}{p} \approx 24 \text{ V}. \quad (15)$$

This value of $\Delta\Psi^*$ is to be compared with the value given typically for the critical potential drop across the membrane necessary to achieve permeabilization which, as previously mentioned, is ~ 200 mV for a wide range of membrane types. In addition, the electric field seen by the lipid heads is only the amplified one if we assume that the head region is of low conductivity, having a value close to that cited for the total membrane conductivity. We thus conclude that, for permeabilization seen in the range of voltages of our experiments, a simple mechanism of tearing out lipids is unlikely to occur (although this mechanism could conceivably play a role when high intensity short pulses are applied). The conclusion of the above estimation is that lipids must be ejected together in structures that minimize their hydrophobic energy such as micelles, tubules, and vesicles, as is indeed seen in our experimental results.

There is a clear asymmetry in our observations of lipid loss, in agreement with the observations of Tekle et al. (42); when we observed pore formation, it was on the cathode-facing side of the liposome. However, the anode-facing side was the one where the formation of tubules was favored. The mechanism of symmetry breaking could well be related to the anisotropic dielectric structure of the membrane due to the behavior of its lipid components.

Another interesting feature of our results is that the vesicle does not always lose lipid material from the first pulse onwards. This implies that the vesicle needs to be in a particular state (induced by the field with some probability) to enter into the shrinking regime (SR). The difference between the SR and preshrinking regime is unclear, but one could speculate that, in the SR, the membrane has defects that facilitate the loss of lipids. The number and nature of defects created at the inception of the SR is presumably stochastic in nature and could be responsible for the variations in the parameter λ seen in our experiments. The continued application of pulses then leads to a number of visible modes of membrane loss, vesicle formation, tubule formation, and pore formation. In the context of applied DC pulses, only pore formation had been previously reported (42). Vesicle formation due to alternating fields has been reported (51), but the underlying physics appears quite different, as, in the presence of AC fields, the formation of small vesicles occurs via the fission of the initial cell into two similar-sized daughter cells. Perhaps the most striking phenomenon is that of tubule formation, which leads to a hairlike structure of tubules around the liposome. Thus repeated application of short DC pulses leads to the shrinkage of artificial vesicles and a rich phenomenology of lipid structure formation. As a final comment, the phenomenon of lipid loss observed here seems to support aspects of the phase transition model of electroporeabilization (59). In this model, the electric field can induce a transition from a state where the bilayer is thermodynamically stable to one where smaller units, for example micelles, are thermodynamically preferred. The fact that the lipid loss process is not always immediately

initiated when $N_c \neq 1$, supports the first-order nature of the transition.

SUPPORTING MATERIAL

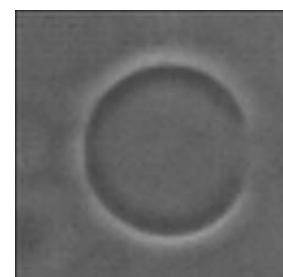
One table and three movies are available at [http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495\(09\)00660-2](http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495(09)00660-2).

We thank Emilie Phez and Justin Teissié for useful discussions on this work. We also thank Émile Perez and Plamen Kirilov from the Laboratoire des Interactions Moléculaires et Réactivité Chimique et Photochimique in Toulouse for allowing us to use their facilities to measure the ζ -potentials of our vesicles. Our group belongs to the Centre National de la Recherche Scientifique consortium CellTiss.

We acknowledge financial support from the Association Française contre les Myopathies, the Institut Universitaire de France, and the contracts ANR Cemirbio and DGA REI2 (0624034).

REFERENCES

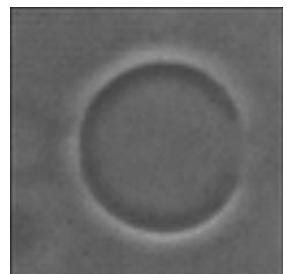
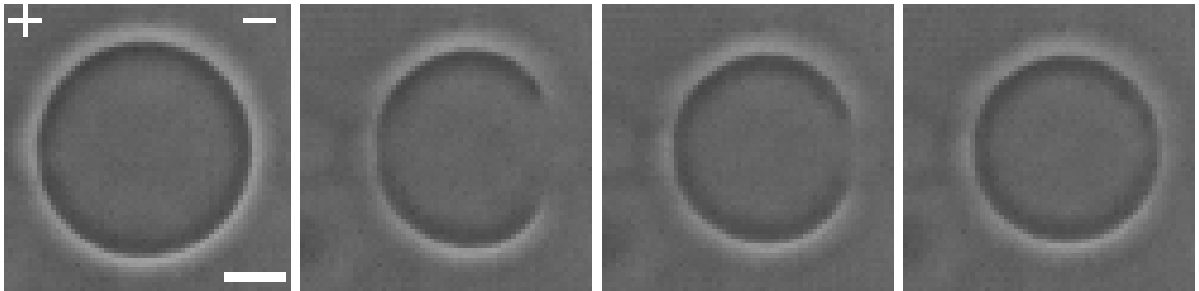
- Neumann, E., A. E. Sowers, and C. A. Jordan. 1989. Electroporation and Electrofusion in Cell Biology. Plenum Press, New York.
- Weaver, J. C. 1995. Electroporation theory. Concepts and mechanisms. *Methods Mol. Biol.* 55:3–28.
- Weaver, J. C., and Y. A. Chizmadzhev. 1996. Theory of electroporation: a review. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 41:135–160.
- Teissié, J., M. Golzio, and M.-P. Rols. 2005. Mechanisms of cell membrane electropermeabilization: a minireview of our present (lack of?) knowledge. *Biochim. Biophys. Acta.* 1724:270–280.
- Escoffre, J.-M., D. S. Dean, M. Hubert, M.-P. Rols, and C. Favard. 2007. Membrane perturbation by an external electric field: a mechanism to permit molecular uptake. *Eur. Biophys. J.* 36:973–983.
- Favard, C., D. S. Dean, and M.-P. Rols. 2007. Electrotransfer as a nonviral method of gene delivery. *Curr. Gene Ther.* 7:67–77.
- Dimova, R., K. A. Riske, S. Aranda, N. Bezlyepkina, R. L. Knorr, et al. 2007. Giant vesicles in electric fields. *Soft Matter.* 3:817–827.
- Neumann, E., and K. Rosenheck. 1972. Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *J. Membr. Biol.* 10:279–290.
- Rols, M.-P. 2006. Electropermeabilization, a physical method for the delivery of therapeutic molecules into cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1758:423–428.
- Robello, M., and A. Gliozzi. 1989. Conductance transition induced by an electric field in lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta.* 982:173–176.
- Rols, M.-P., and J. Teissié. 1998. Electropermeabilization of mammalian cells to macromolecules: control by pulse duration. *Biophys. J.* 75:1415–1423.
- Golzio, M., J. Teissié, and M.-P. Rols. 2002. Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:1292–1297.
- Antov, Y., A. Barbul, H. Mantsur, and R. Korenstein. 2005. Exposure of cells to pulsed low electric fields enhances adsorption and uptake of macromolecules. *Biophys. J.* 88:2206–2223.
- Behrader, M., C. Domenge, B. Luboinski, S. Orłowski, J. Behrader, Jr, et al. 1993. Electrochemotherapy, a new antitumor treatment. First clinical phase I–II trial. *Cancer.* 72:3694–3700.
- Gehl, J., T. Sorensen, K. Nielsen, P. Raskmark, S. Nielsen, et al. 1999. In vivo electroporation of skeletal muscle: threshold, efficacy and relation to electric field distribution. *Biochim. Biophys. Acta.* 1428:233–240.
- Sersa, G., D. Miklavcic, M. Cemazar, Z. Rudolf, G. Pucihar, et al. 2008. Electrochemotherapy in treatment of tumors. *Eur. J. Surg. Oncol.* 34:232–240.
- Gilbert, R., M. Jaroszeski, and R. Heller. 1997. Novel electrode designs for electrochemotherapy. *Biochim. Biophys. Acta.* 1334:9–14.
- Gothelf, A., L. Mir, and J. Gehl. 2003. Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation. *Cancer Treat. Rev.* 29:371–387.
- Winterhalter, M., and W. Helfrich. 1988. Deformation of spherical vesicles by electric fields. *J. Colloid Interface Sci.* 122:583–586.
- Kummrow, M., and W. Helfrich. 1991. Deformation of giant lipid vesicles by electric fields. *Phys. Rev. A.* 44:8356–8360.
- Riske, K. A., and R. Dimova. 2005. Electro-deformation and poration of giant vesicles viewed with high temporal resolution. *Biophys. J.* 88:1143–1155.
- Riske, K. A., and R. Dimova. 2006. Electric pulses induce cylindrical deformations on giant vesicles in salt solutions. *Biophys. J.* 91:1778–1786.
- Crowley, J. 1973. Electrical breakdown of bimolecular lipid membranes as an electromechanical instability. *Biophys. J.* 13:711–724.
- Abidor, I., V. Arakelyan, L. Chernomordik, Y. A. Chizmadzhev, V. Pastushenko, et al. 1979. Electric breakdown of bilayer membranes I: The main experimental facts and their qualitative description. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 6:37–52.
- Pastushenko, V., Y. Chizmadzhev, and V. Arakelyan. 1979. Electric breakdown of bilayer membranes II. Calculation of the membrane lifetime in the steady-state diffusion approximation. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 6:53–62.
- Needham, D., and R. M. Hochmuth. 1989. Electro-mechanical permeabilization of lipid vesicles—role of membrane tension and compressibility. *Biophys. J.* 55:1001–1009.
- Isambert, H. 1998. Understanding the electroporation of cells and artificial bilayer membranes. *Phys. Rev. Lett.* 80:3404–3407.
- Sens, P., and H. Isambert. 2002. Undulation instability of lipid membranes under an electric field. *Phys. Rev. Lett.* 88:128102–128105.
- Powell, K., and J. Weaver. 1986. Transient aqueous pores in bilayer membranes: a statistical theory. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 15:211–227.
- Glaser, R., S. Leikin, L. Chernomordik, V. Pastushenko, and A. Sokirko. 1988. Reversible electrical breakdown of lipid bilayers and formation and evolution of pores. *Biochim. Biophys. Acta.* 940:272–287.
- Barnett, A., and J. C. Weaver. 1991. Electroporation: a unified, quantitative theory of reversible electrical breakdown and mechanical rupture in artificial planar bilayer membranes. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 25:163–182.
- Neu, J., and W. Krassowska. 2003. Modeling postshock evolution of large electropores. *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* 67:021915–021926.
- Neu, J., K. Smith, and W. Krassowska. 2003. Electrical energy required to form large conducting pores. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 60:107–114.
- Derjaguin, B., and Y. Gutop. 1961. Theory of the breakdown (rupture) of free films. *Kolloidn Zh.* 24:370–374.
- Tieleman, D. P. 2004. The molecular basis of electroporation. *BMC Biochem.* 5:10.
- Leontiadou, H., A. Mark, and S. Marrink. 2004. Molecular dynamics simulations of hydrophilic pores in lipid bilayers. *Biophys. J.* 86:2156–2164.
- Tarek, M. 2005. Membrane electroporation: a molecular dynamics simulation. *Biophys. J.* 88:4015–4053.
- Hu, Q., R. P. Joshi, and K. H. Schoenbach. 2005. Simulations of nanopore formation and phosphatidylserine externalization in lipid membrane subjected to high intensity, ultra-short electric pulse. *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* 72:031902.
- Hu, Q., S. Viswanadham, R. P. Joshi, K. H. Schoenbach, S. J. Beebe, et al. 2005. Simulations of transient membrane behavior in cells subjected to a high intensity, ultra-short electric pulse. *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* 71:031914.
- Tieleman, D. P. 2006. Computer simulations of transport through membranes: passive diffusion, pores, channels and transporters. *Clin. Exp. Pharm. Phys.* 33:893–903.



41. Wohrlert, J., W. den Otter, O. Edholm, and W. J. Briels. 2006. Free energy of a trans-membrane pore calculated from atomistic molecular dynamics simulations. *J. Chem. Phys.* 124:154905–154914.
42. Tekle, E., R. D. Astumian, W. A. Friauf, and P. B. Chock. 2001. Asymmetric pore distribution and loss of membrane lipid in electroporated DOPC vesicles. *Biophys. J.* 81:960–968.
43. Angelova, M. I., and D. S. Dimitrov. 1986. Liposome electroformation. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 81:303–311.
44. Rodriguez, N., F. Pincet, and S. Cribier. 2005. Giant vesicles formed by gentle hydration and electroformation: a comparison by fluorescence microscopy. *Colloids Surf. B.* 42:125–130.
45. Teissié, J., and M.-P. Rols. 1993. An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electropermeabilization. *Biophys. J.* 65:409–413.
46. Gabriel, B., and J. Teissié. 1997. Direct observation in the millisecond time range of fluorescent molecule asymmetrical interaction with the electropermeabilized cell membrane. *Biophys. J.* 73:2630–2637.
47. Tsong, T. Y. 1991. Electroporation of cell membranes. *Biophys. J.* 60:297–306.
48. Pavlin, M., N. Pavselj, and D. Miklavcic. 2002. Dependence of induced transmembrane potential on cell density, arrangement, and cell position inside a cell system. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 49:605–612.
49. Carvalho, K., L. Ramos, C. Roy, and C. Picart. 2008. Giant unilamellar vesicles containing phosphatidylinositol(4,5)biphosphate: characterization and functionality. *Biophys. J.* In press.
50. Khalifat, N., N. Puff, S. Bonneau, J.-B. Fournier, and M. Angelova. 2008. Membrane deformation under local pH gradient: mimicking mitochondrial crystal dynamics. *Biophys. J.* In press.
51. Marszalek, P., and T. Tsong. 1995. Cell fission and formation of mini cell bodies by high frequency alternating electric field. *Biophys. J.* 68:1218–1221.
52. Rodriguez, N., S. Cribier, and F. Pincet. 2006. Transition from long- to short-lived transient pores in giant vesicles in an aqueous medium. *Phys. Rev. E.* 74, 061902.1–10.
53. Kinoshita, K., and T. Tsong. 1977. Formation and resealing of pores of controlled sizes in human erythrocyte membrane. *Nature.* 268:438–441.
54. Abidor, I., A. Barbul, D. Zhelev, P. Doinov, I. Bandrina, et al. 1993. Electrical properties of cell pellets and cell electrofusion in a centrifuge. *Biochim. Biophys. Acta.* 1152:207–218.
55. Abidor, I., L. Li, and S. Hui. 1994. Studies of cell pellets: II. Osmotic properties, electroporation, and related phenomena: membrane interactions. *Biophys. J.* 67:427–435.
56. Golzio, M., M. Mora, C. Raynaud, C. Delteil, J. Teissié, et al. 1998. Control by osmotic pressure of voltage-induced permeabilization and gene transfer in mammalian cells. *Biophys. J.* 74:3015–3022.
57. Pasenkiewicz-Gierula, M., Y. Takaoka, H. Miyagawa, K. Kitamura, and A. Kusumi. 1999. Charge pairing of headgroups in phosphatidylcholine membranes: a molecular dynamics simulation study. *Biophys. J.* 76:1228–1240.
58. Israelachvili, J. 2000. *Intermolecular and Surface Forces*, 2nd Ed. Academic Press, San Diego, CA.
59. Sugár, I. P. 1979. A theory of the electric field-induced phase transition of phospholipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta.* 556:72–85.

Annexe E

Manuscrit accepté sur la méthode de mesure des tensions de bord



A New Method for Measuring Edge Tensions and Stability of Lipid Bilayers: Effect of Membrane Composition

Thomas Portet

Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, CNRS UMR 5089;
Laboratoire de Physique Théorique, CNRS UMR 5152;
Université Paul Sabatier, Toulouse, France.

Rumiana Dimova *

Max Planck Institute of Colloids and Interfaces,
Potsdam, Germany.

Abstract

We report a new and facile method for measuring edge tensions of lipid membranes. The approach is based on electroporation of giant unilamellar vesicles and analysis of the pore closure dynamics. We applied this method to evaluate the edge tension in membranes with four different compositions: egg phosphatidylcholine (EggPC), dioleoylphosphatidylcholine (DOPC), and mixtures of the latter with cholesterol and dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE). Our data confirm previous results for EggPC and DOPC. The addition of 17 mol % cholesterol to the DOPC membrane causes an increase in the membrane edge tension. On the contrary, when the same fraction of DOPE is added to the membrane, a decrease in the edge tension is observed, which is an unexpected result considering the inverted-cone shape geometry of the molecule. Presumably, interlipid hydrogen bonding lies in the origin of this behavior. Furthermore, cholesterol was found to lower the lysis tension of DOPC bilayers.

*Corresponding author. Address: Max Planck Institute of Colloids and Interfaces, Science Park Golm, 14424 Potsdam, Germany. Tel.: +49 331 567 9615, Fax: +49 331 567 9612, E-mail: Rumiana.Dimova@mpikg.mpg.de

This behavior differs from that observed on bilayers made of stearyloleoylphosphatidylcholine, suggesting that cholesterol influences the membrane mechanical stability in a lipid-specific manner.

Keywords: edge tension; giant vesicle; electroporation; lysis tension; cholesterol; pores

Introduction

In order to fulfill the role of a barrier, spontaneous pore formation is suppressed in biological membranes. When a membrane is porated due to some external perturbation, lipid molecules reorient so that their polar heads can line the pore walls and form a hydrophilic pore (1). This rearrangement is energetically favorable because it shields the hydrophobic tails from exposure to water. However, there is still a price to pay for reorganizing the lipids at the pore edge. The energy penalty per unit length of pore circumference is called edge tension and is on the order of several picoNewtons (2). The edge tension emerges from the physicochemical properties and the amphiphilic nature of lipid molecules, and gives rise to a force driving the closure of transient pores (3).

In some reports, the edge tension is also referred

to as line tension. The latter term is presumably more appropriate for describing, for example, the tension along the borders of domains in multicomponent membranes. In porated bilayers, we will refer to the tension along the pore edge as edge tension.

The edge tension is of significant importance in biology. It contributes to the auto-assembly and auto-healing of lipid bilayer structures, which enable compartmentalization in cells needed for life to develop. Edge tension has been found to govern the stability of detergent-stabilized bicelles and to regulate the disc-to-vesicle transitions in such systems (4). It also plays a crucial role in membrane resealing mechanisms taking place after physical protocols for drug delivery, such as sonoporation (5) or electroporation (6). Being able to experimentally measure this quantity is thus of significant interest for understanding various biological events and physicochemical processes in membranes. Studies based on molecular dynamics simulation have also been able to deduce membrane edge tensions (7–9).

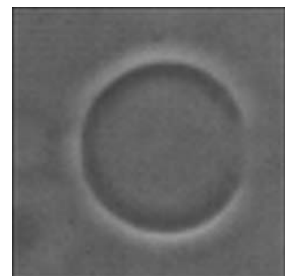
Only a few experimental methods have been developed to directly assess the membrane edge tension. In the following, we give a short overview of the available approaches and their advantages, and briefly outline the disadvantages. One of the main hurdles in measuring the edge tension lies in visualizing the pores in the membrane. Indirect methods based on measuring properties statistically averaged over populations of small vesicles provide a possible solution, as reported, for example, in studies on osmotically-induced leakage of vesicles (10). However, in such measurements the use of highly concentrated salt solutions influences significantly the membrane material properties (11). An elegant approach was based on rapid freezing of cells with a controlled time delay after electroporation, and examining the pores with electron microscopy (12). This method, however, provides a static picture of the porated membrane and a danger of ice crystals damage exists. Another way to probe the edge energy, this time on supported lipid bilayers, is provided by a “punch-through” approach with an atomic force microscope (AFM) (13), but here, the support may influence the membrane behavior. Measurements of the voltage dependence of the average lifetime of pores in electroporated black lipid mem-

branes also can be used to roughly estimate the edge tension (14, 15). However, these membranes are at high tension and organic solvents may still be present in the bilayer.

The above listed approaches and systems do not allow access to the pore dynamics and the pores cannot be directly observed. A more convenient system, which provides solution to this problem is giant unilamellar vesicles (GUVs) (16). Having the dimensions of eukaryotic cells, GUVs can be visualized under an optical microscope and present a convenient tool for studying membrane properties (17).

Only a few previous studies have employed GUVs for estimating the edge tension. Observations on open cylindrical giant vesicles exposed to AC fields (18) provided an estimate for the edge tension, but this technique did not allow for good control over the system and could be applied to only few (three) vesicles. In another work, the vesicles were porated with an electric pulse, and the pores were kept open by externally adjusting the membrane tension with a micropipette (19). Even though solid, this approach requires the use of a sophisticated equipment like a setup for vesicle micropipette aspiration. Giant liposomes were also used in (20–22), where the pore closure dynamics was analyzed in light of a theory developed earlier (3). However, for the direct visualization of the pore closure, the use of viscous media (glycerol solutions) and fluorescent dyes in the membrane were required, both of which potentially influence the edge tension.

Similarly to (20, 21), we also use the theoretical framework developed by Brochard-Wyart et al. (3) describing pore dynamics. The principle of our method is simple. One has to create a pore and measure its closure rate, which can be related to the edge tension following (3). Porating a lipid bilayer can be carried out by applying tension to the membrane. Once the membrane tension exceeds a critical value called the lysis tension (2), the vesicle ruptures and a transient pore can appear. Karatekin et al. used visible light illumination to stretch the vesicles (21). However, when working with fluorescently labeled membranes as in (21), the danger exists that intense illumination may trigger oxidation processes in the bilayer (23, 24). Sandre et al. employed ad-



hesion of the GUVs to a glass substrate (20), but this approach does not allow good control over the poration process.

Here, as in (19), we use an electric pulse to generate micron-sized pores in the membrane. We observe the pore closure under phase contrast microscopy using fast digital imaging. Thus, the need of using viscous solutions to slow down the system dynamics was avoided and no fluorescent dyes to visualize the vesicles were employed. The pores close within a few tens or hundreds of milliseconds, giving edge tensions of the order of several picoNewtons, in agreement with values reported in the literature. We study the influence of the membrane composition and investigate effects resulting from the inclusion of cholesterol or another lipid type. In addition, we were able to evaluate the threshold values of the transmembrane potential needed to porate bilayers with various compositions and summarize these results in terms of lysis tensions at the end.

Method description

Theoretical considerations of pore dynamics

According to (3), the life of a pore is composed of four consecutive stages. Initially, the pore grows and then stabilizes to its maximal radius. After that, the pore radius decreases slowly in a quasi-static leakout regime, followed by the last stage of fast closure. The pore spends the majority of its lifetime in the third regime of slow closure, which we use to determine the edge tension. Assuming that the pore radius r varies slowly and that the vesicle radius, R , stays constant, it can be shown, see Supporting Material, that

$$R^2 \ln(r) = -\frac{2\gamma}{3\pi\eta}t + C, \quad (1)$$

where γ denotes the edge tension, η is the viscosity of the aqueous medium, t is time, and C is a constant depending on the maximal pore radius reached. The principle of the edge tension measurement then looks very simple. One only has to consider the linear part of $R^2 \ln(r)$ as a function of time corresponding to

the slow closure stage. Linear fit of this part gives a slope a and the edge tension γ is estimated from the relation $\gamma = -(3/2)\pi\eta a$.

Electromediated pore formation

We trigger the process of electroporation by applying an electric pulse of 5 ms duration and field strength in the range 20 - 80 kV/m. The pulse leads to a voltage drop across the membrane of the order of 1 V. Such pulses can create pores several microns in diameter, also referred to as macropores. We monitor the pore size evolution with fast phase contrast imaging. Because of the high acquisition rate of the setup, one avoids the need of using viscous glycerol solutions as in (21). This is an advantage of our approach because glycerol is known to interact with phosphatidylcholine membranes via preferential exclusion from the hydration layer and membrane partitioning (25). It is thus conceivable that glycerol can influence the edge tension, because the latter depends on the repulsion between the lipid headgroups and the conformation of the hydrocarbon chains as shown by simulation studies (26). The use of fluorescence dyes as in (21) to visualize the vesicles can also influence the values of the measured edge tension because of preferential partitioning of the dye between the pore edges and the rest of the bilayer. Here, we used phase contrast observation avoiding the need of additional fluorescent inclusions. Because we work without glycerol and without any fluorescent dye, we anticipate that our method yields more accurate values for the edge tension.

Using phase contrast microscopy, it is possible to accurately measure the size of the pore if located in the in-focus area of the vesicle as has been demonstrated in earlier electroporation and fusion studies (27, 28). Here, the pores were always located in this area, and more precisely at the vesicle poles facing the electrodes, because of the angular dependence of the transmembrane potential created during the pulse and the chamber geometry; see e.g. (29) and Supporting Material. We also employed a conventional trick to improve the contrast in the vesicle images: we used different sugar solutions inside and outside the liposomes. The vesicles were prepared in

a sucrose solution and subsequently diluted in a glucose solution. Due to the difference in the refractive indices of these solutions, the vesicles appear as dark objects surrounded by a bright halo on a light-gray background; see the phase contrast image in Fig. 1A. The vesicle membrane is located where the image intensity gradient is maximal. When a pore opens, the two sugar solutions mix and the gradient vanishes in the pore area. Thus, interrupting the membrane continuity in the focal plane, i.e. inducing pores in this area, causes an interruption in the halo, which we used to determine the pore radius. We developed a program to automatically measure the pore sizes in order to avoid any bias introduced by manual processing; see Image analysis subsection and Supporting Material for details.

Let us note that many small suboptical pores located very close to each other could lead to images similar to those obtained for a single big pore. Furthermore, in some cases several macropores could be created within the same vesicle, occasionally on both sides facing the electrodes. In this case, Eq. 1 is still valid; see Supporting Material for justifications.

The overall vesicle response and behavior of the pores over time as theoretically described in (3) is different from the one observed here in the stage of pore formation. The applied electric field leads to a gradual and nonuniform increase of the membrane tension along the vesicle surface. Thus, the theoretical approach in (3), which assumes constant and uniform tension distribution all over the vesicle, cannot be applied to the period during the pulse. However, after the end of the pulse, the membrane tension is no longer inhomogeneous and the pore closure analysis are applicable (as detailed in the Supporting Material).

During the pulse when the tension exceeds some critical value corresponding to the lysis tension, the membrane ruptures, i.e., a pore is formed. Membrane electroporation is associated with building of some critical transmembrane potential across the bilayer, which we use to evaluate the lysis tension of membranes of various composition.

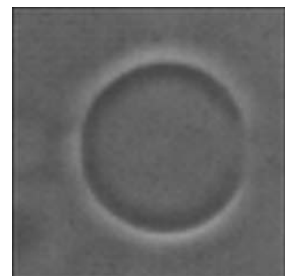
Materials and experimental procedures

Lipids and solutions

Egg yolk L- α -phosphatidylcholine (EggPC), dioleoylphosphatidylcholine (DOPC), dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) and L- α -phosphatidyl-ethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (Rhodamine PE) were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL), and cholesterol from Sigma (Steinheim, Germany). Four different membrane compositions were studied: DOPC, DOPC:cholesterol at a molar ratio of 5:1, DOPC:DOPE, also at a molar ratio of 5:1, and EggPC fluorescently labeled with Rhodamine PE (1 mol %). Lipids were diluted in chloroform at a mass concentration of 0.5 mg/mL, and stored at -20°C . The vesicles were prepared in an aqueous solution of 240 mM sucrose (internal solution) and subsequently diluted in an aqueous solution of 260 mM glucose and 1 mM sodium chloride (external solution). The pH of the solutions was adjusted to 7 using either 1 mM phosphate buffer ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, Merck, Darmstadt, Germany) or 1 mM Hepes buffer from Sigma. No difference in the behavior of the vesicles was observed when using one buffering agent or the other. The conductivities of the internal and external solutions were measured with conductivitymeter SevenEasy (Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland), and had values of approximately 20 $\mu\text{S}/\text{cm}$ and 150 $\mu\text{S}/\text{cm}$, respectively. The osmolarities, measured with osmometer Osmomat 030 (Gonotec, Berlin, Germany), were approximately 260 mOsm/kg and 275 mOsm/kg, respectively.

Giant vesicles preparation

The GUVs were prepared using the electroformation protocol (30) at room temperature, at which all lipids are in the fluid phase. A small volume (15 μL) of the lipid solution in chloroform was deposited on the conducting sides of glass slides coated with indium tin oxide. The glasses were then kept for two hours under vacuum at 63°C in an oven to remove all traces of the organic solvent. Afterwards, the plates, spaced



by a 1 mm thick silicon frame (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) were assembled into a chamber. The chamber was filled with the sucrose solution (internal medium). The slides were connected to AC field function generator Agilent 33220A (Agilent Technology Deutschland GmbH, Böblingen, Germany) and sinusoidal voltage of 25 mV peak to peak at 10 Hz was applied. The voltage was increased by 100 mV steps every 5 minutes, up to a value of 1225 mV and maintained under these conditions overnight. Shorter times (≈ 2 h) were also sufficient without altering the results. Finally, square-wave AC field of the same amplitude was applied at 5 Hz for one hour in order to detach the GUVs from the slides.

Application of electric pulses

For pulse application, we used a home-made chamber constructed from a glass slide and a coverslip similar to the one described in (31). Two parallel copper strips (3M, Cergy-Pontoise, France) were stuck on the slide, 0.5 cm apart. The coverslip was then glued onto the glass slide with heated parafilm. The cavity between the slide and the coverslip was filled with 30 μL of the buffered glucose solution and 2 μL of the GUV solution. Electric pulses of 5 ms duration and amplitudes ranging from 20 to 80 kV/m were applied directly under the microscope with βtech pulse generator GHT_Bi500 (βtech , l'Union, France). The pulse generator was synchronized with the digital camera, so that the image acquisition was triggered by the onset of the pulse.

Microscopy

The GUVs were observed under inverted microscope Axiovert 135 (Zeiss, Göttingen, Germany) equipped with a $20\times$ Ph2 objective. Phase contrast images were collected at acquisition speeds of 5000, 10000 or 20000 frames per seconds (fps) with fast digital camera HG-100K (Redlake, San Diego, CA). Illumination during routine observations was performed with a halogen lamp. A mercury lamp HBO W/2 was used for image acquisition for a total time of a few seconds. During this time no detectable heating of the sample occurred.

Image analysis

To avoid bias in the pore size determination, we developed image processing procedures to automatically evaluate the pore radii. The procedure consists of two stages: (i) detection of the vesicle contour, and (ii) pore size measurement. We first transformed the raw vesicle image into a binary one, the membrane being represented by the non zero pixel value. Given such an image in which the decision of where the membrane was located had already been made, it was then easy to obtain the pore size r via custom algorithms, see Supporting Material.

The vesicle radii R were measured manually using Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD). As described in the previous section, the linear part of the curve $R^2 \ln(r)$ as a function of time t was fitted with an expression of the form $y = at + b$, and the edge tension γ was obtained from the slope a through $\gamma = -(3/2)\pi\eta a$. For the viscosity of the 260 mM glucose solution, we used $\eta = 1.133 \cdot 10^{-3}$ Pa.s (32). To avoid effects due to change in the vesicle radius, predominantly occurring before the stage of linear dependence of the data, see Supporting Material, R was measured at the end of this stage.

Results

Edge tension of EggPC membranes

Because the majority of literature data on edge tensions has been collected on EggPC membranes, we first tested our method on GUVs made of this lipid. With fluorescence microscopy of EggPC vesicles labeled with Rhodamine PE (data not shown), we confirmed that single macropores formed on the cathode-facing pole of the vesicles. This supports previous observations on DOPC (31, 33) and indicates that such behavior is not tail-specific but is presumably related to the nature of the lipid headgroup. Only in a limited number of experiments, macropores could be visualized also on the anode-facing side of the vesicles. Thus, the pore sizes were measured only at the cathode-facing hemispheres. For the vesicle radii explored here (between 10 and 40 μm), the applied pulses induce transmembrane potentials of the order

of 0.7–1.25 V. The evolution of the closing pore after the end of the pulse could be clearly followed with phase contrast microscopy as shown with the example in Fig. 1. The very first image shows the unperturbed vesicle.

During the pulse, i.e., in the first 5 ms (data not shown), the vesicles attained spherocylindrical shapes with symmetry axis along the field direction (see e.g. Fig. 3B), as previously reported for GUVs in salt solutions (34). The deformation here seemed less pronounced, presumably because of the lower field amplitude used, but with a longer lifetime, on the order of a few ms as compared to hundred μ s in (34), because of the longer pulses applied in this work.

The pores could only be detected after about 5 ms, almost at the end of the pulse. The temporal and optical resolution of our setup did not allow us to detect the pore formation and growth precisely. It appeared that the pore was created already with a rather large radius of a few micrometers, slightly grew in the following few hundreds of microseconds, stabilized in the next couple of milliseconds and then entered the stage of slow closure. This sequence was exhibited by almost every vesicle we studied, for all compositions. It remains unclear whether the poration process was initiated with a single pore created during the pulse, or that first many smaller pores were formed and then coalesced. If the first scenario is valid, the rate of opening of the macropore should be on the order of several mm/s, i.e., beyond our temporal and spatial resolution. We favor the second hypothesis with smaller pores of suboptical sizes since the critical transmembrane potential for poration is reached already in the beginning of the pulse; see Supporting Material.

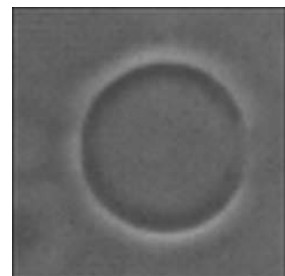
We now focus on the stage of pore closure used to determine the edge tension. The images in Fig. 1B-F belong to this stage. The pore has completely resealed after 150 ms; see Fig. 1G, H. The image at 25 ms, Fig. 1B, shows that the GUV membrane is altered at the anode-facing side as well. This hemisphere has been reported to be the location of smaller pores nucleation (33) and generation of membrane tubes (31), which apart from the fact that poration was not always observed, was an argument against analyzing the pore closure at this hemisphere. Here

the resealing occurred much faster: this side of the liposome is intact on the subsequent pictures. To illustrate the image analysis procedure leading to the quantitative measurement of the pore radius, see also Supporting Material, in the second and fourth columns of Fig. 1 we present the processed images corresponding to the cathode-facing half of the GUV shown in the adjacent raw images. The outer white circle in the processed image corresponds to the boundary between the bright halo around the vesicle and the gray background, while the inner one indicates the membrane position. It is this inner circle, which is used for pore size measurements. The pore diameter is schematically indicated in Fig. 1E.

The electroporated GUVs generally decreased in size upon the application of the pulse (as exemplified by the vesicle in Fig. 1). This behavior is consistent with previous reports (31), but questions the assumption for constant R , which was used to derive Eq. 1. However, the change in the vesicle radius, probably linked to the expulsion of small vesicles or the pulling of membrane tubes (31), occurs predominantly in the first hundreds of microseconds after the pulse, followed by a negligible decrease of approximately 1.5 % during the stage of pore closure; see Supporting Material. The latter change is on the order of the error in measuring the pore radius. Thus, our assumption for constant vesicle size in the linear stage of slow pore closure is justified. For the value of R in the fits according to Eq. 1 we used the liposome radius after the pore has closed.

From the images, we extract the time dependence of the pore size. We plot the size of the porated regions characterized by $R^2 \ln(r)$ as a function of time. In Fig. 2 we show 6 typical datasets from the 41 measurements performed on EggPC GUVs. The straight solid lines are fits according to Eq. 1. The edge tension γ is deduced from the slopes of these lines. The slopes are similar, because the explored vesicles have identical compositions, i.e., identical edge tension. For EggPC membranes, we found that the mean value of the edge tension was 14.2 pN, with a standard error of 0.7 pN; see Table 1 for other literature data on EggPC.

Each studied vesicle was permeabilized, which led to partial sugar mixing. If the associated loss of opti-



cal contrast was not significant, we used the same vesicle a few more times to perform edge tension measurements on the same vesicle and test for reproducibility. In this case, the pulses were well separated in time, e.g. by an interval of approximately 5 min. The total of 41 experiments were carried out on 16 GUVs from different preparations.

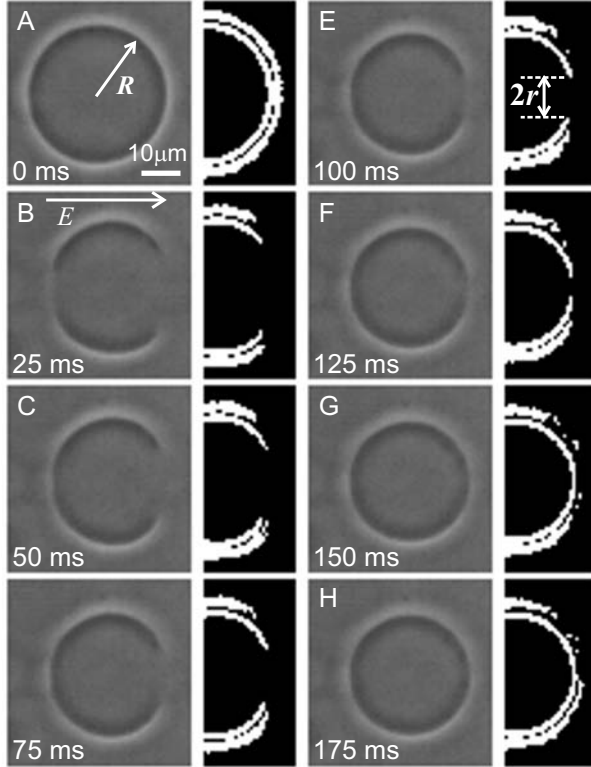


Figure 1: Time sequence of raw images (first and third columns) and processed images (second and fourth columns) of a vesicle with a radius of $17 \mu\text{m}$ exposed to an electric pulse of 5 ms duration and 50 kV/m amplitude. Time $t = 0$ s (A) corresponds to the beginning of the pulse. The pore radius r , schematically indicated in (E), decreases (B-F) and after around 150 ms it has resealed (G, H). The field direction is indicated in (B). A pore formed in the left hemisphere of the vesicle is visible in (B).

Effect of membrane composition

Having tested our approach on EggPC with significantly better accuracy as compared to other methods, we proceeded with examining membranes of different compositions. We first tested vesicles made of DOPC because (i) this lipid has been used in a few other studies (15, 21, 35), which could provide basis for comparison with our results; and (ii) DOPC is a pure lipid type, as compared to EggPC which is composed of several lipid species that may influence the measured edge tensions.

The edge tensions for DOPC membranes obtained from electroporation of black lipid membranes (15), light-induced poration of GUVs (21) or AFM studies on supported bilayers (35) range from 3.9 to 25 pN, see Table 1. The upper value corresponds to DOPC purchased from the same producer as ours (Avanti Polar Lipids); for details on effects of lipids from different producers see (21). Applied to DOPC GUVs, our method yielded for the edge tension $\gamma = 27.7 \pm 2.5$ pN, from a total of 24 experiments. This value is comparable to previous results.

After characterizing the edge tension of pure DOPC membranes, we proceeded with examining differences resulting from the presence of small fractions of guest molecules in the membrane. We considered the effect of cholesterol because it is ubiquitous in eukaryotic membranes. The inverted-cone shape of this molecule should prevent it from locating at the rim of the pore. Thus, the presence of cholesterol would require more energy to rearrange the lipids along the pore walls and the edge tension is expected to increase (21). Indeed, for membranes made of DOPC:cholesterol in 5:1 molar ratio, we found a mean edge tension value of 36.4 pN with a standard error of 1.9 pN from a total of 14 experiments, confirming the expectations and a trend reported previously (21).

Similarly to cholesterol, we probed the effect of DOPE, which to our knowledge has not been explored so far. Like cholesterol, this lipid also has an inverted-cone shape and is thus expected to lead to an increase in the edge tension (21). However, membranes with the same molar fraction of the guest molecules, i.e., DOPC:DOPE with 5:1 molar ratio, yielded quite an

unexpected result. We found a significant decrease of the edge tension, as compared to pure DOPC, with a value of 15.6 ± 1.3 pN as estimated from 31 experiments.

All our results are summarized in Table 1 including edge tensions obtained by other groups.

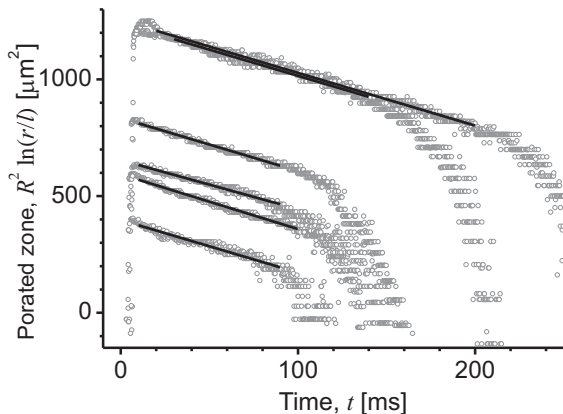


Figure 2: Evolution of the porated region as characterized by $R^2 \ln(r/l)$ as a function of time t for 6 different EggPC vesicles. To avoid plotting a dimensional value in the logarithmic term, we have introduced $l = 1 \mu\text{m}$ (note that this operation does not influence the slope of the curves). The gray open circles are experimental data and the solid lines are linear fits, whose slopes yield the edge tension γ .

Electroporation thresholds and stability of membranes with various compositions

While EggPC, DOPC, and DOPC:DOPE GUVs exposed to electric pulses of a few tens of kV/m porated and resealed very quickly, such field amplitudes completely destabilized DOPC:cholesterol vesicles. The GUVs burst and disintegrated in a fashion reminiscent of that observed with charged membranes (36). An image sequence of such an event is given in Fig. 3. To avoid vesicle destruction, for the edge tension measurements we were applying pulses with lower

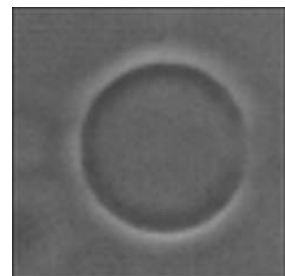
amplitudes, around half the strength we used for the other compositions. With these reduced amplitudes, DOPC:cholesterol vesicles porated and resealed in the usual manner. Note that such weak pulses did not porate the cholesterol-free vesicles. This indicates that cholesterol lowers the stability of DOPC membranes when exposed to electric pulses.

As a characteristic of the membrane stability in electric fields one can consider the critical transmembrane potential $\Delta\psi_c$, at which poration occurs. Following (37), at the moment of maximally expanded pore, we define the critical transmembrane potential as $\Delta\psi_c = (3/2)R_{in}E \cos(\theta_p)$, where R_{in} denotes the initial vesicle radius before poration, E is the field magnitude and θ_p is the inclination angle defining the location of the pore edge with respect to the vesicle center; see Supporting Material. This expression can be presented as $\Delta\psi_c = (3/2)E\sqrt{R_{in}^2 - r_m^2}$, where r_m is the maximal pore size. Thus, measuring r_m after applying a pulse with a field strength E provides us with an estimate for the critical transmembrane poration $\Delta\psi_c$. The results for the four explored mixtures are included in Table 1. While the cholesterol-free membranes porate at similar values of $\Delta\psi_c$ around 0.9 V, the addition of 17 mol % cholesterol to DOPC bilayers (DOPC:cholesterol 5:1) decreases the critical transmembrane potential to around 0.7 V, i.e., destabilizes these membranes when exposed to an electric pulse.

As mentioned in section Electromediated pore formation, the critical transmembrane potential is related to the so-called lysis tension, σ_{lys} . The latter can be deduced, see Table 1, provided knowledge about the membrane thickness is available; see Supporting Material for details. From the decrease in the critical transmembrane potential we find that cholesterol lowers the lysis tension of DOPC membranes.

Discussion

In this section, we will compare previously reported results for the edge tension obtained from other methods and data measured here. Before that, we emphasize some advantages of our approach. First, it is relatively easy to apply in a moderately equipped lab.



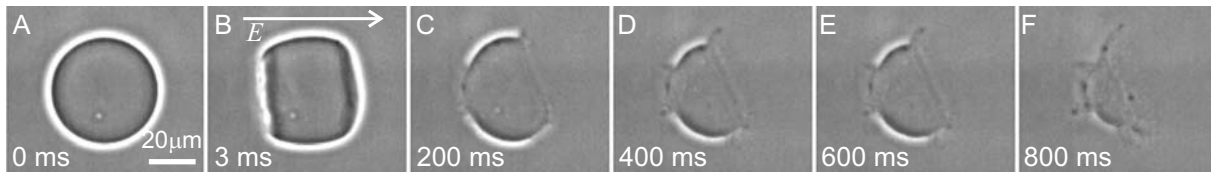


Figure 3: Image sequence of a collapsing vesicle made of DOPC:cholesterol 5:1 exposed to a pulse with a field strength of 50 kV/m and a duration of 5 ms. The field direction is indicated in (B) where the vesicle attains a spherocylindrical shape.

The experiments can be performed using a simple home-made chamber with two electrodes and a microscope. Even though we used a fast digital camera for the acquisition of the images, we did not exploit the full potential of this equipment. Indeed, conventional cameras with acquisition speed of around 1000 fps are now cheap and widely available on the market. Such acquisition speed is more than sufficient for collecting reasonable amount of data in the time range of interest between 5 and 100 ms; see Fig. 2. Second, the total measuring time is less than 5 min. This allows us to perform a significant number of measurements and achieve good data statistics. Note that studies reporting measurements on giant vesicles in the literature very often contain not more than 5 experiments (for example, the method reported in (18) was applied to 3 vesicles only). Most often, the number of measurements is not even mentioned. Achieving good data statistics is important particularly when multicomponent membranes are examined. For example, in vesicles prepared from DOPC, sphingomyelin and cholesterol, Veatch and Keller (38) have estimated a variation of 2 mol % cholesterol between individual vesicles prepared by the electroformation method. Inspection of fluorescent images of DOPC, dioleoylphosphatidylglycerol and cholesterol, which have undergone phase separation, has suggested that this spread may be even larger for certain compositions (39). For this reason, when dealing with multicomponent vesicles one should examine large populations of liposomes. The growing research activity on more complex membrane compositions accentuates the need of developing methods which can quickly and easily be applied

on many vesicles. Our method fulfills this requirement. Third, compared to other methods, our approach is of high precision and allows measuring the edge tension with a relatively small error. Finally, in contrast to the procedures in (21, 40), our experimental approach does not require the presence of (i) a very viscous solvent (typically 66 vol % glycerol) to slow down the pore closure dynamics and (ii) fluorescent dye to visualize the pore. As discussed above, both of these compounds may influence the edge tension value.

We measured the edge tension of membranes with different compositions, and found it to be 27.7 and 14.2 pN for pure DOPC and EggPC bilayers, respectively. Considering the multicomponent character of EggPC, this result is understandable: small fractions of edge active lipid molecules in EggPC can stabilize the pore and lower the edge energy as compared to that of pure DOPC bilayers. Our literature survey shows a significant scatter of the data for EggPC. Values of γ were reported to range from 8.6 to 42 pN; see Table 1. Presumably, EggPC purchased from different producers can vary in terms of composition. Impurities in synthetic lipids like DOPC can also lead to significant variation as demonstrated in (21). Indeed, our results for DOPC are closer to the upper value reported in (21) and to the result measured in (15), which is to be expected having in mind that our lipid was purchased from the same producer; see Table 1. This finding contradicts results obtained from a method based on puncturing supported lipid bilayers by means of an AFM cantilever tip (13). This latter method seems to give systematically lower values for the edge tension; see Table 1 for the data

Membrane composition	Edge tension, γ , in pN	Method	Poration threshold, $\Delta\psi_c$, in mV	Lysis tension σ_{Lys} , in mN/m	Reference
EggPC	14.2 ± 0.7 [41]	Pore closure dynamics and electroporation	920 ± 20	3.79	This work
EggPC	20	Observation of open cylindrical vesicles			(18)
EggPC	8.6 ± 0.4	Electroporation of black lipid membranes			(52)
EggPC	42	Observation of the disk-vesicle transition			(4)
EggPC	8.6 ± 0.4	Electroporation of black lipid membranes			(14)
EggPC	21	Electroporation of black lipid membranes			(15)
DOPC	27.7 ± 2.5 [24]	Pore closure dynamics and electroporation	950 ± 30	4.08	This work
DOPC	25	Electroporation of black lipid membranes			(15)
DOPC from Avanti	20.7 ± 3.5	Pore closure dynamics and light-induced poration			(21)
DOPC from Sigma	6.9 ± 0.42	Pore closure dynamics and light-induced poration			(21)
DOPC	13–18	Pore closure dynamics and light-induced poration			(40)
DOPC	3.9 ± 0.3	Atomic force microscopy			(35)
DOPC:cholesterol 5:1 (mol)	36.4 ± 1.9 [14]	Pore closure dynamics and electroporation	680 ± 20	1.89	This work
DOPC:cholesterol mixtures	9–22	Pore closure dynamics and light-induced poration			(21)
SOPC	9.2 ± 0.7	Micropipette aspiration and electroporation	1100	4.91	(19, 42)
SOPC/cholesterol 1:1 (mol)	30.5 ± 1.2	Micropipette aspiration and electroporation	1800		(19, 42)
SOPC/cholesterol 1:1 (mol)	26	Reinterpretation of results from (19)			(56)
DOPC:DOPE 5:1 (mol)	15.6 ± 1.3 [31]	Pore closure dynamics and electroporation	880 ± 40		This work
EggPE	15 ± 1	Electroporation of black lipid membranes			(14)
Escherichia coli PE	16 ± 0.6	Electroporation of black lipid membranes			(52)
DOPC:Tween 20 mixtures	0.2–12	Pore closure dynamics and light-induced poration			(21, 40)

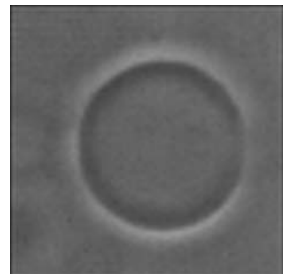
Table 1: Edge tensions for different membrane compositions as measured here and by other groups. The standard errors are given, except if not indicated in the respective literature reference. The numbers in the square brackets indicate the measurements performed for each composition. Data on the critical transmembrane potential and estimates for the lysis tension, see Supporting Material, are also given.

on DOPC in (35) and palmitoyllecithin phosphatidylcholine (POPC) in (41). We can only speculate that the presence of the substrate supporting the bilayer might influence the pore stability and thus the edge tension. Presumably, this method is still applicable when examining relative changes in the edge tension resulting from the presence of edge active molecules (41) or in lipid mixtures (35).

The inclusion of cholesterol in DOPC membranes (5:1 mol:mol or ~ 17 mol %) led to two interesting observations: membrane destabilization when exposed to electric pulses and increase in the edge tension. We first discuss the former.

Electric pulses of 5 ms duration inducing transmembrane voltages of around 1.25 V lead to irreversible collapse of the cholesterol-containing liposomes; see Fig. 3. The reversible poration of the liposomes required the application of pulses with about half the field strength, i.e. transmembrane voltages of approximately 0.7 V. Such pulses did not appear to cause poration on other membrane types, but were able to successfully porate the DOPC:cholesterol GUVs. As shown in Table 1, the critical transmembrane potential needed to rupture the DOPC membrane is lowered by the presence of cholesterol. This observation is interesting and unexpected having in mind the somewhat opposite effect of cholesterol observed on stearyllecithin phosphatidylcholine (SOPC) giant vesicles (19, 42). In SOPC membranes, cholesterol was found to increase the critical poration threshold $\Delta\psi_c$, see Table 1. On the contrary, dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) vesicles doped with 12 and 20 mol% of cholesterol appear to porate at transmembrane potentials lower than that of pure DPPC membranes (43). Finally, for EggPC planar membranes (15) and vesicles (43) no effect of cholesterol on the critical permeabilization potential was observed. In summary, cholesterol, which alters the hydrophobic core of the bilayer, affects the membrane stability in a different fashion depending on the molecular architecture of the lipid building the membrane.

Recent studies suggest that the effect of cholesterol on another material property of membranes, namely the bending stiffness, is also lipid specific and depends on the degree of unsaturation of the



acyl chains (44–46). Earlier conventional beliefs were that by ordering the acyl chains in fluid membranes, cholesterol inherently leads to an increase in their bending rigidity. This concept was supported by observations on lipids such as SOPC (47, 48), dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) (49, 50) and POPC (51). However, as demonstrated recently (44, 46), the bending rigidity of DOPC-cholesterol mixtures does not show any significant correlation with the cholesterol content, while in sphingomyelin-cholesterol membranes it even decreased (46). The origin of the cholesterol-induced lowering of the critical poration potential in DOPC membranes could be sought in its effect on decreasing the membrane conductivity justified in detail in (43). This behavior may be related to lipid ordering. Our results suggest that the influence of cholesterol on the mechanical properties of lipid membranes depends on the specific lipid architecture and is far from being fully elucidated. Further studies of the influence of cholesterol on the membrane properties as a function of lipid type and cholesterol content have still to be performed. Here, we will only emphasize that the critical transmembrane potential of such membranes is a physical parameter very sensitive to the membrane composition and can be employed to characterize various types of membranes and the effect of cholesterol as shown by our data.

While DOPC membranes appear to be destabilized by the addition of cholesterol, as illustrated by a decrease in the critical transmembrane potential and the lysis tension, the edge tension is observed to increase from 27.7 pN for pure DOPC to 36.4 pN for vesicles made of DOPC:cholesterol 5:1. This is consistent with the trend reported in (21) where the dependence of the edge tension γ as a function of the cholesterol molar fraction x was empirically extracted to be $\gamma = \gamma_0 + 26.7x$, where γ_0 is the edge tension of the cholesterol-free bilayer. This expression predicts slightly lower edge tension both for the DOPC membranes measured here and for SOPC vesicles studied in (19); see Table 1 for the exact values. The effect of cholesterol increasing the edge tension is expected, considering the inverted-cone shape of the molecule which is supposed to penalize lipid rearrangement at the pore edge (21).

To summarize, pore stability in DOPC membranes is less favored in the presence of cholesterol. The larger value of γ makes pores close faster. On the other hand, cholesterol reduces the lysis tension by inducing structural changes in the bilayer. This is corroborated by our observation that weaker pulses, which do not have any significant effect on cholesterol-free vesicles were sufficient to porate the DOPC:cholesterol liposomes.

We also studied the edge tension effect of another lipid molecule, DOPE, with the same fraction of approximately 17 mol % in DOPC GUVs. Compared to pure DOPC membranes, we found a significant decrease in the edge tension, from 27.7 to 15.6 pN upon the addition of DOPE, reminding of effects induced by surfactants (21, 40); see the value of γ for DOPC mixtures with the detergent Tween 20 in Table 1. Interestingly, similar values as those for γ of DOPC:DOPE 5:1 were obtained for EggPE and PE extracts from *Escherichia coli* (14, 52). Within the framework of the membrane elasticity theory and considering the inverted-cone shape of the DOPE molecule, one would expect an increase in the edge tension upon DOPE addition, analogously to the effect of cholesterol (21). Our results contradict this view. Presumably, the molecular architecture of PE-lipids leading to the tendency to form inverted hexagonal phase, which facilitates fusion and vesicle leakage, see e.g. (53), is also responsible for stabilizing pores and lowering the edge tension in porated membranes as demonstrated here. A plausible explanation for this behavior is also provided by the propensity of PE to form interlipid hydrogen bonds (54, 55). This behavior is not observed for pure PC bilayers where the edge tension is higher. Our observations suggest that simplistic pictures based on the inverted-cone shape of DOPE are not realistic for the interpretation of pore behavior and edge tensions. Inter-PE hydrogen bonding in the pore region can effectively stabilize pores. It would be interesting to test this hypothesis with simulation studies.

Conclusion

We have successfully developed and applied a new method for edge tension measurements on GUVs. This method is based on the theoretical model introduced in (3) and relies on the study of pore closure dynamics. Combining membrane electroporation, fast phase contrast imaging and digital image analysis, we have been able to monitor the rate of pore closure, and deduce the edge tension of membranes with different compositions. This method is fast and quite easy to apply, and we believe it could be of use to researchers interested in the mechanical properties of biological membranes. We confirmed trends reporting the tendency of cholesterol to increase the edge tension of lipid membranes. However, cholesterol appears to have an unconventional and lipid-specific effect on the membrane stability in electric fields as reflected by the values measured for the critical transmembrane potential and lysis tension. Surprisingly, we found that the addition of DOPE in DOPC vesicles leads to a decrease in the edge tension, which is not, even qualitatively, predicted by the current understanding in the field. We hope our result will provoke some theoretical work in this direction.

Supporting material

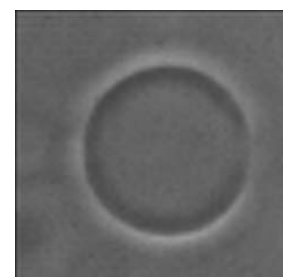
Text and one figure are available at <http://www.biophysj.org>

Acknowledgements

TP's stay in Germany was supported by a grant for international mobility of PhD students from the Université de Toulouse. We thank J. Teissié for his assistance in purchasing the β tech pulse generator, and M.-P. Rols and D. S. Dean for critical reading of the manuscript. We acknowledge financial support from the Association Française contre les Myopathies.

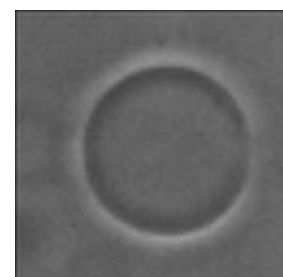
References

1. Litster, J. D., 1975. Stability of lipid bilayers and red blood cell membranes. *Phys. Lett.* 53A:193–194.
2. Boal, D., 2002. Mechanics of the cell. Cambridge University Press, New York.
3. Brochard-Wyart, F., P. de Gennes, and O. Sandre, 2000. Transient pores in stretched vesicles: role of leak-out. *Physica A* 278:32–51.
4. Fromherz, P., C. Röcker, and D. Ruppel, 1986. From discoid micelles to spherical vesicles; the concept of edge activity. *Faraday Discuss.* 81:39–48.
5. Newman, C. M. H., and T. Bettinger, 2007. Gene therapy progress and prospects: ultrasound for gene transfer. *Gene Ther.* 14:465–475.
6. Escoffre, J.-M., T. Portet, L. Wasungu, J. Teissié, D. S. Dean, and M.-P. Rols, 2009. What is (still not) known of the mechanism by which electroporation mediates gene transfer and expression in cells and tissues. *Mol. Biotechnol.* 41:286–295.
7. Leontiadou, H., A. E. Mark, and S. J. Marrink, 2004. Molecular dynamics simulations of hydrophilic pores in lipid bilayers. *Biophys. J.* 86:2156–2164.
8. Jiang, F. Y., Y. Bouret, and J. T. Kindt, 2004. Molecular dynamics simulations of the lipid bilayer edge. *Biophys. J.* 87:182–192.
9. Tolpekina, T. V., W. K. den Otter, and W. J. Briels, 2004. Simulations of stable pores in membranes: system size dependence and line tension. *J. Chem. Phys.* 121:8014–8020.
10. Taupin, C., M. Dvolaitzky, and C. Sauterey, 1975. Osmotic pressure induced pores in phospholipid vesicles. *Biochem. USA* 14:4771–4775.
11. Pabst, G., A. Hodzic, J. Strancar, S. Danner, M. Rappolt, and P. Laggner, 2007. Rigidification of neutral lipid bilayers in the presence of salts. *Biophys. J.* 93:2688–2696.
12. Chang, D. C., and T. S. Reese, 1990. Changes in membrane-structure induced by electroporation as revealed by rapid-freezing electron-microscopy. *Biophys. J.* 58:1–12.



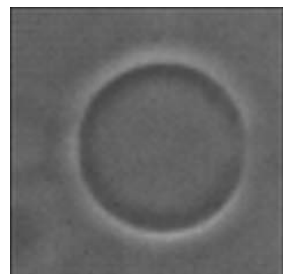
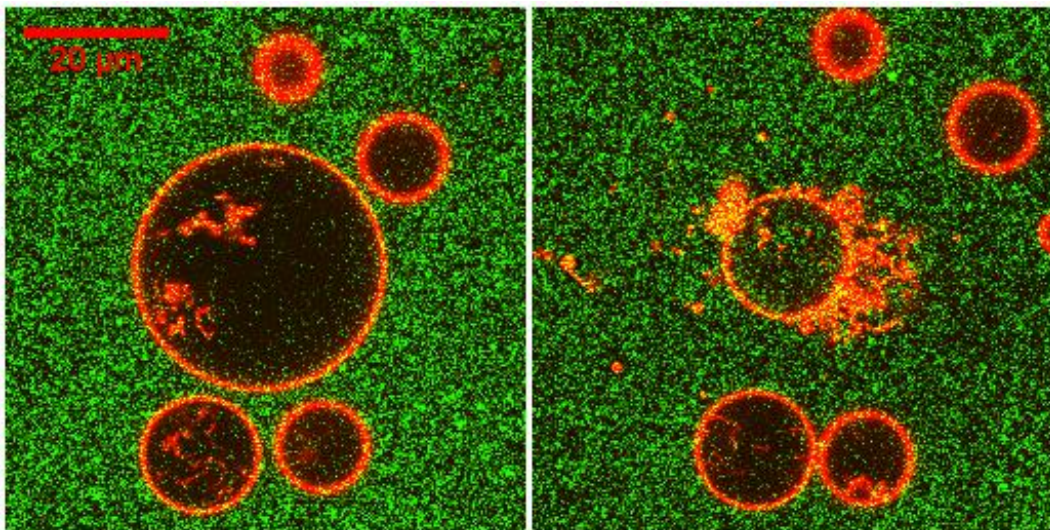
13. Loi, S., G. Sun, V. Franz, and H.-J. Butt, 2002. Rupture of molecular thin films observed in atomic force microscopy. II. Experiment. *Phys. Rev. E* 66:031602.
14. Melikyan, G. B., N. S. Matinyan, and V. B. Arakelian, 1990. The influence of gangliosides on the hydrophilic pore edge line tension and monolayer fusion of lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1030:11–15.
15. Genco, I., A. Gliozzi, A. Relini, M. Robello, and E. Scalas, 1993. Electroporation in symmetric and asymmetric membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1149:10–18.
16. Luisi, P., and P. Walde, 2000. Giant vesicles, volume 6 of *Perspectives in supramolecular chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester.
17. Dimova, R., S. Aranda, N. Bezlyepkina, V. Nikolov, K. A. Riske, and R. Lipowsky, 2006. A practical guide to giant vesicles. Probing the membrane nanoregime via optical microscopy. *J. Phys.: Condens. Matter* 18:S1151–S1176.
18. Harbich, W., and W. Helfrich, 1979. Alignment and opening of giant lecithin vesicles by electric fields. *Z. Naturforsch.* 34a:1063–1065.
19. Zhelev, D., and D. Needham, 1993. Tension stabilized pores in giant vesicles: determination of pore size and pore line tension. *Biochim. Biophys. Acta.* 1147:89–104.
20. Sandre, O., L. Moreaux, and F. Brochard-Wyart, 1999. Dynamics of transient pores in stretched vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:10591–10596.
21. Karatekin, E., O. Sandre, H. Guitouni, N. Borghi, P.-H. Puech, and F. Brochard-Wyart, 2003. Cascade of transient pores in giant vesicles: line tension and transport. *Biophys. J.* 84:1734–1749.
22. The theoretical approach in reference 3 was applied to experiments where the membrane was disrupted by laser ablation in Srividya, N. and S. Muralidharan, 2008. *J. Phys. Chem. B* 112:7147–7152. We consider the results in this work questionable since laser ablation is associated with local evaporation. Indeed, the images provided in this work suggest the formation of bubbles in the sample rather than pores in the membrane .
23. Ayuyan, A. G., and F. S. Cohen, 2006. Lipid peroxides promote large rafts: Effects of excitation of probes in fluorescence microscopy and electrochemical reactions during vesicle formation. *Biophys. J.* 91:2172–2183.
24. Zhao, J., J. Wu, H. L. Shao, F. Kong, N. Jain, G. Hunt, and G. Feigenson, 2007. Phase studies of model biomembranes: Macroscopic coexistence of Lalpha plus Lbeta, with light-induced coexistence of Lalpha plus Lo Phases. *Biochim. Biophys. Acta* 1768:2777–2786.
25. Westh, P., 2003. Unilamellar DMPC vesicles in aqueous glycerol: preferential interactions and thermochemistry. *Biophys. J.* 84:341–349.
26. May, S., 2000. A molecular model for the line tension of lipid membranes. *Eur. Phys. J. E* 3:37–44.
27. Riske, K. A., and R. Dimova, 2005. Electrodeformation and poration of giant vesicles viewed with high temporal resolution. *Biophys. J.* 88:1143–1155.
28. Haluska, C. K., K. A. Riske, V. Marchi-Artzner, J.-M. Lehn, R. Lipowsky, and R. Dimova, 2006. Time scales of membrane fusion revealed by direct imaging of vesicle fusion with high temporal resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:15841–15846.
29. Dimova, R., K. A. Riske, S. Aranda, N. Bezlyepkina, R. L. Knorr, and R. Lipowsky, 2007. Giant vesicles in electric fields. *Soft Matter* 3:817–827.
30. Angelova, M. I., and D. S. Dimitrov, 1986. Liposome electroformation. *Faraday Discuss.* 81:303–311.
31. Portet, T., F. Camps, J.-M. Escoffre, C. Favard, M.-P. Rols, and D. S. Dean, 2009. Visualization of membrane loss during the shrinkage of giant vesicles under electropulsation. *Biophys. J.* 96:4109–4121.
32. Weast, R., 1988. Handbook of chemistry and physics. CRC Press, Boca Raton, 69 edition.
33. Tekle, E., R. D. Astumian, W. A. Friauf, and P. B. Chock, 2001. Asymmetric pore distribution and loss of membrane lipid in electroporated DOPC vesicles. *Biophys. J.* 81:960–968.
34. Riske, K. A., and R. Dimova, 2006. Electric pulses induce cylindrical deformations on giant vesicles in salt solutions. *Biophys. J.* 91:1778–1786.

35. Chiantia, S., J. Ries, N. Kahya, and P. Schwille, 2006. Combined AFM and two-focus SFCS study of raft-exhibiting model membranes. *ChemPhysChem* 7:2409–2418.
36. Riske, K., R. Knorr, and R. Dimova, 2009. Bursting of charged multicomponent vesicles subjected to electric pulses. *Soft Matter* 5:1983–1986.
37. Neumann, E., A. E. Sowers, and C. A. Jordan, 1989. Electroporation and electrofusion in cell biology, Plenum, New York, 3–21. First edition.
38. Veatch, S. L., and S. L. Keller, 2003. A closer look at the canonical 'raft mixture' in model membrane studies. *Biophys. J.* 84:725–726.
39. Vequi-Suplicy, C. C., K. A. Riske, R. L. Knorr, and R. Dimova, 2010. Vesicles with charged domains. *Biochim. Biophys. Acta* 1798:1338–1347.
40. Puech, P.-H., N. Borghi, E. Karatekin, and F. Brochard-Wyart, 2003. Line thermodynamics: adsorption at a membrane edge. *Phys. Rev. Lett.* 90:128304.
41. García-Sáez, A. J., S. Chiantia, J. Salgado, and P. Schwille, 2007. Pore formation by a Bax-derived peptide: effect on the line tension of the membrane probed by AFM. *Biophys. J.* 93:103–112.
42. Needham, D., and R. M. Hochmuth, 1989. Electro-mechanical permeabilization of lipid vesicles - Role of membrane tension and compressibility. *Biophys. J.* 55:1001–1009.
43. Raffy, S., and J. Teissié, 1999. Control of lipid membrane stability by cholesterol content. *Biophys. J.* 76:2072–2080.
44. Pan, J. J., T. T. Mills, S. Tristram-Nagle, and J. F. Nagle, 2008. Cholesterol perturbs lipid bilayers nonuniversally. *Phys. Rev. Lett.* 100:198103.
45. Pan, J., S. Tristram-Nagle, N. Kucerka, and J. F. Nagle, 2008. Temperature dependence of structure, bending rigidity, and bilayer interactions of dioleoylphosphatidylcholine bilayers. *Biophys. J.* 94:117–124.
46. Gracia, R. S., N. Bezlyepkina, R. L. Knorr, R. Lipowsky, and R. Dimova, 2010. Effect of cholesterol on the rigidity of saturated and unsaturated membranes: fluctuation and electrodeformation analysis of giant vesicles. *Soft Matter* 6:1472–1482.
47. Evans, E., and W. Rawicz, 1990. Entropy-Driven Tension and Bending Elasticity in Condensed-Fluid Membranes. *Phys. Rev. Lett.* 64:2094–2097.
48. Song, J. B., and R. E. Waugh, 1993. Bending Rigidity of Sopc Membranes Containing Cholesterol. *Biophys. J.* 64:1967–1970.
49. Duwe, H. P., J. Kaes, and E. Sackmann, 1990. Bending Elastic-Moduli of Lipid Bilayers - Modulation by Solutes. *J. Phys. IV* 51:945–962.
50. Meleard, P., C. Gerbeaud, T. Pott, L. FernandezPuentes, I. Bivas, M. D. Mitov, J. Dufourcq, and P. Bothorel, 1997. Bending elasticities of model membranes: Influences of temperature and sterol content. *Biophys. J.* 72:2616–2629.
51. Henriksen, J., A. C. Rowat, E. Brief, Y. W. Hsueh, J. L. Thewalt, M. J. Zuckermann, and J. H. Ipsen, 2006. Universal behavior of membranes with sterols. *Biophys. J.* 90:1639–1649.
52. Chernomordik, L., M. Kozlov, G. Melikyan, I. Abidor, V. Markin, and Y. Chizmadzhev, 1985. The shape of lipid molecules and monolayer membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta* 812:641–655.
53. Ellens, H., J. Bentz, and F. C. Szoka, 1986. Fusion of phosphatidylethanolamine-containing liposomes and mechanism of the L α -H II phase-transition. *Biochemistry* 25:4141–4147.
54. Lewis, R. N. A. H., and R. N. McElhaney, 1993. Calorimetric and spectroscopic studies of the polymorphic phase-behavior of a homologous series of n-saturated 1,2-diacyl phosphatidylethanolamines. *Biophys. J.* 64:1081–1096.
55. Pink, D. A., S. McNeil, B. Quinn, and M. J. Zuckermann, 1998. A model of hydrogen bond formation in phosphatidylethanolamine bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1368:289–305.
56. Moroz, J., and P. Nelson, 1997. Dynamically stabilized pores in bilayer membranes. *Biophys. J.* 72:2211–2216.



Annexe F

Manuscrit en préparation sur l'électrotransfert d'ADN dans des GUVs



An Electrotransfer Based Method to Load Giant Vesicles with Plasmid DNA

Thomas Portet^{a,b}, Cyril Favard^c, Justin Teissie^b, David S. Dean^a, and Marie-Pierre Rols^{*b}

^a*Laboratoire de Physique Théorique, CNRS UMR 5152, Université Paul Sabatier, Toulouse, FRANCE.*

^b*Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, CNRS UMR 5089, Université Paul Sabatier, Toulouse, FRANCE.*

^c*Institut Fresnel, CNRS UMR 6133, Aix Marseille Université, Marseille, FRANCE.*

Abstract

We demonstrate a method to load high molecular mass plasmid DNA into giant unilamellar vesicles using electroporation pulsed electric fields. The uptake of DNA is quantitatively studied, using fluorescence microscopy, as a function of the number, amplitude and duration of applied electric pulses. In some cases it is found that the concentration of DNA within the electropulsed vesicles can exceed the concentration of DNA in the external solution.

Keywords: giant vesicle; electroporation; DNA transfer; modeling; fluorescence microscopy

Introduction

The transfer of a non permeant molecule such as plasmid DNA into cells requires the transient increase of their plasma membrane permeability. Among non-viral methods, electrotransfer appears to be one of the most promising for clinical applications. However, the mechanisms responsible for the success of this method are still to be fully understood. One of the major problems is unravelling the relative importance of purely physical processes and biological phenomena. For instance the cell membrane is more than a lipid barrier containing the cell interior, it contains inter-membrane proteins and plays a functional role. Giant unilamellar vesicles represent an elegant and

convenient way to explore the interaction between a model lipid membrane and DNA in the presence of an electric field. The purpose of this paper is to analyze the way in which DNA can be transferred into GUVs using an electric field. Further, we will quantify this process and attempt to find a physical interpretation for our findings. As well as being of interest for its comparison with the uptake of DNA into cells, this study presents a practical new method for loading vesicles with negatively charged macromolecules which may have a number of pure and applied applications.

The lipid membrane is one of the major building blocks of life due to its specific physical properties, the most essential being its impermeability to hydrophilic molecules and ions which allows for a compartmentation crucial to all presently known living organisms (1). However, the membrane can be safely and transiently permeabilized in a very elegant manner by applying electric pulses (2). Providing that the pulses are of sufficient duration (3) and amplitude (4), otherwise non permeant molecules of therapeutic interest can enter the cytoplasm of mammalian cells. This fact has led to two clinical applications: electrochemotherapy (5) and electrogenetherapy (6). The former involves small molecules such as cisplatin or bleomycin, and the latter larger molecules such as plasmid DNA.

As was described in (7), the mechanisms of molecular uptake under electroporation, although poorly understood for the moment, depend strongly on whether the transferred objects have molecular or

*Corresponding author: rols@ipbs.fr

macro-molecular sizes. Whereas smaller ones seem to be able to freely cross electroporabilized membranes, macromolecules exhibit an intermediate interaction near/with the membrane, the degree of this interaction being correlated with the ultimate transfection efficacy.

In this paper we describe experiments performed on model membrane systems, namely Giant Unilamellar Vesicles (GUVs). Such systems are of great interest in the study of electroporation and have already been used in several studies (8–10) due to their easy fabrication and their size which is similar to that of eukaryotic cells and thus allows their direct observation via optical microscopy techniques. Another advantage of working with GUVs is the absence of cytoskeleton, or other organelles, and the possibility of precisely controlling the membrane composition. Indeed, our present work focuses on the quantification of DNA uptake through fluorescence techniques, and because we can ensure that the vesicle has very similar internal and external compositions, we can precisely quantify the uptake of DNA into the vesicle with respect to the concentration in the pulsation buffer (the fluorescence is the same for molecules inside and outside the vesicles, but this is clearly not the case for fluorescence in solution and the cell cytoplasm). The quantitative nature of our experimental results means that we can get a better understanding of what happens at the level of the membrane and propose an effective physical interpretation of the phenomenon of DNA entry into the vesicle during electroporation.

To our knowledge, DNA electrotransfer into liposomes was first studied by Chernomordik et al. (11). They found that high molecular mass DNA could enter DPPC/cholesterol (7:3, mol:mol) SUVs, via endocytosis-like vesicles which shield the electrotransferred DNA from the internal medium. The internalization mechanism they proposed was based on their observation of the characteristic fluorescence of DNA/EB complexes after sonication of EB-loaded vesicles which were pulsed in the presence of DNA. However, they could not directly observe the liposomes because of their small size. The conclusions of (11) were subsequently questioned by Lurquin and Athanasiou (12), who observed that large ($\approx 10 \mu\text{m}$)

EB-loaded DPPC liposomes pulsed with DNA did actually show the bright fluorescence of DNA/EB complexes before (or even without) sonication. These results support a mechanism involving electropores and a direct entrance of DNA into the vesicle and at variance with the findings of (11).

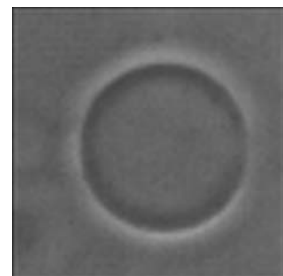
Here we present new experimental results on electroporation-mediated DNA uptake by EggPC GUVs. We shed light on the internalization mechanism, and we show that a simple theory correlates very well with our experimental data. We then discuss the implications and consequences of this work.

Materials and methods

GUVs

Egg yolk L- α -phosphatidylcholine (EggPC), dioleoylphosphatidylcholine (DOPC) and L- α -phosphatidylethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (Rhodamine PE) were purchased from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Lipids were diluted in chloroform, at a mass concentration of 0.5 mg/mL, and stored at -20°C . Rhodamine PE dye was added at a concentration of 1 mol %.

The vesicles were prepared at room temperature using the electroformation protocol (13), in an aqueous solution of 240 mM sucrose (internal solution) and subsequently diluted in an aqueous solution of 260 mM glucose and 1 mM sodium chloride (external solution). The pH of the external solution was adjusted to 7 using 1 mM phosphate buffer ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, Merck, Darmstadt, Germany). pH of the internal solution was measured to be 6.6. This slight initial pH asymmetry did not have any effect on our experiments: non-pulsed vesicles were stable for several tens of minutes, and no increase in DNA concentration inside a non-pulsed GUV could be detected. Furthermore, this initial pH difference vanished after a few permeabilizing pulses because of the mixing of inner and outer solutions. The conductivities of the internal and external solutions were measured with conductivitymeter HI 8820 (Hanna Instruments, Lingolsheim, France), and had values of approximately $15 \mu\text{S}/\text{cm}$ and $450 \mu\text{S}/\text{cm}$, respectively. The osmolarities, measured with Osmomat 030 osmometer (Gonotec, Berlin, Germany), were approximately 280 mOsm/kg and 300 mOsm/kg, respectively. These solutions are typically used when working with GUVs for several reasons. The



similar osmolarities ensure that the GUVs have very little initial membrane tension, the low conductivities prevent Joule heating in the pulsation chamber, and the sugar asymmetry yields a density difference that allows sedimentation of the vesicles to the bottom of the chamber and facilitates their location.

Electroformation was performed as follows. A small volume (15 μL) of the lipid solution in chloroform was deposited on the conducting sides of glass slides coated with indium tin oxide. The glasses were then kept for two hours under vacuum in a desiccator to remove all traces of the organic solvent. Afterwards, the plates, spaced by a 1 mm thick silicon frame (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) were assembled into a chamber. The chamber was filled with the sucrose solution (internal medium). The slides were connected to an AC field function generator (AC Exact, model 128; Hillsboro, OR) and sinusoidal voltage of 25 mV peak to peak at 10 Hz was applied. The voltage was increased by 100 mV steps every 5 minutes, up to a value of 1225 mV and maintained under these conditions overnight. Finally, square-wave AC field of the same amplitude was applied at 5 Hz for one hour in order to detach the GUVs from the slides.

DNA

A 4.7 kbp plasmid pEGFP-C1 (Clontech, Mountain View, CA) carrying the green fluorescent protein gene controlled by the cytomegalovirus promoter was stained stoichiometrically with the DNA intercalating dye TOTO-1 (Molecular Probes, Eugene, OR). Staining was carried out at a DNA concentration of 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ for 60 minutes on ice, at a basepair to dye ratio of 20. Plasmids were prepared from *Escherichia coli* transfected cells by using Maxiprep DNA purification system (Qiagen, Chatsworth, CA). The plasmid was then diluted in the pulsation buffer at a mass concentration of 1 μg per 100 μL , a value typically used in cell electrotransfection experiments. This plasmid was chosen because of its large size similar to those of the DNAs used in (11, 12), and also because it is classically used in gene electrotransfer studies and has been observed to form discrete interaction sites at the cell surface during electropermeabilization experiments (7).

Electropulsation

Pulsation chambers were similar to those used in (14). Two parallel copper strips (3M, Cergy-Pontoise, France) were stuck on a glass slide 0.5 cm apart. A glass coverslip was then stuck onto the glass slide with heated parafilm.

The cavity between the slide and the coverslip was filled with 30 μL of the buffered glucose solution and 2 μL of the GUV solution. Electropulsation was performed directly on the microscope stage, by applying a series of 10, 20 or 40 pulses of 0.5, 1 or 5 ms duration at 0.33 Hz repetition frequency with a β -Tech pulse generator. Field amplitudes E_0 were adjusted according to the initial vesicle radius R_0 in order to impose initial induced transmembrane voltages $\Delta\psi_0 = (3/2)R_0E_0$ ranging between 0.5 and 2 V, and as a consequence varied between 20 and 80 kV/m from one experiment to another.

Confocal microscopy

All experiments were performed under an inverted confocal microscope (Zeiss LSM510; Carl Zeiss, Jena, Germany) equipped with a with a $63\times$ Zeiss objective for fluorescence imaging. For the red channel (membrane labeled with Rhodamine), excitation at 543 nm was provided by a HeNe laser, and emission filter was a 560 nm long pass. For the green channel (DNA labeled with TOTO-1), excitation at 488 nm was provided by a Ar laser, and emission filter was a 500-530 nm band pass. Images were acquired sequentially. Acquisition time was 2 s (1 s for each channel), thus one image on each channel could be acquired between every two consecutive pulses.

Image and data processing

We were interested in two different quantities, both measurable via confocal fluorescence microscopy: the vesicle radius R and the ratio of the DNA concentrations inside and outside the vesicle, c/c_0 . As we work in dilute water solutions with similar physicochemical properties, the concentration of a fluorescently-labeled molecule is simply proportional to the mean fluorescence intensity due to this molecule, thus the quantity c/c_0 is equal to I/I_0 , the ratio of the mean fluorescence intensities inside and outside the vesicle, which is easily attainable in our experiments.

Our images were composed of two channels: a red one for Rhodamine PE (lipid membrane) and a green one for TOTO-1 (DNA). GUVs size measurements were performed on the red channel in a semi-automatic manner via custom-written programs, and DNA amount quantification was performed on the green channel automatically, by computing the mean fluorescence intensity inside the vesicle within a disk whose radius was chosen at a value of 80 % of the measured radius of the vesicle (we checked

that no significant differences were seen for disk size values ranging from 60 to 90 % of the GUV size). This procedure was repeated for each image, so we were able to plot the vesicle size and the DNA quantity trapped in the vesicle as a function of time. We also computed the mean fluorescence intensity outside the vesicle. It was checked that this value did not change significantly after each pulse, and thus we used the value computed from the first image.

All images had non-zero mean fluorescence intensity values, even inside a non-pulsed vesicle where no DNA was present, or in pictures of pulsation chambers filled with pure water. This was due to the bias level of the confocal microscope sensors. In order to properly quantify DNA concentrations, we estimated this bias fluorescence level inside a non-permeabilized GUV containing no DNA, and subtracted this quantity from the measured internal and external DNA fluorescence intensities to obtain the fluorescence intensity ratio I/I_0 equal to the concentration ratio c/c_0 .

Data for c/c_0 exhibited rather strong fluctuations and were smoothed using a $n = 3$ moving average technique. Error bars in Fig. 2 were obtained by computing the standard deviation of an approximately constant c/c_0 after the application of pulses, for each experiment. Image and data processing tasks were performed with Matlab (The Mathworks, Natick, MA) and ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD).

Numerical computation of the flux of the electric field

As described in the theoretical section of this paper, we were interested in the value of the flux of the electric field across a permeabilized region of the GUV, the permeabilized region being defined as a spherical cap of angle θ facing the cathode. We computed numerically this flux ϕ as a function of θ using the finite element calculus software Comsol Multiphysics (Comsol, Burlington, MA).

The GUV was modeled as a spherical shell of radius R and internal electrical conductivity σ_i , embedded in an aqueous solution of electrical conductivity σ_e . Laplace's equation for the electric potential ψ (15)

$$\nabla \cdot \sigma \nabla \psi = 0 \quad (1)$$

was solved numerically in a cylindrical box of radius L and height $2L$, taking advantage of the axial symmetry of this problem. An electric field of amplitude $E_0 = V_0/L$ was applied in the z -direction parallel to the cylinder axis,

by imposing the Dirichlet boundary conditions $\psi = V_0$ and $\psi = -V_0$ on the top and the bottom faces of the cylinder, hence their names of anode and cathode, respectively. The membrane was modeled using thin layer boundary condition with a thickness $d = 4$ nm and a membrane conductivity $\sigma_m = 5 \cdot 10^{-7}$ S/m (16). For representing the permeabilized region of the vesicle facing the cathode, we replaced the membrane conductivity σ_m by the external conductivity σ_e on a spherical cap of angle θ . Numerical integration of $E = -\nabla\psi$ on that surface thus gave us the value of the flux ϕ as a function of θ .

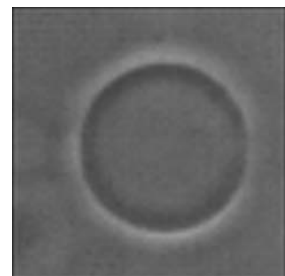
Different values of the model parameters R , E_0 , σ_i and σ_e corresponding to realistic experimental conditions were explored, and are given in the theoretical section and in Figs. 3 and 4. Typical values were $R = 10 \mu\text{m}$, $E_0 = 50$ kV/m, $\sigma_i = 100 \mu\text{S/cm}$ and $\sigma_e = 400 \mu\text{S/cm}$.

Experimental results

We performed DNA electrotransfer experiments with 21 EggPC liposomes. Either 10, 20 or 40 pulses were applied at 0.33 Hz. The duration of the applied pulse were 0.5, 1 or 5 ms, these durations correspond to those commonly used in electromediated gene therapy (3). The longest pulse duration τ was observed to maximize the amount of transferred DNA, so most of the experiments were done at this value of 5 ms. Depending on the experiment, the pulse amplitude varied from 20 to 80 kV/m. The applied field magnitude E_0 was tuned in order to obtain initial induced transmembrane voltages (at the poles facing the cathode and the anode) ranging between 0.5 and 2 V. This was estimated from the formula for the voltage drop at a point on the membrane whose radial vector (of magnitude R) makes an angle θ with the direction of the applied field;

$$\Delta\psi = -\frac{3}{2}E_0R \cos(\theta). \quad (2)$$

This formula is valid when the conductivity of the membrane is much smaller than that of the solutions in the exterior interior of the vesicle and when the thickness of the membrane is very small. Here the membrane thickness is d is small (which is the case). In some cases we were able to keep several vesicles in the optical field, thus we could gather data from



several liposomes during the same experiment. Typically, we tuned the field magnitude according to the size of the largest GUV we could see. In (14) it was established for EggPC and DOPC liposomes that there was a critical value of the absolute value of the transmembrane voltage $\Delta\psi_c$ below which vesicles were not permeabilized and show no change under the application of the electric field. Sufficiently large vesicles are seen to eject lipid material in the form of small vesicles and tubules, however this lipid ejection causes the vesicle radius to diminish and at constant field, when the radius R falls below a threshold value the vesicle is no longer visibly affected by the field. In agreement with the results of (14) it was found that the smallest liposomes were not permeabilized and no DNA fluorescence could be detected inside them. For vesicles of intermediate sizes, the permeabilized area is smaller than that of the largest GUV on which the field of view was centered. Consequently these vesicles should be expected to exhibit relatively low amounts of DNA uptake. However, we kept such vesicles in our analysis, and coherent results for the increments of the internal DNA concentration were also obtained with them.

As can be seen in Fig. 1, it is possible to optically detect DNA entering the vesicle - a movie is also provided as Supplementary Information on the journal website. The images show vesicles exhibiting lipid loss via formation of tubular structures. These structures were created on the anode facing side of the GUV and appeared to remain attached to the vesicle and stable over a few minutes, as previously reported in (14) for DOPC liposomes.

The dark zones seen at the top of the vesicles (facing toward the cathode) could be due local DNA depletion caused by the hydrodynamic flow resulting from the leakage of the inner sucrose solution.

We confirm the results of Lurquin and Athanasiou (12), namely the free entrance of DNA through pores formed by the electric field. Indeed if an uptake via endocytosis-like vesicles was the predominant mechanism, we would see such vesicles in most of our experiments, however this is not the case. Therefore our images clearly speak in favour of an entrance via pores. We mention that we sometimes noticed endocytosis events, but they were very rare, and these

phenomena always took place after application of the electric pulses. A detailed explanation of this rare uptake via vesicles is beyond the scope of the present work. However, we stress that an explanation based on the mechanism described in (17) would not be satisfactory because in that study the authors reported no DNA internalization within liposomes made just of zwitterionic lipids, as is the case in our experiments.

We further add that similar qualitative behavior was also observed during preliminary experiments performed on DOPC vesicles, but the analysis and images presented in this paper were obtained with EggPC GUVs only.

Typical examples of fluorescence experimental data, obtained as described in the Materials and Methods section, are shown in Fig. 2 (diamond marks). These data for I/I_0 are the ratio of the mean fluorescence inside and outside the GUV, and are equivalent to the relative DNA concentration c/c_0 , where c is the DNA concentration inside the liposome and c_0 the DNA concentration outside the liposome. A ratio I/I_0 equal to 1 thus means that the DNA concentrations inside and outside the vesicle are the same. The field amplitude E_0 , the pulse duration τ , the number of pulses N , the initial vesicle radius R_0 and the initial transmembrane voltage $\Delta\psi_0$ induced by the electric field are given in each panel. For each experiment, we observe an increase of the amount of DNA inside the vesicle during the application of the pulses, along with a stabilization after the end of the pulse sequence. This clearly shows that DNA can enter GUVs and remain trapped in a stable manner, without significant leakage. We draw the reader's attention to the different scales used on each panel: the final DNA concentrations inside the liposomes presented in the two top panels were much lower than for those presented in the bottom panels.

A number of control experiments were performed. First, we checked that fluorescence intensities inside the liposomes did not change if we did not apply pulses. This verification was performed on long timescales (several minutes). As a second control experiment, we applied a series of ten pulses and checked that the fluorescence level, after having increased, remained stable until the application of another train consisting of ten pulses of slightly higher

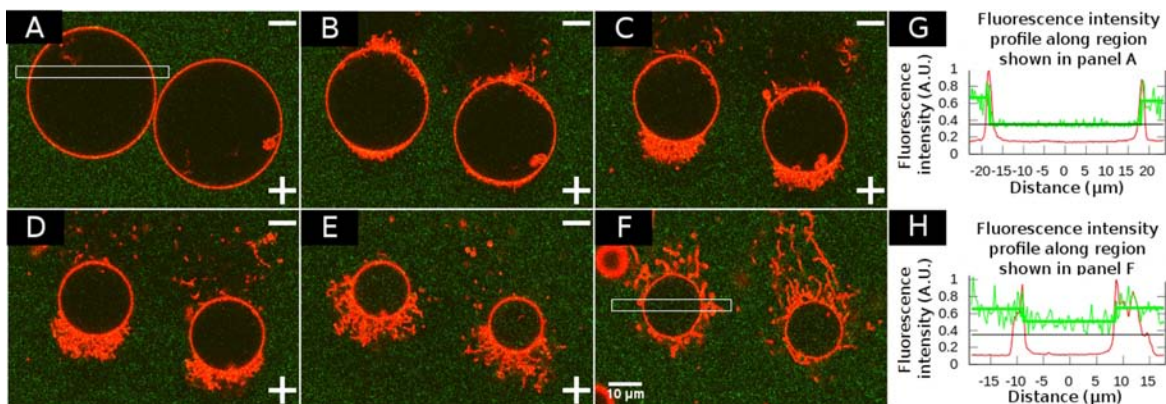
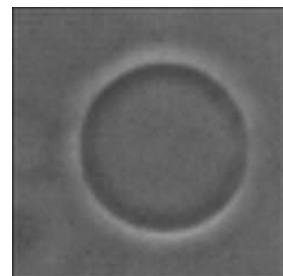


Figure 1: **A-F**: Typical raw images of one experiment. Rhodamine PE (lipid membrane) and TOTO-1 (DNA) are shown in red and green respectively. 20 pulses of 390 V/cm amplitude and 5 ms duration were applied at 0.33 Hz (one pulse every three seconds, and a total pulsation time of 60 s). Images were taken at 0, 6, 12, 18, 54 and 222 s; time origin was defined as the onset of the acquisition, and the first pulse was applied after about 2.5 s. Vesicles are thus shown after having received 0, 2, 4, 6, 18 and 20 electric pulses, respectively. Field polarity is indicated on pictures acquired during electropulsation (+ and - electrodes). The last picture (panel F) was acquired more than two minutes after the pulse train, and shows the stability of the vesicles loaded with DNA. Tubular structures associated with vesicle size decrease and similar to those described in (14) are present. A scalebar of 10 μm length can be seen on panel F. **G and H**: Fluorescence intensity profiles along white rectangular regions shown in panels A and F, respectively. Thick green line represents the mean value of TOTO-1 fluorescence intensity inside, on the left, and on the right of the GUV. Thick black line represents the bias fluorescence level, a non zero fluorescence value corresponding in reality to a zero DNA concentration. This value was thus subtracted for subsequent data analysis.

amplitude, which induced a subsequent augmentation of the relative fluorescence intensity. This is important as it proves the DNA uptake is induced directly by the electric field, ruling out the possibility that the vesicle remains permeable to DNA for some time after the field is cut and emphasizing the importance of the electrophoretic force on the DNA as well as the fields permeabilizing effect on the membrane. We also carried out control experiments with TOTO-1 but with no DNA, in order to check that it was not unbounded dye we observed. The quantum yield of TOTO-1 is dramatically increased when bound to DNA, however images acquired, with same microscope settings, in the absence of DNA should be much less fluorescent than those with DNA. This was indeed the case (in fact the signal from TOTO-1 alone was too weak to be detected), thus proving

that it was indeed fluorescently labeled DNA we were monitoring.

Interestingly, we found that sometimes the final DNA concentration inside the GUV could exceed the outer DNA concentration ($c/c_0 = I/I_0 > 1$). That can be seen for example on the bottom right panel of Fig. 2. This is quite surprising, and means that if the DNA enters the vesicle from the cathode facing pole driven by the electric field, it is not able to freely leak out the vesicle from the other pole. Indeed, if the permeabilization structures were the same on each hemisphere of the liposome, the maximal DNA concentration ratio possible should be $c/c_0 = 1$. This is not the case in our experiments. This observation, along with the asymmetric formation of tubules, highlights the different membrane reorganization and symmetry breaking between the two hemispheres. The possibil-



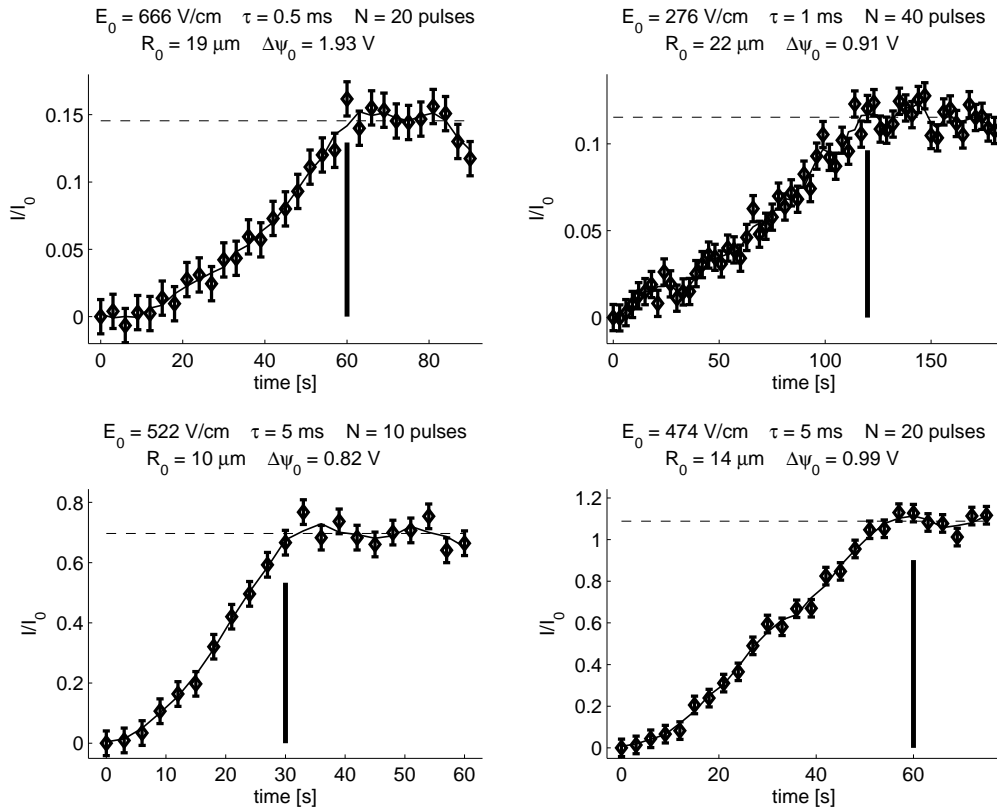


Figure 2: Plots of the relative mean fluorescence intensity inside the vesicle I/I_0 (or equivalently the relative concentration of DNA c/c_0) as a function of time, for 4 typical experiments. Diamond marks represent raw data, and thin full lines these same data smoothed by a $n = 3$ moving average procedure. This smoothed values were used to compute the individual concentration increments δx . Error bars were obtained by computing the standard deviation for the I/I_0 values after the pulse sequence. Final relative concentration, obtained by averaging the I/I_0 values after the pulse sequence, is shown with horizontal dashed lines. Thick vertical lines indicate the end of the pulse sequence. Note the different horizontal and vertical scales for each graph. Electric field parameters, initial vesicle radius R_0 and initial induced transmembrane voltage $\Delta\psi_0$ are given on each panel. One pulse was applied between every two consecutive data points (0.33 Hz repetition frequency).

ity of exceeding the external concentration of DNA within the vesicle also implies that the electrophoretic force due to the applied field overcomes the osmotic force due to the difference in the concentrations between the inside and outside of the vesicle, this will

be discussed in the theory section which follows. We were also able to monitor the size decrease of the GUVs during the experiments. Applying the method previously described in (14), we extracted from these data the fraction of permeabilized area lost per pulse

λ and the critical transmembrane potential difference $\Delta\psi_c$ required to observe the size decrease of the GUVs. For the pulses of 5 ms duration (the same duration τ as used in (14)), we find by averaging on all our experiments: $\lambda \approx 0.32$ and $\Delta\psi_c \approx 0.50$ V. The value found for λ agrees well with the previously reported value of 0.31, which means that the GUVs still lose ~ 30 % of their permeabilized area (where $\Delta\psi_c$ is exceeded) per pulse (14). However, the $\Delta\psi_c$ value of 0.50 V found here is much smaller than the value 0.89 V found for vesicles pulsed in the absence of DNA. This suggests that the presence of DNA in the external medium, and/or inside the vesicle after a few permeabilizing pulses, tends to destabilize the vesicle membrane and makes it easier to electropermeabilize.

Theoretical analysis of the relative DNA concentration increments

The theoretical interpretation of our experimental results is rather difficult as we do not have explicit access to the way in which the vesicles are permeabilized.

In this section we will present a simple model describing the relative DNA concentration increment $\delta x = \delta c/c_0$ inside a vesicle of radius R , caused by an electric pulse of amplitude E_0 and duration τ . The DNA concentration increment inside the vesicle, per pulse, is denoted by δc , and the constant outside concentration by c_0 . We will assume that the major contribution to δx is due to the pulling of the DNA molecules by the electric field, and we will see that our 360 experimental data points agree with this hypothesis.

The DNA concentration c is governed by an electrodiffusion equation

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -\nabla \cdot \mathbf{j}, \quad (3)$$

where \mathbf{j} is the thermodynamic current $\mathbf{j} = -D\nabla c + \mu c \mathbf{E}$. The first term is a diffusion term that depends on the molecule diffusion coefficient D . The

second term is an electrophoretic term depending on the local field \mathbf{E} and the electrophoretic mobility of the molecule μ (the steady state velocity \mathbf{v} of the molecule in a field \mathbf{E} is given by $\mathbf{v} = \mu \mathbf{E}$). The DNA concentration increment $\delta c(t)$ inside an object \mathcal{V} of volume V during a time t is given by

$$\delta c(t) = \int_0^t \left(\frac{1}{V} \int_{\mathcal{V}} \frac{\partial c}{\partial t} d\mathbf{x} \right) dt, \quad (4)$$

which can be written using Gauss's theorem:

$$\delta c(t) = \int_0^t \left(\frac{1}{V} \int_{\mathcal{S}} -\mathbf{j} \cdot d\mathbf{S} \right) dt. \quad (5)$$

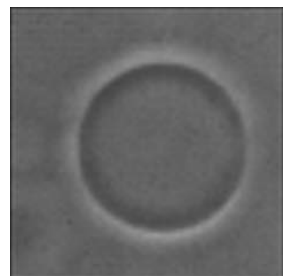
We easily estimate the relative important of electrophoretic forces and DNA diffusion by comparing the diffusive or osmotic part of the current per concentration $\mathbf{r}_{os} = \mathbf{j}_{os}/c = -D\nabla \ln(c)$ and the electrophoretic part $\mathbf{r}_{ep} = \mathbf{j}_{ep}/c = \mu \mathbf{E}$. We use the following values of DNA in solution: $\mu = -3.75 \times 10^{-8} \text{ m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$ (18) and $D = 10^{-12} \text{ m}^2 \text{s}^{-1}$ (19). We use the estimations $|\mathbf{r}_{os}| \sim D |\ln(c/c_0)|/R$ (where c is the average DNA concentration in the vesicle and R the vesicle radius) and $|\mathbf{r}_{ep}| \sim |\mu|E_0$, this gives

$$\frac{|\mathbf{r}_{os}|}{|\mathbf{r}_{ep}|} \sim \frac{D |\ln(c/c_0)|}{|\mu|E_0 R} \sim 10^{-4} \ln \left(\frac{c}{c_0} \right) \quad (6)$$

for the lower range of permeabilizing applied voltages. We see that the effect of diffusion are negligible except for perhaps the first pulse when $c \sim 0$.

The concentration increment $\delta c(t)$ is simply related to the integral over time of the flux of the thermodynamic current \mathbf{j} across the surface \mathcal{S} . Let us now consider a spherical object with fixed volume V and let us compute the concentration increment δc from the onset of one pulse to the onset of the subsequent pulse. Using a constant volume is a reasonable approximation because in our experiments the average volume decrease caused by a single pulse is still small compared to the initial volume of the vesicle.

We will base the analysis of our experimental results on the following assumptions (i) the dominant transport process is electrophoretic and we neglect DNA diffusion (ii) we assume that over the period of the pulse a conducting hole is created in the membrane which has a radius a . This means that the area



of the conducting hole in the membrane averaged over the time of the pulse application is a . Beyond the time averaging this is a crude simplification, as the surface permeable to ions may be larger than the one permeable to DNA, and because we can not be sure that there is really a single macropore in the lipid bilayer, instead of several smaller pores, or some other kind of defects. Nevertheless, we expect the electroconvected flux of DNA into the vesicle to be of the same order. Upon a pulse of duration τ the increase in concentration is given by

$$\delta c = \frac{|\mu|c_0\tau}{V} \int_{S_p} \mathbf{E} \cdot d\mathbf{S} . \quad (7)$$

i.e. concentration increment δc is just proportional to the flux ϕ of the local electric field \mathbf{E} across the permeabilized surface S_p , the hole of radius a . In terms of the relative concentration increments $\delta x = \delta c/c_0$, which are exactly the differences between every two consecutive points of our experimental data for I/I_0 , this can be written

$$\delta x = \frac{3|\mu|\tau}{4\pi R^3} \phi . \quad (8)$$

In order to be able to evaluate δx , we should be able to evaluate ϕ . Recall we assume that the permeabilized area is a spherical cap of angle θ facing the cathode, that both DNA and ions can cross. Despite this simplification of the transport problem no analytical solution to this problem exists, however on purely dimensional grounds (assuming the limit of zero membrane thickness), we can write

$$\phi = E_0 R^2 f(a/R) , \quad (9)$$

where a is the pore radius such that $a = R \sin(\theta)$, and f an unknown function of the ratio a/R , or in other words a function of the permeabilized angle θ . To check this, we computed numerically ϕ for different field intensities E_0 , different vesicles radiuses R , and different angles θ , as described in the Materials and methods section. These results are presented in Fig. 3, where one can see that all the flux values superpose. These plots are in fact plots of the function $f(a/R) = f(\theta)$, and show that Eq. 9 is valid. For a

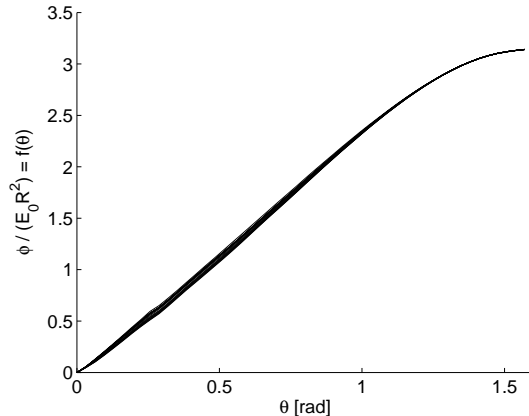


Figure 3: Flux ϕ of the electric field across a permeabilized spherical cap of angle θ . Flux values were computed numerically for different vesicle radiuses R ranging from 5 to 50 μm , and various electric field amplitudes E_0 ranging from 10 to 500 kV/m. Internal and external conductivities σ_i and σ_e conductivities were both equal to 400 $\mu\text{S/cm}$. Slight deviations occur for curves corresponding to the different radiuses, and are due to the different meshes used. All curves for the different field amplitudes exactly superpose.

small angle θ , we can make the linear approximation that $f(\theta) \approx f'(0)\theta$, where $f'(0)$ is the slope of the straight line giving $f(\theta)$. We finally obtain for the relative concentration increments

$$\delta x = \frac{3|\mu|E_0\tau}{4\pi R} f'(0)\theta . \quad (10)$$

We checked the approximation $f(\theta) \approx f'(0)\theta$ by fitting straight lines to the numerically computed $f(\theta)$. As shows Fig. 4, the fits are in very good agreement with numerical data. The different plots correspond to different internal to external conductivity ratios σ_i/σ_e , as indicated in the legend. One can see that the slopes $f'(0)$ depend on these conductivity ratios, and increase for increasing ratios. This makes sense, as one would not expect any flux of the electric field for a perfectly non conductive object. This is also interesting because it gives another reason why the relative DNA concentration increments seem to increase during one experiment. This is because the

solution inside the GUV being initially less conductive than the external medium, the electropermeabilization leads to the mixing of the internal and external solutions, and thus to an increase of σ_i towards σ_e . This increase of the conductivity ratio causes in turn an increase of the flux ϕ , and hence an increase of δx . One can also see on Fig. 4 that for conductivity ratio values between 1 and 10 corresponding to our experiments, the flux factor $f'(0)\theta$ should be, for moderate angles, on the order of 0.1–0.5. Its value should of course be varying from one data point to another, mostly because of the difference between the permeabilized areas, but our analysis nevertheless states that if our assumptions are valid, the values of $f'(0)\theta = 4\pi R\delta x/(3|\mu|E_0\tau)$ obtained with our experimental data should be distributed around 0.1–0.5. We have gathered in Fig. 5 all our experimental values of $f'(0)\theta$, using the value of μ given above. This histogram contains more than 300 individual data points, corresponding to various vesicle sizes R , field amplitudes E_0 , and pulse durations τ . The narrow shape of the distribution around the expected values thus supports our hypothesis that DNA entry in the GUVs mostly happens via electrophoretic effects.

Discussion

The qualitative observations and the quantitative agreement of our theory with our experimental results support an uptake mechanism via pores as described in (12), and mainly driven by electrophoretic effects. However there are some differences between our system and protocol and those used by Chernomordik et al. (11) which should be highlighted. For example, in (11) just one pulse was applied whereas we used a train of at least ten pulses. As can be seen in the top left panel of Fig. 2, the amount of DNA transferred after a single pulse could sometimes be very small. We could infer that in fact no DNA penetrated the vesicle during the pulse and that the endocytosis-like mechanism, as we observed in some rare cases, occurred after the electrical treatment. The intensities of the field applied in (11) induced transmembrane voltages of the order of at most 450 mV whereas ours and those from Lurquin and Athana-

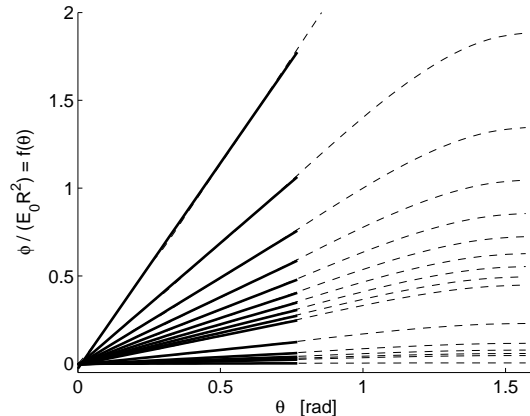
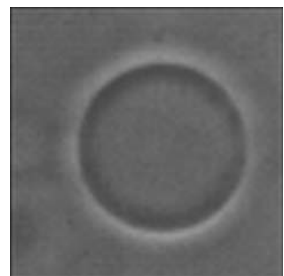


Figure 4: Flux ϕ of the electric field across a permeabilized spherical cap of angle θ . Flux values (dashed lines) were computed numerically for different internal conductivities σ_i of values $\sigma_e, \sigma_e/2, \sigma_e/3 \dots \sigma_e/10, \sigma_e/20, \sigma_e/40 \dots \sigma_e/100$ and $\sigma_e/1000$ (from top curve to bottom curve). Vesicle radius R was $10 \mu\text{m}$, field amplitude E_0 was 60 kV/m , and external conductivity σ_e was $400 \mu\text{S/cm}$. Thick full lines are linear fits to numerical data. These fits show that the linear approximation on $f(\theta)$ made to obtain Eq. 10 is valid, and that for reasonable angles of the permeabilized area θ and for internal and external conductivities of the same order, $f'(0)\theta$ is of the order of 0.1–0.5.

siou caused initial potential drops of more than 1 V. This could be an explanation for the reason why so little DNA had been taken up by the liposomes in the experiments of (11). Another origin for the difference of the reported behaviours could lie in the nature of the systems themselves. Liposomes used in (11) were much smaller (SUVs of $\approx 500 \text{ nm}$ diameter) and contained 70 % DPPC and 30 % cholesterol, whereas DPPC GUVs of (12), as ours made of EggPC, did not contain cholesterol.

The agreement of our experimental results with our model for DNA uptake corroborates our quantitative observations. Even if we can not accurately monitor the size, shape, number and nature of the membrane defects allowing DNA entrance, we have seen that an entrance via one or several macropores of a few μm diameter appears to be a reasonable as-



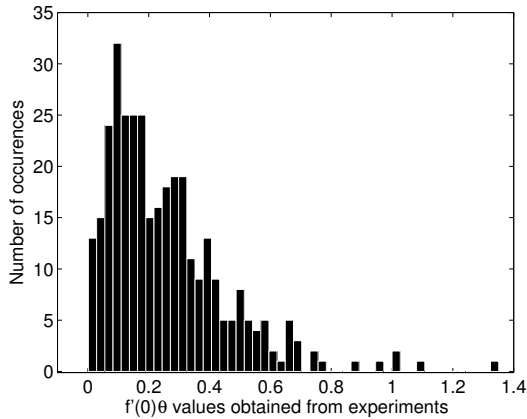


Figure 5: Histogram of the values of the flux factor $f'(0)\theta$ obtained from experiments. Due to fluctuations in measurements and relatively low concentration increments at the beginning of the pulse sequence, 20 out of 360 experimental δx values were negative and thus lead to negative $f'(0)\theta$. Those values were removed from this histogram.

sumption. Furthermore, as was observed in biological cells (20, 21), DNA uptake by the GUVs indeed appears to be mostly caused the electrophoretic force resulting from the electric field application. The effect of the electric pulses is thus double: they both permeabilize the lipid bilayer, and push the charged compounds inside the liposome, making the electrotransfer of highly negatively charged macromolecules very efficient. As observed in (14) the application of electropulses also leads to a reduction in the size of the vesicles. This reduction in size and increase in internal DNA concentration eventually stops when the vesicles have a size such that the permeabilisation threshold is no longer exceeded. Our estimation of the critical membrane permeabilization potential $\Delta\psi_c$ necessary to induced permeabilization turns out to be smaller than that estimated for the same vesicle system in the absence of DNA. This suggests the possibility that negatively charged macromolecules may help to induce the permeabilization process via some interaction with the membrane. It is possible that DNA may flow into the defects that eventually lead to macropores and prevent their closing. The pres-

ence of DNA in blocked defects could be related to the endocytosis based electrotransfer mechanism seen in (11).

Another experimental finding of great importance is the following. As can be seen on the bottom right panel of Fig. 2, we could sometimes reach DNA concentrations inside the vesicle greater than the concentration outside ($c/c_0 = I/I_0 > 1$). This shows that DNA can not cross the membrane on the cathode facing pole, and means that the permeant structures reported to be created on this side (9, 22) had sizes on the order of a few nm at most. It also means that the pore created on the other side closed relatively fast after the end of the pulse, otherwise the inner concentration would always have time to equilibrate with the outer one. Indeed, it had been reported that electropores induced by DC pulses in GUVs resealed within some tens of ms (8), fast enough to prevent significant DNA concentration changes due to diffusion. The presence on the anode facing pole of the membrane tubules reported previously in (14) and that are also observed with EggPC vesicles (see Fig. 1) could presumably also prevent the DNA from leaving the vesicle from that pole. An interesting corollary of these results would be that electromediated loading of vesicles with positively charged macromolecules should be much less efficient than that observed here. This is because positively charged macromolecules would be forced away from the side of the vesicles containing the macropores.

Studies of electropulsed CHO cells (7) in the presence of DNA have shown that transfection is induced via gene expression. However in these cells the interaction with the membrane appears to be more complex than that discovered here. In (7) the initial interaction between DNA and the cell membrane leads to the formation of spots on the cell surface, again facing the cathode, where DNA aggregates are formed. The fact that this form of spot formation is not seen in GUVs has many possible explanations. For DNA and cells it is possible that there is a physical or chemical interaction which tends to trap DNA near the surface or it could be that the reduced mobility of DNA in the cell interior causes a traffic jam like phenomenon where the DNA is locally blocked. It is worth mentioning that the asymmetric trans-

port phenomena discussed here also occurs in real cells (22). The asymmetric transport pattern found by the authors lead them to suggest that pores were created on both sides of the membrane, but with a larger size (and also lower number) on the cathode-facing hemisphere.

Besides clarifying the mechanism of DNA uptake by vesicles, our work demonstrates the efficiency of a transfer method alternative to the one reported in (23). These results should be relevant to encapsulation of plasmid DNA into giant liposomes, for the purpose of gene transfection for example. A simple rule of thumb for choosing the electric field parameters for a loading protocol would be: use a pulse duration of $\tau = 5$ ms, tune the field amplitude E_0 according to the vesicle initial size R_0 in order to obtain induced transmembrane voltages $\Delta\psi_0 = (3/2)R_0E_0 \sim 1$ V, and then apply a sequence of pulses at 0.33 Hz repetition frequency until the required DNA concentration inside the vesicle is attained. This loading technique is also applicable to other negatively charged macromolecules, and an equivalent efficiency ($c/c_0 > 1$) could be attained provided the molecules are big enough to be unable to cross the membrane at the anode-facing side. The negative charge is crucial in order to reach the vesicle from the cathode facing side, and the higher the charge (and thus the electrophoretic mobility), the higher the electrotransferred amount, as can be understood from the equation Eq. 10 stating that the quantities uptaken per pulse are directly proportional to the net electric charge.

In this paper we have shown that the predominant pathway of electromediated DNA uptake into liposomes is undoubtedly the electrophoretic entrance in free form via macropores created on the cathode-facing pole of the vesicles. This spectacular symmetry breaking, first observed in (9), is what makes electromediated DNA uptake by vesicles so efficient. Indeed, in some of our experiments, we can reach DNA concentrations inside the vesicles higher than external concentrations. This would not have been possible if macropores also opened on the anode-facing hemisphere (as DNA would flow out through these pores), and clearly shows that even if the vesicle is permeabilized to small compounds at the anode side,

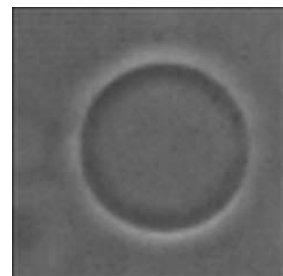
sufficiently large molecules cannot cross the membrane in this region. From this we can infer that the permeant structures created opposite the positive electrode have sizes of the order of a few nanometers at most. The underlying origin of these striking differences of the membrane reorganization at the molecular level are not yet understood, the explanation of this asymmetry represents an exciting and potentially useful direction for further research.

Acknowledgements

This work was partially supported by the CNRS consortium Celltiss and the Institut Universitaire de France. We wish to thank Luc Wasungu for his help with DNA production and also Émile Phez for her participation in the inception of this work.

References

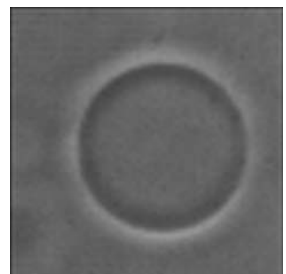
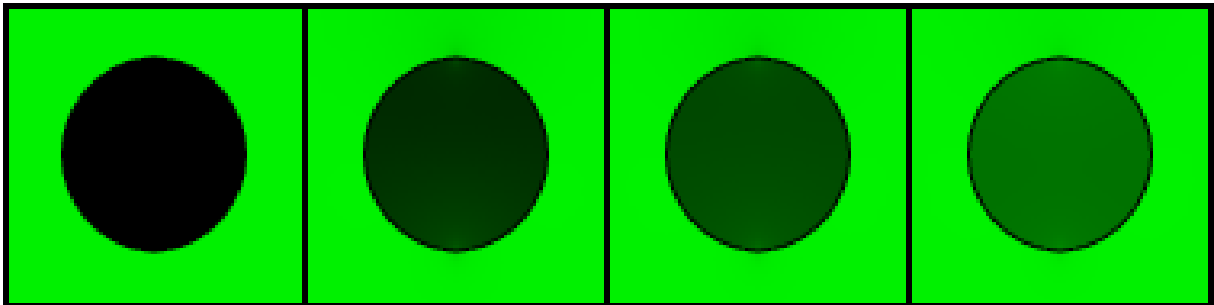
1. Mouritsen, O. G., 2005. Life - As a matter of fat. Springer, The Frontiers Collection.
2. Neumann, E., and K. Rosenheck, 1972. Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *J. Membr. Biol.* 10:279–90.
3. Rols, M.-P., and J. Teissié, 1998. Electropermeabilization of mammalian cells to macromolecules: control by pulse duration. *Biophys. J.* 75:1415–1423.
4. Teissié, J., and M.-P. Rols, 1993. An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electropermeabilization. *Biophys. J.* 65:409–413.
5. Belehradek, M., C. Domenge, B. Luboinski, S. Orłowski, J. B. Jr., and L. Mir, 1993. Electrochemotherapy, a new antitumor treatment. First clinical phase I-II trial. *Cancer* 72:3694–3700.
6. Escoffre, J.-M., T. Portet, L. Wasungu, J. Teissié, D. S. Dean, and M.-P. Rols, 2009. What is (still not) known of the mechanism by which electropermeabilization mediates gene transfer and expression in cells and tissues. *Mol. Biotechnol.* 41:286–295.
7. Golzio, M., J. Teissié, and M.-P. Rols, 2002. Direct visualization at the single-cell level of electrically



- mediated gene delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:1292–7.
8. Riske, K. A., and R. Dimova, 2005. Electrodeformation and poration of giant vesicles viewed with high temporal resolution. *Biophys. J.* 88:1143–1155.
 9. Tekle, E., R. D. Astumian, W. A. Friauf, and P. B. Chock, 2001. Asymmetric pore distribution and loss of membrane lipid in electroporated DOPC vesicles. *Biophys. J.* 81:960–968.
 10. Needham, D., and R. M. Hochmuth, 1989. Electro-mechanical permeabilization of lipid vesicles - Role of membrane tension and compressibility. *Biophys. J.* 55:1001–1009.
 11. Chernomordik, L. V., A. V. Sokolov, and V. G. Budker, 1990. Electrostimulated uptake of DNA by liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1024:179–183.
 12. Lurquin, P. F., and K. Athanasiou, 2000. Electric field-mediated DNA encapsulation into large liposomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267:838–841.
 13. Angelova, M. I., and D. S. Dimitrov, 1986. Liposome electroformation. *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 81:303–311.
 14. Portet, T., F. Camps, J.-M. Escoffre, C. Favard, M.-P. Rols, and D. S. Dean, 2009. Visualization of membrane loss during the shrinkage of giant vesicles under electropulsation. *Biophys. J.* 96:4109–4121.
 15. Jackson, J. D., 1975. Classical electrodynamics. John Wiley & Sons, second edition.
 16. Pucihar, G., T. Kotnik, B. Valič, and D. Miklavčič, 2006. Numerical determination of transmembrane voltage induced on irregularly shaped cells. *Ann. Biomed. Eng.* 34:642–652.
 17. Angelova, M. I., and I. Tsoneva, 1999. Interactions of DNA with giant liposomes. *Chem. Phys. Lip.* 101:123–137.
 18. Stellwagen, N. C., C. Gelfi, and P. G. Righetti, 1997. The free solution mobility of DNA. *Biopolymers* 42:687–703.
 19. Lukacs, G. L., P. Haggie, O. Seksek, L. D., F. N., and V. A. S., 2000. Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus. *J. Biol. Chem.* 275:1625–1629.
 20. Klenchin, V., S. Sukharev, S. Serov, L. Chernomordik, and Y. Chizmadzhev, 1991. Electrically induced DNA uptake by cells is a fast process involving DNA electrophoresis. *Biophys. J.* 60:804–811.
 21. Sukharev, S., V. Klenchin, S. Serov, L. Chernomordik, and Y. Chizmadzhev, 1992. Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells. The effect of DNA interaction with electropores. *Biophys. J.* 63:1320–1327.
 22. Tekle, E., R. D. Astumian, and P. B. Chock, 1994. Selective and asymmetric molecular transport across electroporated cell membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11512–11516.
 23. Sato, Y., S. M. Nomura, and K. Yoshikawa, 2003. Enhanced uptake of giant DNA in cell-sized liposomes. *Chem. Phys. Lett.* 380:279–285.

Annexe G

Manuscrit soumis sur la modélisation de l'entrée de molécules chargées dans des cellules vivantes



Electromediated formation of DNA nano-complexes on cell membranes and their role in gene delivery

Jean-Michel Escoffre^{† a}, Thomas Portet^{† b,a}, Cyril Favard^{† c}, Justin Teissié^a,
David S. Dean^b and Marie-Pierre Rols^a.

^a*Institut de Pharmacologie et de biologie structurale, CNRS UMR 5089, Université Paul Sabatier, Toulouse, FRANCE.*

^b*Laboratoire de Physique Théorique, CNRS UMR 5152, Université Paul Sabatier, Toulouse, FRANCE.*

^c*Institut Fresnel, CNRS UMR 6133, Universités Aix Marseille, Marseille, FRANCE.*

[†] JME, TP and CF have the same contribution. Corresponding author: MPR.

Abstract

Electroporation is a physical method to induce the uptake of therapeutic drugs and DNA, by eukaryotic cells and tissues. The phenomena behind electro-mediated membrane permeabilization to plasmid DNA have been shown to be significantly more complex than those for small molecules. Small molecules cross the permeabilized membrane by diffusion whereas plasmid DNA first interacts with the electropermeabilized part of the cell surface, forming localized aggregates. The dynamics of this process is still poorly understood because direct observations have been limited to scales of the order of seconds. Here, cells are electropermeabilized in the presence of plasmid DNA and monitored with a temporal resolution of 2 ms. This allows us to show that during the first pulse application, plasmid complexes, or aggregates, start to form at distinct sites on the cell membrane. FRAP measurements show that the positions of these sites are remarkably immobile during the application of further pulses. A theoretical model is proposed to explain the appearance of distinct interaction sites, the quantitative increase in DNA and also their immobility leading to a tentative explanation for the success of electro-mediated gene delivery.

Keywords: Electroporation; DNA transfer; modeling; fluorescence microscopy.

Abbreviations: FRAP, fluorescence recovery after photobleaching; PI, Propidium Iodide; CHO, Chinese Hamster Ovary.

1. Introduction

Electropermeabilization is the phenomena by which the application of an electric field across a biological membrane renders it permeable to the passage of small and even macro molecules such as DNA [1,2]. It is exploited in the clinical context where the permeabilization of cells to a therapeutic agent is required, for example in gene therapy and chemotherapy [3,4,5]. Despite the use of electropermeabilization in medical science, many questions remain open as to the underlying biophysicochemical phenomena which underpin its success. This is especially the case for the permeabilization of membranes to DNA where a number of interesting biological, chemical and physical factors remain to be understood. Given the size of the DNA, if the permeabilization is due to pores – or conducting defects–, as suggested by the standard theory of electroporation [6,7], the pores must be relatively

Email address: rols@ipbs.fr (Marie-Pierre Rols).

large due to (i) the relatively large size of the DNA and (ii) the large charge of DNA as dielectric exclusion must be overcome [8]. The cell membrane has a much more complex organization than a model lipid bilayer. One expects that the location of regions permeabilized to DNA will be determined not only by the local electric field but also by the local membrane composition. In cell membranes, the regions most susceptible to permeabilization may be those containing certain types of transmembrane proteins or at the boundary between differing types of lipid domains [9]. Another key, physicochemical factor is how the field not only modifies the permeability of the membrane, but also how it influences the movement of the DNA by electrophoresis. Large polyelectrolytes are strongly advected by the electric field [10]. Experimental studies [11] have demonstrated that the physicochemical phenomena involved in electro-mediated membrane permeabilization to plasmid DNA are indeed significantly more complex than those for small molecules. Small molecules cross the permeabilized membrane directly mainly by post-pulse diffusion, whereas plasmid DNA first interacts with the electropermeabilized part of the cell surface resulting in the formation of localized aggregates. However the dynamics of this initial interaction is only partially understood because the direct observations of [11] were limited to time scales exceeding several seconds. In this paper, we have analyzed the interaction between the cell membrane and strongly charged macromolecules (4.7 kbp plasmid DNA) upon the application of a permeabilizing electric field, at a temporal resolution of 2 ms. This enables us to address the following unresolved, and key, questions (i) What are the phenomena leading to formation of the sites where the DNA aggregates? (ii) What is the underlying dynamics behind their formation? (iii) To what extent are the sites localized in space, and over what time scales? and (iv) What is the biochemical mechanism behind this localization? We put forward a model for the transport of charged molecules in the presence of the electric field which provides an interpretation for most of our experimental findings on DNA and whose validity is also tested via additional experiments using the, much smaller, charged molecule Propidium Iodide.

2. Materials and methods

2.1. Cells

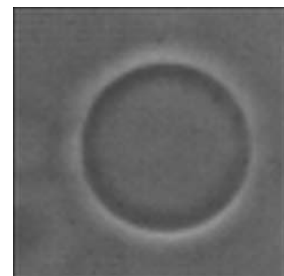
Chinese hamster ovary (CHO) cells were used. The WTT clone was selected for its ability to grow in suspension or plated on Petri dishes or on a microscope glass coverslip. Cells were grown as previously described [12]. For microscopy experiments, 10^5 cells were put on a Lab-tek chamber 12 hours before electric pulse treatment with 1 ml of culture medium.

2.2. DNA staining

A 4.7 kbp plasmid (pEGFP-C1, Clontech, Palo Alto, CA) carrying the green fluorescent protein gene controlled by the CMV promoter was stained stoichiometrically with the DNA intercalating dye TOTO-1 (or alternatively POPO-3) (Molecular Probes, Eugene, OR) [13]. The plasmid was stained with 2.3×10^{-4} M dye at a DNA concentration of $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ for 60 minutes on ice. This concentration yields an average base pair to dye ratio of 5. Even if the labeling is not covalent, the equilibrium is dramatically in favor of the linked form. Plasmids were prepared from *E. Coli* transfected bacteria by using Maxiprep DNA purification system (Qiagen, Chatsworth, CA).

2.3. Electroporation apparatus.

Electroporation was carried out with a CNRS cell electropulsator (Jouan, St Herblain, France) which delivers square-wave electric pulses. An oscilloscope (Enertec, St. Etienne, France) was used to monitor the pulse shape. The electroporation chamber was built using two stainless-steel parallel rods (diameter 0.5 mm, length 10 mm, inter-electrode distance 5 mm) placed on a Lab-tek chamber. The electrodes were connected to the voltage generator. A uniform electric field was generated. The chamber was placed on the stage of an inverted digitized videomicroscope (Leica DMIRB, Wetzlar, Germany) or a confocal microscope (Zeiss, LSM 5 life, Germany).



2.4. Electroporation

Permeabilization of cells was performed by application of long electric pulses required to transfer genes and to load macromolecules into cells. Cell viability was preserved when using long pulse duration by decreasing the electric field intensity [14,15]. Penetration of PI (100 μ M in a low ionic strength pulsing buffer: 10 mM phosphate, 1 mM MgCl₂, 250 mM sucrose, pH 7.4) was used to monitor permeabilization. 10 pulses of 20 ms duration and 0.5 kV/cm amplitude were applied at a frequency of 1 Hz at room temperature. For plated cells, the culture medium was removed and replaced by the same buffer described above.

2.5. Microscopy

Cells were observed with a Leica 100 \times , 1.3 numerical aperture oil immersion objective. Images (and optical sections) were recorded with the CELLscan System from Scanalytics (Billerica, MA) fitted with a cooled CCD camera (Princeton Instrument, Trenton, NJ). This digitizing set up allowed a quantitative localized analysis of the fluorescence emission as described previously [11]. This was done along the cell membrane. Images were taken at a 1 Hz frequency. For fast kinetics studies, a Zeiss LSM 5 Live confocal microscope was used. All measurements were performed at room temperature. Image sequences were acquired at a frequency of 500 fps.

2.6. FRAP experiments

FRAP experiments were performed on a Zeiss LSM 510 confocal microscope. The 488 nm line of the Ar⁺ laser was used for excitation of TOTO-1. We used a sequential mode of acquisition with a 63 \times , 1.4 numerical aperture water immersion lens. After 50 pre-bleach scans, a region of interest (ROI) with a radius $w = 1\mu$ m was bleached, and fluorescence recovery was sampled on 150 scans, *i.e.* 40 s [16].

2.7. Actin cytoskeleton destabilization

To examine the role of actin in the phenomenon of DNA membrane interaction, cells were incubated at 37 $^{\circ}$ C for 1 hour with 1 μ M Latrunculin A (Sigma) in culture medium. This protocol is known to efficiently disrupt the actin cytoskeleton [17].

3. Experimental results

3.1. Electroporation experiments

To study membrane permeabilization by electric fields, and the associated processes of molecular uptake, we used PI and fluorescent plasmid DNA. Membrane permeabilization was induced by applying 20 ms electric pulses of intensity 0.5 kV/cm. This protocol is known to induce both membrane permeabilization and DNA transfer, accompanied by an associated gene expression [11]. Membrane permeabilization was observed at the single cell level at a rate of 500 frames per second. This image acquisition frequency made it possible to monitor the entire process of molecular uptake, both during and after pulse application, with a good spatial resolution using confocal microscopy. Particular attention was paid to the molecular uptake occurring after a single permeabilizing pulse and a series of 10 pulses.

3.2. Electroporation experiments with PI

As shown in Figs. 1A and 1C, and in agreement with previous studies [11], membrane permeabilization, as detected by the uptake of PI, was observed at sites of the cell membrane facing the two electrodes. The influx into the cells of PI, deduced from the associated fluorescence intensity, suggests free transport across the permeabilized regions of the membrane into the cytoplasm (no trapping in the region near the membrane is observed). The uptake of PI into cells started at the moment the pulse was applied and the concentration of PI in the cell increased for up

to a minute (Fig. 1E), showing that the permeabilized membrane state, due to defect regions such as metastable pores, persists for some time after the field is cut. Indeed, the majority of molecules which were taken up entered the cell after the pulses. Analyzing the molecular uptake image by image led to the observation that PI uptake was both asymmetric and delayed: it was higher at the anode facing side of the cell and its entrance at the cathode facing side occurred after a 4-5 second delay. This asymmetry can be explained by the fact that PI has a charge $+2e$ in solution and thus the electrophoretic force drives it toward the cathode. The post-pulse diffusion of PI into the cytoplasm of the permeabilized cell can be seen in Movie 1 (published in supporting information).

3.3. Electropulsation experiments with DNA

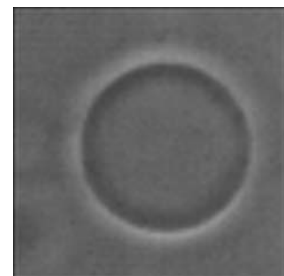
Electro-induced uptake by cells in presence of plasmid DNA showed results that differed considerably from those for cells pulsed in presence of PI. DNA was only observed to interact with the membrane for electric fields greater than a critical value (0.25 kV/cm) which induces their permeabilization, i.e. leading to PI uptake. In the low field regime DNA simply flowed around the cells towards the anode. For permeabilizing fields, plasmid DNA was not observed to enter the cell during pulse application or during the minute that followed. However, DNA was seen to accumulate at distinct sites on the cathode facing side of the permeabilized cell membrane (Fig. 1D). At these sites the DNA appeared to form aggregates, which became visible as soon as the electric pulse was triggered (Fig. 2A, 2B). Intriguingly, the number and apparent size of these sites did not increase with the number of pulses applied. During the application of a single pulse, the fluorescence of the sites increased linearly in time showing that the quantity of DNA at each site increased linearly (Fig. 1F), but no such fluorescence increase was observed in the absence of the electric field. Therefore the accumulation of DNA at the interaction sites must be principally due to electrophoresis.

The presence of stable sites, where membrane plasmid DNA interaction occurred, was observed across the entire cell population (Fig. 1D) (see Movie 2 in supporting information). The average distance between a site and its nearest neighbor was found to be about $1 \mu\text{m}$. The diameter of the individual sites was found to be in the range of 300-600 nm (lower range limit due to optical diffraction). As shown in Fig. 2C, the total amount of DNA in the membrane region also increased linearly with the number of electric pulses. The final average amount of DNA localized in the membrane region correlated with the amount of DNA reaching the nucleus, as estimated by the rate of GFP expression, between 2 and 24 hours after pulse application (see supplementary information).

As shown in Figs. 1E and 1F, part of the DNA interacting with the membrane was observed to be desorbed after the pulses but a large proportion stayed fixed, this could be due to an interaction between the membrane and DNA but also because the DNA forced into the pore electrophoretically is virtually immobile in the cell in the absence of the electric field. This last observation shows that the observed DNA membrane interaction could be, at least partially, due to (i) electrophoretic accumulation along with (ii) reduced mobility of the DNA in the pore region within the cell.

We also studied the mobility of the DNA complexes at the interaction sites. In order to measure the in-membrane or lateral diffusion constant of the complexes, we carried out Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) experiments. The FRAP results showed that no exchange between DNA aggregates or with the bulk DNA took place and that the DNA was, on experimental time scales, totally immobile, its lateral diffusion coefficient being less than $10^{-16} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$. This could be explained by the reduced mobility of individual DNA molecules within the cell or because DNA forms micro sized aggregates which are immobile due to their large size. It is unlikely that this immobility is due to an intrinsic immobility of pores, as the measured diffusion constant is orders of magnitude smaller than the typical values reported in the literature for transmembrane objects, such as proteins.

One could argue that actin polymerization around inserted DNA may be responsible for its immobilization at the membrane level as well as in its subsequent traffic inside the cytoplasm. However, actin cytoskeleton perturbation with Latrunculin A did not seem to modify the features of DNA spot creation, their stability or immobility (see supplementary information). This implies that, despite the fact that actin causes a drastic decrease in the mobility of individual large DNA molecules inside cells, the initial formation of DNA spots and their immobility is not caused by the actin network.



4. Theoretical analysis

4.1. Theoretical model

In order to better understand the features of the electro-mediated DNA uptake, we developed a theoretical model that we used to carry out numerical simulations. We assumed that the cell membrane was an infinitesimally thin non-conducting surface. This approximation is valid where the membrane thickness is small compared to all other length scales and the conductivities of the cell interior σ_i and exterior electropulsation solution σ_e are much greater than the conductivity σ_m of the cell membrane. An electric field of magnitude $|\mathbf{E}_0| = E_0$ is applied in the z direction, perpendicular to the electrodes, and the local electric potential ϕ is given, in the steady state regime, by the solution to Laplace's equation [18]

$$\nabla \cdot \sigma \nabla \phi = 0, \quad (1)$$

with the boundary conditions $\phi = -E_0 z$ as $|z| \rightarrow \infty$. In what follows we will assume that the DNA is advected by the field given by the solution of Laplace's equation (1) and will neglect additional fields that would be caused by local accumulation of charge due to the DNA. This is because the applied fields are relatively large and because we expect the DNA to be strongly screened. Once the electric field has been computed the DNA is advected by the field but also diffuses. The local concentration of DNA $c(\mathbf{x}, t)$ obeys the electrodiffusion equation

$$\frac{\partial c}{\partial t} = -\nabla \cdot \mathbf{j} \quad (2)$$

where \mathbf{j} is the thermodynamic current $\mathbf{j} = -D\nabla c + \mu c \mathbf{E}$, with D the local diffusion constant of the DNA, which depends on its environment, and is denoted by D_e outside the cell, D_m in the membrane and D_i in the cell interior. The term μ is the electrophoretic mobility and is defined via the velocity \mathbf{v} of the molecule in a (locally) uniform field $\mathbf{E} = -\nabla \phi$ as

$$\mathbf{v} = \mu \mathbf{E}. \quad (3)$$

As for the diffusion constant, the value of μ will also depend on the local environment as it depends on electrolyte concentration and viscosity. As the electrode system is in contact with a bath of the transported molecule we impose the boundary conditions $\nabla c = 0$ as $c \rightarrow \infty$ on equation (2) (note that this is compatible with the Ohmic behavior $\mathbf{j} = \mu c \mathbf{E}$ far from the cell). We assume that D_m and $\mu_m = 0$, which means that DNA cannot move into intact regions of membrane.

4.2. Modeling pores

We will assume that when the field is applied, the membrane becomes permeabilized and micro sized pores are formed. For the ease of computation we will investigate what happens when a circular pore is formed at each face of the cell facing the electrodes, that facing the anode in the angular region $\theta \in [0, \theta_p]$ and that facing the cathode in the region $\theta \in [\pi - \theta_p, \pi]$. In this region we assume that the conductivity is σ_i and that the diffusion constant is D_i , effectively we have taken away the membrane from these regions and replace it by the cellular interior. We numerically compute the evolution of the concentration of marker molecules as a function of time using the experimental applied field protocols (we assume that the membrane charging process is much quicker than any of the diffusion processes and thus change the electric field instantaneously).

Estimation of theoretical parameters. We were able to follow the fluorescence of the DNA in the buffer solution in a uniform electric field and thus measure its velocity. Using equation (3), we estimated the electrophoretic mobility in solution to be $\mu_e = 10^{-8} m^2 V^{-1} s^{-1}$. This agrees with more precise measurements reported in the literature [19]. The diffusion constant of DNA in aqueous solution is estimated from the literature to be $D_e = 10^{-12} m^2 s^{-1}$ [20].

The charge of the PI is taken to be $q = +2e$ and its diffusion constant in aqueous solution is estimated to be $D_e = 10^{-10} m^2 s^{-1}$ (by estimating its effective radius and using the Stokes formula for the diffusion constant of a solid sphere). The electrophoretic mobility for PI is estimated via the Stokes Einstein relation $\mu = \frac{qD}{k_B T}$ where k_B is Boltzmann's constant and T is the temperature.

In the cell interior we estimate that for PI the effective diffusion constants and electrophoretic mobilities are smaller than their external values by a factor of 10 but for the larger DNA molecules they are smaller by a factor of 1 000 (in fact this factor is a lower bound) due largely to the interaction between the DNA and the actin network of the cell interior [20,21]. Finally we took the radius of the spherical vesicle to be $R = 8 \mu m$ as estimated from the average cell size.

4.3. Theoretical results and comparison with experiments

We assume that the marker fluorescence is proportional to the concentration $c(\mathbf{x}, t)$. For the comparison with the experiments we took a pore angle $\theta_p = 3.6^\circ$ as estimated by the size of the DNA/membrane interaction sites we observed. We computed the average fluorescence intensity inside the cell using $I_{cell} \propto c_{cell}$. In Figs. 1G and 1H we show the predicted behavior for PI fluorescence for one pulse with applied field 0.5 kV cm^{-1} applied for 20 ms and see that it compares very well with that measured experimentally (Fig. 1 E). Similarly we see in the same figures the comparison between theory and experiment is also good for DNA (with the same pulse protocol), with the exception that the slight decrease in DNA fluorescence after the pulse has been applied is less pronounced in the theoretical curve of Fig. 1F. However some of the experimentally observed decrease may be due to photo bleaching of the fluorescent marker. Note that although we have only simulated one pore, if we assume that the pores behave independently (as conduction channels in parallel) the overall form of the increase in fluorescence for several pores should be approximately of the same form, up to an overall change in the fluorescence levels, as that for single pore.

In the case of PI, our model also reproduced the other qualitative behavior seen in the experiments. Numerical calculations showed that the PI enters through the anode facing side of the vesicle during the pulse application and that its entry into the cathode facing side is delayed, as expected from the physical arguments given in the Results section.

For DNA, computations showed that just after the field application there is virtually no uptake of DNA at the anode facing side of the cell, but that at the cathode facing side there is an accumulation of DNA near the surface of the cell in the region where the pore is. In our model the DNA accumulation, apparently, at the surface of the cell, is due to the strong (as compared to the case of PI) electrophoretic force which pushes the DNA into the hole opposite the cathode and then the much reduced mobility of the DNA in this region. For DNA most of the contribution to the total cell fluorescence comes from the region close to the membrane surface, thus justifying our comparison of Figs. 1E, 1F with Figs. 1G, 1H.

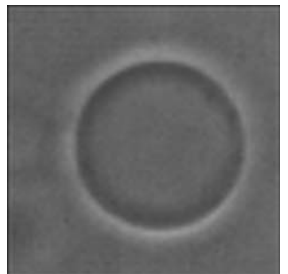
4.4. Constant number of interaction sites

The experimental results show that after the first interaction sites become visible, no further sites appear during subsequent pulsation. An explanation for this is that the pores formed are conducting and thus the electric field across the membrane is lowered in the non-conducting regions of the membrane. A simple criterion for determining whether a membrane can be locally permeabilized is if the stress caused by the electric field causes the local surface tension to exceed the lysis tension of the membrane. In a simple electric model for the membrane this turns out to be equivalent to the local transmembrane voltage $\Delta\phi$ exceeding a critical value $\Delta\phi_c$, which has values typically between $250 - 1000 \text{ mV}$ [22,23]. To see how the presence of a pore reduces the transmembrane potential elsewhere we consider the simplified case of an infinitesimally thin, non-conducting, infinite flat membrane with a conducting pore of radius a . The potential drop across the membrane at a distance r from the center of the pore is [24] $\Delta\phi(r) = \frac{2\Delta\phi_o}{\pi} \arctan\left(\frac{\sqrt{r^2 - a^2}}{a}\right)$, where $\Delta\phi_o$ is the potential drop far from the pore (or in the absence of the pore) and we assume that $\Delta\phi_o > \Delta\phi_c$. If pores can only be formed in regions where $\Delta\phi > \Delta\phi_c$ one sees that this critical potential drop cannot be exceeded within a radius $r_c = \frac{a}{\cos\left(\frac{\pi\Delta\phi_c}{2\Delta\phi_o}\right)}$ from the center of the pore.

Although a very approximate estimate, this shows that we should expect pores to be separated from each other by a distance of the order of the pore size. This is indeed the case as can be seen in Fig. 2B, where the fluorescence peaks widths are of the same order as the inter-peak distance.

5. Discussion

Despite the complexity of the system studied here, a number of our experimental observations can be explained qualitatively and to an extent quantitatively on a largely physical basis. According to the standard theory of electropermeabilization, the effect of the electric field is to render the cell membrane permeable to external molecules via the formation of micro sized pores. Another effect of the electric field on the DNA is an electrophoretic one, DNA is pushed toward the cathode facing side of the cell and, as our numerical calculations have shown, if a sufficiently large pore is present the DNA can be forced through it. However once the DNA is inside the cell it



stays, on experimental time scales, very close to the surface either due to the reduced electrophoretic mobility and diffusion constant of individual DNA molecules caused by the actin cytoskeleton or because it forms aggregates which are immobile due to their large size. The number of DNA interactions sites remains constant even on increasing the number of pulses, we have argued that this is because these sites are conducting, the electric field elsewhere in the cell membrane is reduced by the presence of these conducting sites and thus does not exceed the threshold value necessary to form additional permeabilized regions and thus interaction sites.

Results on cells where the actin cytoskeleton is disrupted also show spot formation and so we conclude that the principal mechanism for spot formation is the formation of aggregates where the DNA molecules are bound together and thus diffuse as a macroscopic object with a very small diffusion constant. A possible mechanism for this aggregation is the presence of multivalent cations induced by the high concentration of DNA in the pore region [25].

To conclude we have been able to provide a detailed explanation of why gene therapy using electropulsation is successful. In principle micro sized aggregates of DNA or vesicles filled with DNA could be too large to pass through the pores formed by electroporation. However individual DNA molecules, while they can pass through electropores, have a limited mobility within the cell and may well be totally degraded before reaching the nucleus. It is possible and worth investigating the possibility that the actin cytoskeleton reacts to the presence of DNA aggregates and plays an important role in the subsequent intracellular transport. It seems reasonable that only aggregates beyond a certain size (a few hundred nano-meters) can induce a biological cellular response and can be transported by the cell. In addition, the fact that the DNA is in aggregate form means that the DNA in the center of the aggregate is relatively protected from degradation. Therefore, for gene therapy purposes, it is optimal for DNA to enter the cell as single molecules, but the subsequent transport toward the nucleus is, for biological (possibly by inducing a response of the actin cytoskeleton) and physical (diminishing enzymatic degradation) reasons, optimized if the DNA is in a micro-sized aggregate form. We thus see that a rather beautiful and subtle, and to an extent fortuitous, combination of biological, chemical and physical factors may underpin the success of gene therapy via electropulsation. As our understanding of these underlying phenomena advances we should be able to refine and optimize the protocols used in electro-mediated gene therapies.

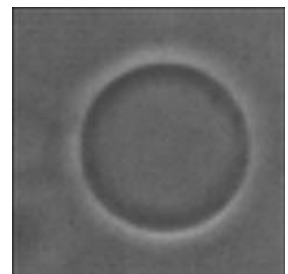
6. Acknowledgements

Our group belongs to the CNRS consortium Celltiss. This work has benefitted from the financial support of the Association Française contre les Myopathies, the Region Midi-Pyrenees and the Institut Universitaire de France. We wish to thank Gabor Forgacs for useful discussions on this work.

References

- [1] Neumann E, Sowers AE, Jordan CA (1989) *Electroporation and electrofusion in cell biology* (Plenum, New York).
- [2] Weaver JC (1995) Electroporation theory. Concepts and mechanisms. *Methods Mol. Biol.* 55:3–28.
- [3] Belehradec M, Domenge C, Luboinski B, Orłowski S, Belehradec J, Mir L (1993) Electrochemotherapy, a new antitumor treatment. First clinical phase I-II trial. *Cancer* 72:3694–3700.
- [4] Daud AI, DeConti RC, Andrews S, Urbas P, Riker AI, Sondack VK, Munster PN, Sullivan DM, Ugen KE, Messina IJ Heller R (2008) Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 26:5896–5903.
- [5] Rols MP (2006) Electropermeabilization, a physical method for the delivery of therapeutic molecules into cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1758:423–428.
- [6] Pastushenko VF., Chizmadzhev YA Arekelyan VB (1979) Electric breakdown of bilayer membranes II. Calculation of the membrane lifetime in the steady-state diffusion approximation. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 6:53-62.
- [7] Powell KT, Weaver JC (1986) Transient aqueous pores in bilayer membranes: a statistical theory. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 15 : 211-227.
- [8] Parsegian VA (1969) Energy of an ion crossing of a low dielectric membrane: Solutions to four relevant electrostatic problems. *Nature* 221:844–846.
- [9] Antonov VF, Petrov W, Molnar AA, Predvoditelev DA, Ivanov AS (1980) Appearance of single-ion channels in unmodified lipid bilayer-membranes at the phase transition temperature. *Nature* 283:585–586.

- [10] Gabriel B, Teissié J (1999) Time courses of mammalian cell electropermeabilization observed by millisecond imaging of membrane property changes during the pulse. *Biophys. J.* 76:2158–2165.
- [11] Golzio M, Teissie J, Rols MP (2002) Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 99:1292–1297.
- [12] Rols MP, Coulet D, Teissié J (1992) Highly efficient transfection of mammalian cells by electric field pulses. Application to large volumes of cell culture by using a flow system. *Eur. J. Biochem.* 206:115–121.
- [13] Rye HS, Yue S, Wemmer DE, Quesada MA, Haugland RP, Mathies RA, Glazer AN (1992) Stable fluorescent complexes of double-stranded DNA with bis-intercalating asymmetric cyanine dyes: properties and applications. *Nucleic Acids Res.* 20:2803–2812.
- [14] Wolf H, Rols MP, Boldt E, Neumann E, Teissié J (1994) Control by pulse parameters of electric field-mediated gene transfer in mammalian cells. *Biophys. J.* 66:524–531.
- [15] Golzio M, Mora MP, Raynaud C, Delteil C, Teissié J, Rols MP (1998) Control by osmotic pressure of voltage-induced permeabilization and gene transfer in mammalian cells. *Biophys. J.* 74:3015–3022.
- [16] Causeret M, Taulet N, Comunale F, Favard C, Gauthier-Rouviere C (2005) N-cadherin association with lipid rafts regulates its dynamic assembly at cell-cell junctions in C2C12 myoblasts. *Mol. Biol. Cell.* 16:2168–2180.
- [17] Sun M., Northup N, Marga F, Huber T, Byfield FJ, Levitan I, Forgacs G (2007) The effect of cellular cholesterol on membrane-cytoskeleton adhesion. *J. Cell Sci.* 120:2223–2231.
- [18] Landau LD, Lifshitz EM (1975) *Electrodynamics of Continuous Media* (Pergamon Press, Oxford).
- [19] Stellwagen NC, Gelfi C, Righetti PG (1997) The free solution mobility of DNA. *Biopolymers* 42:687–703.
- [20] Lukacs GL, Haggie P, Seksek O, Lechardeur D, Freedman N, Verkman AS (2000) Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus. *J. Biol. Chem.* 275:1625–1629.
- [21] Dauty E, Verkman AS (2005) Actin cytoskeleton as the principal determinant of size-dependent DNA mobility in cytoplasm. *J. Biol. Chem.* 280:7823–7828.
- [22] Teissié J and Rols MP (1993) An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electropermeabilization. *Biophys. J.* 65:409–413.
- [23] Portet T, Camps Febrer F, Escoffre JM, Favard C, Rols MP, Dean DS (2009), Visualization of membrane loss during the shrinkage of giant vesicles under electropulsation. *Biophys. J.* 96:4109–4121.
- [24] Winterhalter M Helfrich W (1987) Effect of voltage on pores in membranes. *Phys. Rev. A* 36:5874–5876.
- [25] Bloomfield VA, Crothers DM, Tinoco I (1999) *Nucleic acids: structures, properties and functions* (University Science Books, Sausalito).



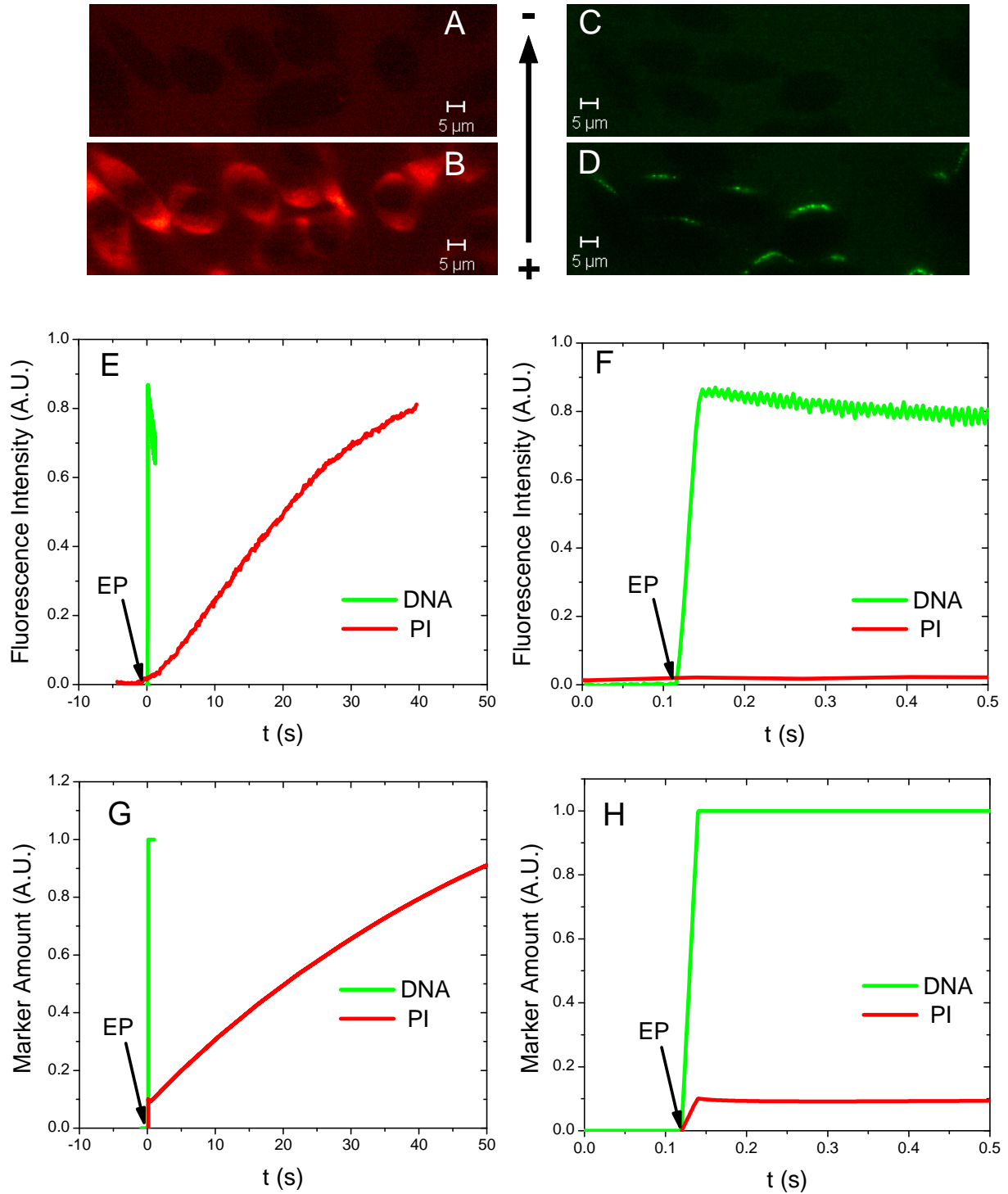


Figure 1. Results and theoretical predictions of uptake of PI and DNA by electropulsed cells. 1A and 1B: cells in the presence of PI and DNA before electropulsation, there is clearly no uptake of either marker. 1C: uptake of PI by cells after being electropulsed. 1D: interaction of DNA and cells after being electropulsed. 1E: long time behavior of PI (red) and DNA (green) uptake measured from the corresponding fluorescence. 1F: same data shown over a shorter time scale. 1G: long term uptake of PI and DNA as predicted by the electrodiffusion model. 1H: corresponding behavior over shorter time scale.

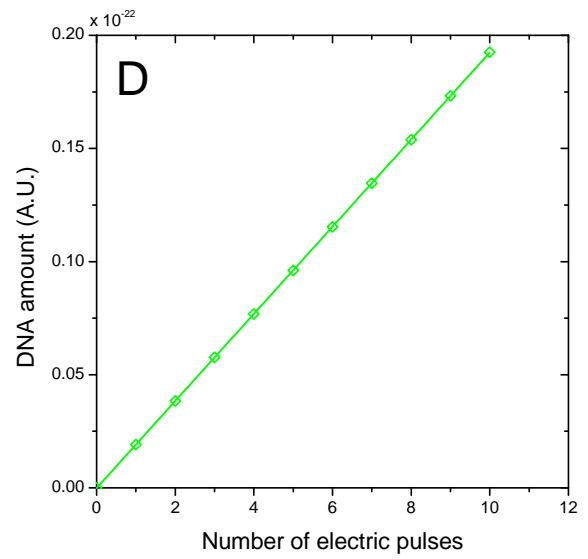
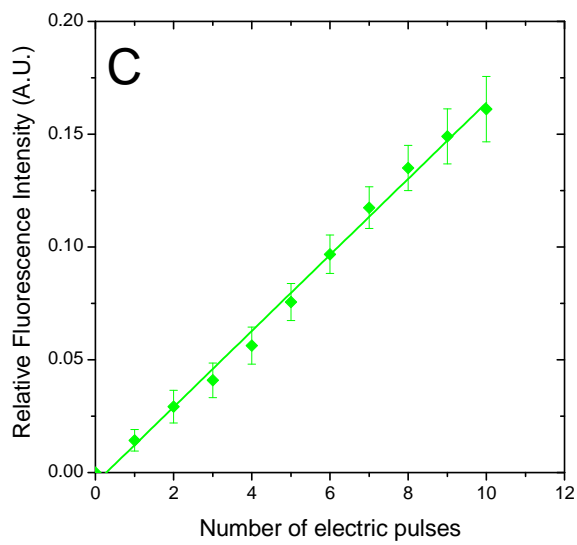
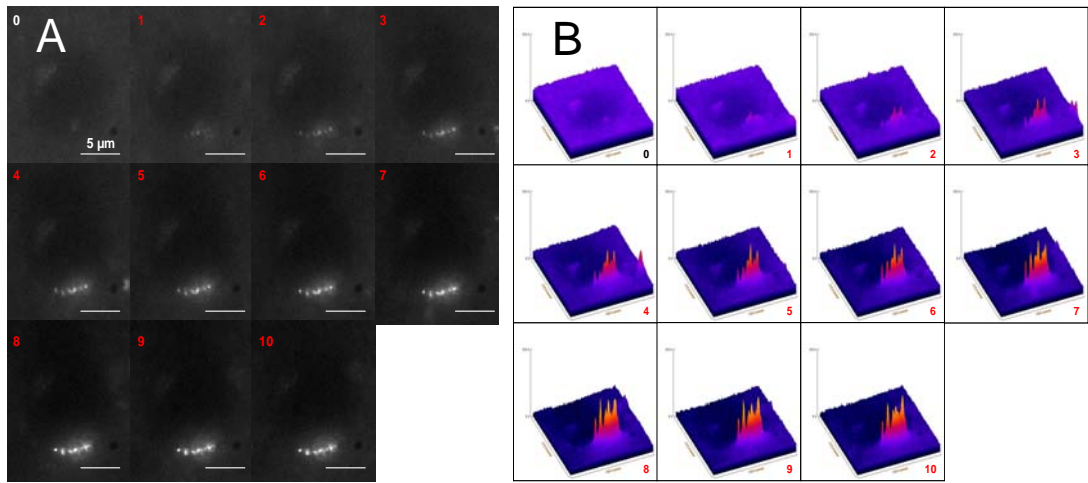
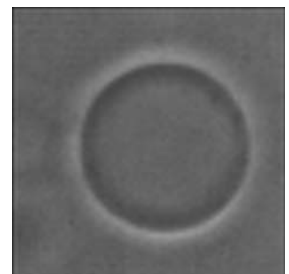


Figure 2. Evolution of DNA fluorescence at interaction sites as a function of the number of electropulses. 2A: raw imaging data. 2B: quantified increase in DNA fluorescence based on a digital analysis of 2A. 2C: experimentally measured increase of total fluorescence due to DNA uptake as a function of the number of applied pulses. 2D: increase in DNA fluorescence as a function of the number of pulses as predicted by the electrodiffusion model.



Electropermeabilization in model systems

Thesis defended by Thomas Portet on september 24 2010, in the Laboratoire de Physique Théorique at Université Paul Sabatier. Work directed by Marie-Pierre Rols (Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale) and David S. Dean (Laboratoire de Physique Théorique).

Abstract : Electropermeabilization is a process based on the application of electric pulses which can induce a transient permeabilization of the cell plasma membrane. If you submit a cell to a sequence of electric pulses with appropriate amplitude and duration, you will manage to introduce in the cytoplasm some molecules otherwise unable to cross the external envelope, and to do so without decreasing cell viability. This technique has led to various applications, notably in the fight against cancer and in the field of gene therapy. Being safer than chemical and viral transfection methods, it has become increasingly popular among the medical community. However, membrane reorganization processes at the microscopic level are not yet fully understood, and are still a matter of debate. A better description of these phenomena would allow to improve the efficiency and the safety of the clinical protocols. In this prospect, a possible strategy consists in the study of electric field effects on model systems.

This thesis focuses on the influence of long duration (in the millisecond range) electric pulses on artificial lipid systems, giant unilamellar vesicles. It explains how these studies on model systems contributed to our fundamental knowledge of electropermeabilization, and also how they resulted in two practical applications: a method for loading liposomes with macromolecules, and a method for measuring a characteristic physical property of lipid bilayers, the edge tension. It also contains a part where the entry of different molecules into electropermeabilized cells was studied *via* the numerical resolution of partial differential equations governing the evolution of the molecule concentration. This part of the thesis brings some clues for understanding the experimentally observed different behaviours between the electrotransfer of small and macromolecules.

Keywords : Electropermeabilization, Giant Unilamellar Vesicles, Edge Tensions, Experiments, Theory

Électroperméabilisation de systèmes modèles

Thèse de biophysique soutenue par Thomas Portet le 24 septembre 2010 au Laboratoire de Physique Théorique de l'Université Paul Sabatier. Travaux encadrés par Marie-Pierre Rols (Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse) et David S. Dean (Laboratoire de Physique Théorique, IRSAMC, bât 3R1B4, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse).

Résumé : L'électroperméabilisation est un procédé fondé sur l'application d'impulsions électriques qui peuvent induire une perméabilisation réversible de la membrane plasmique de cellules vivantes. En d'autres termes: si vous soumettez une cellule à des impulsions électriques d'amplitude et de durée judicieusement choisies, vous serez alors en mesure d'introduire dans son cytoplasme des molécules d'intérêt autrement incapables de traverser son enveloppe externe, et ce sans affecter sa viabilité. Cette technique a donné lieu à diverses applications, notamment dans le cadre de la lutte contre le cancer ou des thérapies géniques. Comportant moins de risques que les méthodes de transfection virales ou chimiques, son usage est de plus en plus répandu dans la communauté médicale. Cependant, les processus de réorganisation de la membrane, au niveau microscopique, sont encore méconnus et sujets à débat. Une meilleure description de ces phénomènes permettrait d'améliorer l'efficacité et la sécurité des protocoles de traitement. Une stratégie possible pour accroître notre compréhension de l'électroperméabilisation consiste en la réalisation d'expériences sur des systèmes modèles.

Cette thèse aborde l'étude de l'effet d'impulsions électriques perméabilisantes de longue durée (quelques millisecondes) sur des systèmes lipidiques artificiels, des vésicules unilamellaires géantes. Il est décrit comment ce travail sur systèmes modèles a contribué à améliorer notre compréhension fondamentale de l'électroperméabilisation, mais aussi comment il a donné lieu à deux catégories d'applications: le chargement de vésicules avec des macromolécules et la mesure de grandeurs physiques caractéristiques des bicouches lipidiques, les tensions de bord. Ces recherches comportent aussi un aspect de modélisation de l'entrée dans des cellules électroperméabilisées de différentes molécules, *via* la résolution numérique d'équations aux dérivées partielles gouvernant l'évolution de leur concentration. Cette partie apporte des éléments de réponse visant à expliquer les différences observées expérimentalement entre le transfert de petites et de macromolécules.

Mots clé : Électroperméabilisation, Vésicules Unilamellaires Géantes, Tensions de Bord, Expériences, Théorie