

Calcium et cellules électroperméabilisées

par M. Golzio, B. Gabriel, F. Boissier, J. Deuwille, M. P. Rols, J. Teissié*

IPBS CNRS (UMR 5089) 205, route de Narbonne, 31077 Toulouse cedex

* auteur auquel doit être adressé tout courrier : adresse mël : justin.teissie@iphs.fr

Tél 33 (0)5 61 17 58 12 - Télécopie 33 (0)5 61 17 59 94

Reçu le 10 juin 2003

RÉSUMÉ

L'application de trains d'impulsions électriques entraîne, dans certaines conditions, une perméabilisation réversible d'une partie de la surface cellulaire. Il y a alors possibilité d'un échange transmembranaire facilité d'espèces chimiques de nature polaire. Nous analysons dans ce travail la possibilité de faire pénétrer des quantités contrôlées d'ion Ca^{2+} en utilisant des cellules d'ovaires de hamster chinois cultivées en suspension. Nous constatons que la présence de concentrations élevées en Ca^{2+} libre

dans le milieu de pulsation va fortement modifier les capacités des cellules à survivre au traitement électrique. Cependant, la présence d'une concentration de 1 mM est parfaitement tolérée par les cellules. Le niveau cytoplasmique classique va être spontanément rétabli par la machinerie cellulaire.

L'utilisation de ce phénomène est envisagée dans le cadre d'identification des processus de régulation en biologie cellulaire et du ciblage à haut débit en biotechnologie.

SUMMARY Calcium and electropermeabilized cells

Trains of short and intense electric pulses may induce a reversible local permeabilization on the membrane of the treated cells. Hydrophilic species can then almost freely cross the envelope and either enter or escape from the cytoplasm. The purpose of the present study was to investigate the possibility of introducing well defined amounts of Ca^{2+} ions within the cell. Chinese hamster ovary cells were used as a model system. When the pulsing buffer contained high levels of free

Ca^{2+} , the survival of cells was strongly affected. A 1 mM level was well tolerated. When cells were pulsed under moderated field conditions, it was observed that Ca^{2+} entered cells very rapidly (second time range). But the basic cytoplasmic level was set back spontaneously within a few minutes.

The perspectives of this electrical injection are discussed for basic cell biology and high-throughput biotechnology.

INTRODUCTION

Les membranes des cellules peuvent perdre transitoirement leur cohésion lorsque des suspensions cellulaires ou même des tissus sont soumis à de brèves impulsions de champs électriques (Teissié *et al.*, 1998). Il est classiquement admis que les cellules peuvent être assimilées à des capacités sphériques dont la différence de potentiel électrique transmembranaire va dépendre de l'intensité du champ externe. Lorsqu'une valeur critique de ce terme physique est atteint, une réorganisation de la structure membranaire qui a lieu résulte en un état perméable. On constate alors que des ions ou des molécules polaires peuvent traverser librement certaines parties de la membrane cellulaire. Cette dépendance spatiale résulte du caractère vectoriel de la contrainte externe (un champ électrique a une direction définie). Notons que comme le

prédisait l'approche biophysique du procédé, les organelles ne sont pas affectées en raison de leur faible taille. Cet état est réversible pour la majorité des cellules traitées mais aboutit à leur mort si le traitement est trop drastique (Pucihar *et al.*, 2001). Cette mort peut suivre très rapidement l'application des impulsions électriques (mort à court terme) (Gabriel & Teissié, 1995). Cependant, des cellules qui semblent intactes dans les minutes qui suivent leur perméabilisation et avoir retrouvé leur intégrité membranaire vont se lyser dans les heures qui suivent (mort à long terme). Ces divers états cellulaires sont résumés sur la figure 1. Nous noterons que, pour des conditions électriques où seule l'intensité du champ varie, le pourcentage de la population cellulaire dans les différents états (perméabilisée, morte à court terme, morte à long terme, viable) est contrôlé par cette intensité E . Cependant, le paramètre durée des impulsions T (clairement défini lorsque le champ a une intensité



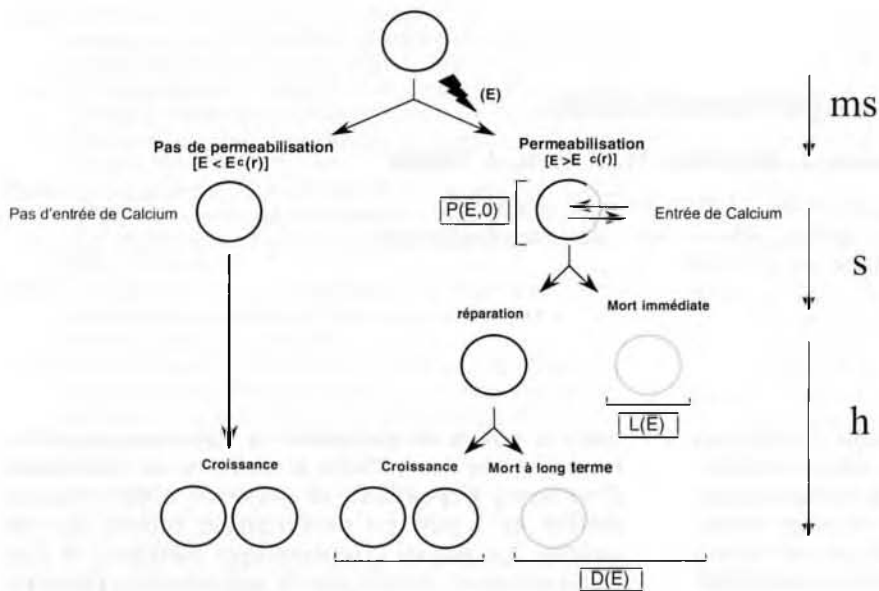


FIG. 1. – Chemins réactionnels des cellules suite à leur électropulsion. L'application des impulsions électriques déclenche la perméabilisation membranaire si l'intensité du champ dépasse un seuil critique. Une entrée de calcium va avoir lieu. La cellule peut lysé (mort à court terme, L(E)) soit retrouver son intégrité membranaire. Elle peut alors soit retrouver un comportement classique qui se traduit par sa capacité à se diviser, soit mourir (mort à long terme, D(E)).

constante pendant l'impulsion) va jouer un rôle critique. En particulier, il est établi qu'il est possible de transférer des plasmides dans des cellules par le biais de l'électropulsion. Cependant, les conditions électriques qui conduisent à de bons niveaux de l'expression de l'activité codée par le vecteur mettent en évidence un rôle critique de la durée de l'impulsion (Wolf *et al.*, 1994; Rols & Teissié, 1998).

Le transfert d'acides nucléiques n'est obtenu que pour des impulsions durant plusieurs millisecondes alors que la déstabilisation de la membrane permettant le transfert de petites molécules résulte d'impulsions à l'échelle des microsecondes. La modification structurale de la membrane ne sera donc pas la même selon la durée de l'impulsion.

Cette capacité des cellules à voir leur cohésion membranaire modifiée par des impulsions électriques connaît depuis une dizaine d'années un développement en clinique. Il est en effet possible de faire pénétrer dans des cellules tumorales des drogues hydrophiles. L'observation clé a été que ce phénomène est observé *in vivo* chez le patient atteint de tumeurs localisées et permet d'obtenir l'éradication de la tumeur (électrochimiothérapie) (Mir *et al.*, 1998). La drogue est alors injectée soit en intraveineuse soit en intratumorale. L'application du champ est obtenu par la simple mise en contact des électrodes avec la peau au voisinage de la tumeur et l'envoi de l'impulsion de tension électrique. Des durées de quelques microsecondes sont performantes pour ce type d'applications.

Une nouvelle perspective pour les applications cliniques est la possibilité de transfert et d'expression de gènes. Il a été ainsi possible d'obtenir l'expression de gènes au sein de mélanomes par une simple adaptation des concepts développés *in vitro* et des méthodologies de l'électrochimiothérapie (Rols *et al.*, 1998a). Cette approche ouvre de vastes perspectives en thérapie

génique (électrothérapie) mais aussi dans la modulation de la réponse immunitaire (immunothérapie, vaccination par l'ADN nu). Nous retrouvons la nécessité d'impulsions longues pour une expression efficace.

Cette capacité à permettre l'introduction de composés hydrophiles dans les cellules offre aux ions Ca^{2+} un mode de pénétration dans le cytoplasme. Cette entrée est sous le contrôle du potentiel électrochimique et va donc suivre le gradient de concentration. L'échange de Ca^{2+} a été observé pendant l'impulsion électrique par un système de vidéomicroscopie numérique ultrarapide. Il n'a lieu que dans le domaine affecté par la modulation du potentiel transmembranaire. Cependant, il ne résulte pas d'une migration électrophorétique de l'ion sous l'effet du champ mais de la différence de potentiel électrochimique c'est-à-dire de la différence de concentration de l'ion entre le cytoplasme et le milieu externe (Gabriel & Teissié, 1999). Il en résulte dans un milieu riche en Ca^{2+} , la propagation d'une vague Ca^{2+} à travers tout le cytoplasme et bien sûr des modifications dramatiques des niveaux de cet ion divalent.

Il est possible de moduler ce niveau de pénétration en jouant sur les paramètres expérimentaux. Cette introduction contrôlée de Ca^{2+} va déclencher des cascades de réponses de la machinerie cellulaire, rappelant par là les réponses aux stimulations hormonales. Cependant, dans des cellules plus spécialisées comme les lignées d'origine neuronale, le comportement semble plus complexe. L'entrée de Ca^{2+} ne s'opérerait plus par des domaines membranaires perméabilisés mais par des points d'entrée clairement définis et en nombre limité (Bobanovic *et al.*, 1999; Teruel & Meyer, 1998). La perméabilisation est facilitée par la présence de Ca^{2+} dans les conditions de faible force ionique. Il n'y a pas d'effet à haute force ionique dans les conditions des impulsions courtes (Rols M.-P. & Teissié J., 1989).

L'évolution des niveaux calciques dans le cytoplasme est connue pour provoquer des dégâts au niveau cellulaire lors par exemple d'exercices physiques intenses. On peut alors se poser la question des dommages associés à sa pénétration lors de l'électropéabilisation. Des travaux préliminaires dans des conditions électriques mal contrôlées ont suggéré que de tels effets délétères pouvaient être induits (Gissel & Clausen, 2001 ; Meldrum R. *et al.*, 1999).

Le but de notre travail a été de mener une étude systématique de l'électropéabilisation de cellules d'ovaires d'hamster chinois en présence de niveaux croissants d'ions Ca^{2+} . Les paramètres perméabilisation, réversibilité et viabilité résultante ont été analysés au niveau de populations cellulaires en tentant de corrélérer ces conclusions avec des observations directes sur la cellule isolée. Tenant compte du rôle critique de la durée des impulsions, les conditions impulsion brève et impulsion longue ont fait l'objet de notre étude.

Les conclusions de ce travail permettent de disposer d'un moyen d'introduction contrôlée des ions Ca^{2+} dans le cytoplasme et de suivre le cas échéant les réponses cellulaires associées. L'autre conclusion est de définir la toxicité associée mais aussi la capacité de la cellule à se défendre vis-à-vis d'une pénétration massive de cet ion divalent.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Cellules CHO

Les cellules d'ovaire de hamsters chinois utilisées (CHO, clone WTT) (Gottesmann, 1985) diffèrent de la souche parentale par leur aptitude à être cultivées en suspension.

Le milieu de culture utilisé est le milieu minimum essentiel de Eagle (MEM 0111, Eurobio, France) complété par du sérum de veau foetal décomplémenté (30 min à 56 °C) (Boehringer) à 8 %, par du D(+) – glucose (Difco) (3,5 g/l), du bouillon de tryptose phosphate (Difco) (2,95 g/l) et enrichi en vitamines. Le pH du milieu de culture MEM est régulé à pH 7,4 par un tampon bicarbonate (bicarbonate de sodium 3,5 g/l). Les antibiotiques, la pénicilline (Gibco) (100 unités/ml) et la streptomycine (Gibco) (100 µg/ml) ainsi que la L-glutamine (Intermed) (0,58 mg/ml), très instables, ne sont ajoutés qu'au moment de l'emploi. La présence d'un indicateur de pH coloré, le rouge phénol, permet de contrôler le pH du milieu MEM.

Les cellules sont cultivées dans des flacons en verre (« spinner ») à 37 °C sous agitation douce et continue (70 à 100 tours/minute) pour éviter l'adhésion des cellules au support. Le temps de génération cellulaire est de 18-20 heures.

Electropulsation

Les générateurs utilisés pour cette étude sont les générateurs CNRS permettant de délivrer des tensions (U)

jusqu'à 1 500 V. Le profil des impulsions délivrées est de type vague carrée, la tension U est constante pendant toute la durée de l'impulsion. Une partie du signal (U/100) est envoyée sur un oscilloscope (5026, Enertec) permettant un contrôle visuel du profil cinétique des impulsions appliquées. Il est possible de moduler l'intensité (E), le nombre (N), la durée (T) et la fréquence (F) des impulsions délivrées.

Les électrodes planes, parallèles et reliées au générateur, sont appuyées directement sur une boîte de culture. 100 µl de suspension cellulaire sont déposés entre les électrodes distantes de 0,5 cm (d). Ce volume forme un continuum électrique entre les deux électrodes. Les cellules présentes entre les deux électrodes sont alors soumises à un champ électrique homogène d'intensité E égale à :

$$E(\text{V/cm}) = U(\text{V})/d(\text{cm}).$$

Milieux de pulsation

Pour les expériences d'électropulsation, le milieu de culture est remplacé par du milieu de pulsation PB. Classiquement PB est un tampon phosphate de potassium (10 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 7,4) contenant 1 mM MgCl_2 , diverses concentrations définies de Ca^{2+} , 250 mM de saccharose et dont le pH est ajusté à 7,4. Ce milieu iso-osmotique et de faible force ionique permet de limiter, grâce à sa faible conductance, l'effet Joule associé aux impulsions électriques.

Cependant, le tampon phosphate est un chélateur de l'ion Ca^{2+} . Dans ces conditions, la concentration sous forme ion libre sera notablement plus faible que celle théoriquement présente (0,3 mM en présence de 2,5 mM total par exemple). L'intérêt de ce milieu sera donc la possibilité de travailler avec de très faible niveau calcique libre.

Mais pour pouvoir utiliser de vastes gammes en Ca^{2+} libre, un autre PB est réalisé où le tampon phosphate a été remplacé par un tampon Hépès (PB-Hépès) de même pH, les autres composants restant identiques.

Electropéabilisation

Dans toutes les expériences, le comportement des cellules pulsées est comparé à celui des cellules témoins qui sont soumises à des impulsions fictives de 0 V, le protocole restant respecté.

La perméabilité membranaire est mise en évidence par l'entrée à travers la membrane cellulaire d'une molécule fluorescente naturellement non perméante. Il s'agit de l'iodure de propidium (PI, 668 g/mol). Ses caractéristiques spectrales sont les suivantes : maximum d'excitation 493 nm, maximum d'émission 588 nm lorsqu'il est en solution et 617 nm lorsqu'il est intercalé entre les bases d'ADN. Son rendement quantique augmente d'un facteur 1 000 lorsqu'il est lié à l'ADN. Une solution stock de PI à 200 µM est préparée et conservée à 4 °C.

La lecture de la fluorescence se fait au cytomètre de flux (FACscan, Becton-Dickinson). Les cellules en suspension vont passer au travers d'un faisceau laser à argon

(488 nm) qui excite la molécule de PI. Le canal FL₂ du cytomètre est utilisé pour détecter la fluorescence émise par le PI (filtre d'émission 585 ± 21 nm). Deux paramètres peuvent être mesurés : le pourcentage de cellules perméabilisées et l'intensité de fluorescence associée correspondant à la quantité moyenne de marqueur incorporé dans les cellules. Les types d'histogramme obtenus sont très caractéristiques. Les cellules électroperméabilisées présentent une forte intensité de fluorescence par rapport aux cellules témoins. Cette observation permet une définition fiable des fenêtres de seuillage en fluorescence des sous populations. En particulier, les cellules lysées vont présenter une fluorescence très élevée en comparaison des cellules perméabilisées de manière réversible (Rols *et al.*, 1998).

Viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire est déterminée par deux méthodes :

- viabilité à long terme caractérisée par la capacité des cellules électroperméabilisées à adhérer à un support et à se diviser. Cette mesure est effectuée 24 heures après le traitement électrique ;

- viabilité à plus court terme qui repose sur un critère de fonctionnalité du métabolisme. Cette mesure est effectuée 4 heures après le traitement électrique.

La mesure de la viabilité à long terme est réalisée avec la technique de coloration au crystal-violet. Les cellules CHO viables ont la capacité d'adhérer au support et de se multiplier à la différence des cellules mortes qui restent en suspension et sont éliminées par simple aspiration du milieu de culture. Les cellules adhérentes sont colorées par du crystal-violet (C₂₅H₃₀CIN₃, 407,99 g/mol) (Merck). Ce colorant diffuse librement dans les cellules et colore indifféremment noyau et cytoplasme cellulaire. Différents lavages permettent d'éliminer l'excès de crystal-violet avant de lyser les cellules (acide acétique) et récupérer le marqueur. La quantité de marqueur libéré est proportionnelle au nombre de cellules. La lecture de l'absorbance est effectuée à 595 nm après dilution dans de l'eau distillée pour obtenir un densité optique (DO) inférieure à 1, par spectrophotométrie U.V/Visible Lambda 5 (Perkin Elmer). L'absorbance de l'échantillon non électropulsé correspond au 100 % de viabilité. Le pourcentage de survie d'un échantillon est donnée par la relation suivante :

$$\text{Viabilité (\%)} = \text{DO} \times 100 / \text{DO}_{\text{témoin}}$$

La mesure de la viabilité à plus court terme est réalisée avec la fluorescéine diacétate (FDA). Le FDA est une molécule non polaire qui diffuse librement au travers des membranes cellulaires. A l'intérieur de la cellule, le marqueur est clivé par des estérases fonctionnelles. Le produit du clivage est un composé fluorescent, la fluorescéine. L'activité des estérases est un critère de bon fonctionnement du métabolisme et donc de viabilité cellulaire. Le FDA est alors ajouté à chaque échantillon à 0,01 % dans le volume final (solution stock à 0,5 % dans de l'acétone). Les cellules sont incubées à température ambiante 10 minutes dans l'obscurité.

La lecture de la fluorescence se fait au cytomètre de flux sur le canal FL1 (filtre émission 530 ± 15 nm). Les cellules vivantes présentent une forte intensité de fluorescence par rapport aux cellules témoins.

Les deux méthodes donnent les mêmes résultats pour des cellules en suspension dans les conditions électriques utilisées. Ces résultats montrent de plus que, dans les conditions électriques utilisées, les cellules meurent essentiellement par lyse cellulaire rapide (mort à court terme) (Gabriel & Teissié, 1995).

Une autre grandeur d'intérêt est l'évaluation du pourcentage de cellules qui demeurent viables après leur électroperméabilisation (PV). Dans l'hypothèse où la mort cellulaire suite aux impulsions électriques n'affecte que des cellules qui ont été perméabilisées, ce paramètre est la différence entre le pourcentage de cellules perméabilisées (P) et le pourcentage de cellules mortes (soit 100 moins le pourcentage de cellules viables (V)) :

$$\text{PV} = \text{P} + \text{V} - 100.$$

Réversibilité de la perméabilisation

La réversibilité du processus d'électroperméabilisation est analysée par l'incapacité des cellules à incorporer le PI lorsque celui-ci est ajouté après l'application du champ électrique. Les cellules en suspension sont centrifugées pendant 5 minutes à 120 g (centrifugeuse C500, Jouan) et remises en suspension dans du tampon de pulsation à une densité de 10⁷ cellules/ml. 100 µl de la suspension cellulaire sont électropulsés. Les cellules sont ensuite incubées à température ambiante, 100 µl de PI (200 µM) sont ajoutés aux cellules à différents temps après l'application du champ électrique. Les échantillons sont ensuite laissés pendant 10 minutes à température ambiante en présence du PI avant d'être remis en suspension dans un tube Falcon 2058, contenant 1 ml de PBS. La lecture de la fluorescence se fait au cytomètre de flux. Le canal FL₂ du cytomètre est utilisé pour détecter la fluorescence émise par le PI (filtre d'émission 585 ± 21 nm).

Mesure Ca²⁺ libre

La sonde Fluo3 (Molecular probes) a été retenue en raison de la facilité du suivi en ligne des évolutions qualitatives à l'échelle de la milliseconde.

Marquage des cellules avec le Fluo-3 AM

Une solution stock de Fluo-3 AM 220 µM dans du DMSO où est présent de l'acide pluronique F127 à 20 % est préparée et conservée à l'abri de la lumière, à - 20 °C. 10⁷ cellules sont remises en suspension dans 1 ml de tampon PB-Hépès, 2,2 µM Fluo-3 AM (1 % DMSO et 0,2 % F127 final), puis incubées pendant 30 min. à température ambiante, sous agitation douce. Les cellules sont ensuite récupérées par centrifugation et suspendues dans le tampon approprié.

Spectrofluorimétrie

La fluorescence d'une population cellulaire ($2 \cdot 10^6$ cellules marquées au Fluo-3 AM), en suspension dans 2 ml de tampon approprié, dans une cuve de spectrofluorimétrie 4 faces, est analysée sur un spectrofluorimètre Jobin Yvon JY3. Les longueurs d'onde respectivement d'excitation et d'analyse sont fixées à 506 et 526 nm et les résolutions spectrales à 10 et 4 nm. L'évolution du signal lumineux est suivie au cours du temps à l'aide d'un enregistreur graphique.

Vidéomicroscopie numérisée

Le système d'imagerie cellulaire et le traitement mathématique des images ont été préalablement décrits (Gabriel *et al.*, 1990). Les cellules marquées au Fluo-3 AM sont placées au sein d'une chambre d'observation et de pulsation construite au laboratoire contenant 100 μ l de tampon approprié et l'ensemble est monté sur le microscope inversé. Après sédimentation des cellules sur le fond de la chambre, celles-ci sont observées avec un objectif à immersion $\times 63$ apochromatique et les différentes images en fluorescence sont numérisées, avant et à différents temps après pulsation des cellules.

L'obturateur n'est ouvert que le temps de l'observation pour éviter les processus de photodégradation de la sonde.

RÉSULTATS

Entrée réversible du Ca^{2+} dans les cellules

Travail sur des populations

L'utilisation de l'indicateur Fluo-3 permet de mesurer qualitativement la pénétration de Ca^{2+} dans le cytoplasme des cellules électropulsées. Le niveau de fluorescence d'une population de cellules CHO augmente de façon considérable à la suite des impulsions électriques (Fig.2). Cela résulte vraisemblablement de l'entrée massive de Ca^{2+} , le milieu externe contenant

1 mM Ca^{2+} libre à comparer à une valeur de 200 nM dans le cytoplasme des cellules non traitées. Le niveau de fluorescence reste stable et élevé pendant plus de 5 min avant de décroître vers son niveau de départ. Les cellules ont donc la capacité de ramener la concentration calcique cytoplasmique au niveau physiologique après une pénétration massive de Ca^{2+} . Ces observations sont caractéristiques de conditions de travail à 37 °C où le métabolisme cellulaire est très actif. Si les cellules sont conservées à plus basse température, cette réversibilité du niveau calcique n'est pas observée et une lyse cellulaire va apparaître traduisant l'incapacité des cellules à résister à ce haut niveau calcique dans leur cytoplasme.

L'analyse de la fluorescence dans la cellule juste après l'application d'un train d'impulsions montre qu'elle dépend du niveau calcique dans le milieu de pulsation (Fig. 3 A). Une saturation est présente dès une concentration de 1 mM. Compte tenu de l'affinité de la sonde, cela signifie que la concentration cytoplasmique est devenue supérieure à 2 μ M, traduisant l'efficacité de cette approche de chargement. Dans un milieu pauvre en Ca^{2+} (2 μ M), l'efficacité de ce chargement par un train d'impulsions dépend de l'intensité du champ électrique (Fig. 3B). Elle n'apparaît qu'au delà du seuil induisant la perméabilisation mise en évidence par la pénétration de PI. Notons que, même avec des champs intenses, la fluorescence n'augmente que de 40 %. Cela correspond à un niveau calcique de l'ordre de 300 à 400 nM soit 5 fois moins que la concentration externe.

Travail sur la cellule unique

Les techniques de vidéo-microscopie de fluorescence couplées à des chambres d'électropulsation installées sur la platine du microscope permettent de suivre en ligne la cinétique et la topologie des évolutions des niveaux calciques dans le cytoplasme d'une seule cellule en suspension (Fig. 4).

Dans un milieu pauvre en Ca^{2+} (2 μ M), l'application d'une impulsion brève (0,5 ms, 1,2 kV/cm) induit une augmentation brutale du niveau calcique. Le retour au

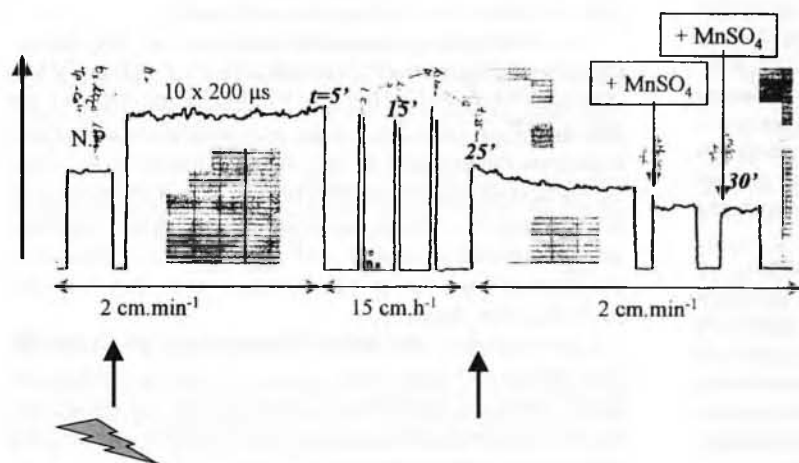


FIG. 2. – Évolution des niveaux calciques dans une population.

La fluorescence du Fluo-3 chargé dans une population de CHO est observée à l'aide du spectrofluorimètre JY 3. Une impulsion de 0,2 ms et 1,4 kV/cm est appliquée. L'évolution du signal de fluorescence est enregistrée d'abord avec une vitesse élevée en continu puis à vitesse plus lente en séquentiel. L'introduction de l'inhibiteur Mn^{2+} à l'aide d'un ionophore permet de confirmer que la sonde est bien restée cytoplasmique.

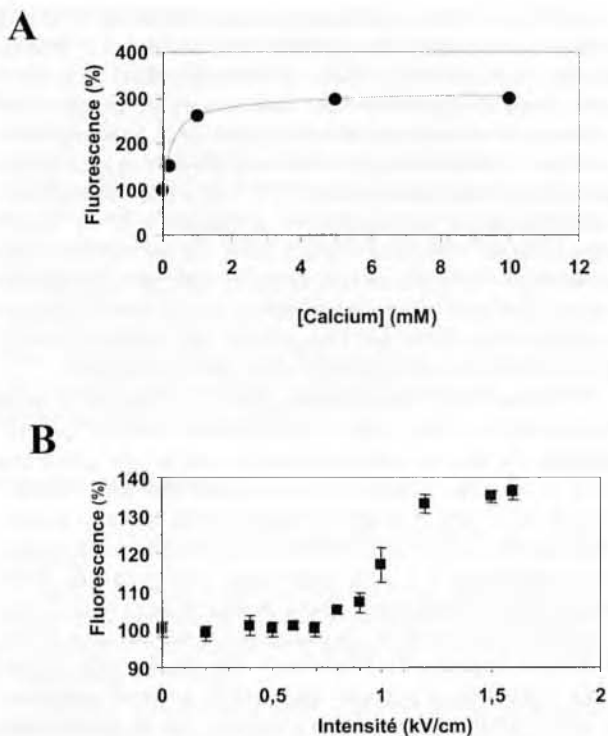


FIG. 3. – Variations calciques intracellulaires.

A, Augmentation transitoire de la concentration en calcium intracellulaire en fonction de la concentration en calcium libre extracellulaire. La mesure de fluorescence a été réalisée au spectrofluorimètre 25-30s après électropulsation des cellules CHO (10x100 μ s, 1 kV/cm) dans du tampon PB-Hépès contenant des quantités croissantes de calcium libre. B, Augmentation transitoire de la concentration calcique intracellulaire en fonction de l'intensité du champ électrique appliqué. La mesure de fluorescence a été réalisée au spectrofluorimètre 25-30s après électropulsation des cellules CHO (10x100 μ s) dans du tampon PB-Hépès 2 μ M calcium libre.

niveau initial s'avère rapide (moins de 5 min) (Fig. 4A). Si le milieu de pulsation est beaucoup plus riche en Ca^{2+} , nous retrouvons une montée brutale de la fluorescence juste après l'impulsion. De nouveau, la cellule est capable de réajuster spontanément son niveau calcique (Fig. 4B). Ce retour de fluorescence est plus lent que pour un milieu plus pauvre. Il convient cependant de tenir compte de la Kd du Fluo-3 vis-à-vis du Ca^{2+} pour interpréter cette observation en terme de niveau calcique. La conclusion demeure que 15 min après l'impulsion le cytoplasme a retrouvé sa concentration de départ. La comparaison des clichés avant l'impulsion, 5 et 15 min après, ne permet pas de conclure à une compartimentation calcique particulière dans la cellule électroperméabilisée.

Un traitement drastique (10 mM Ca^{2+} externe, 1 x 10 ms, 1 kV/cm) conduit à un comportement différent (Fig. 4C). L'impulsion résulte en une montée rapide de la fluorescence dans la cellule. Mais 15 min après, le cytoplasme présente des macrodomaines très fluorescents traduisant à la fois un haut niveau calcique et une accessibilité à la sonde hydrophile. La cellule n'a plus la capacité de réparer l'agression calcique.

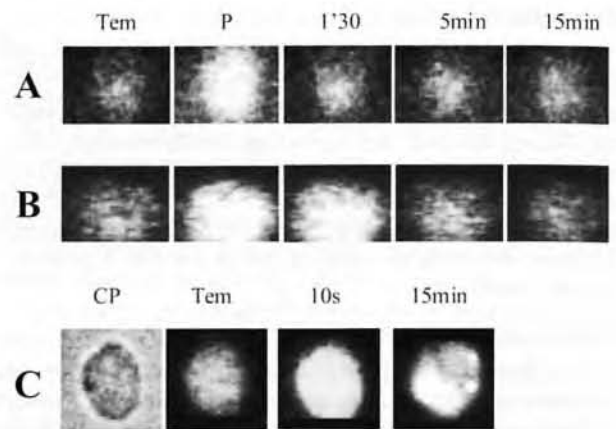


FIG. 4. – Observation directe des variations calciques intracellulaires.

A, les cellules CHO ont été électropulsées (1x500 μ s, 1,2 kV/cm) sous le vidéo-microscope dans du tampon PB-Hépès 2 μ M Ca^{2+} libre. Les images en fluorescence ont été numérisées immédiatement avant (Tem), immédiatement après (P) et différents temps après l'électropulsation (1'30, 5' et 15'). B, les cellules CHO ont été électropulsées (1x500 μ s, 1,2 kV/cm) sous le vidéo-microscope dans du tampon PB-Hepes 1 mM Ca^{2+} libre. Les images en fluorescence ont été numérisées comme décrit ci-dessus. C, Les cellules CHO ont été électropulsées (1x10 ms, 1 kV/cm) sous le vidéo-microscope dans du tampon PB-Hépès 20 mM Ca^{2+} libre. Les images en fluorescence ont été numérisées immédiatement avant (Tem) et différents temps après l'électropulsation (10 s et 15 min). CP, contraste de phase.

Perméabilisation et viabilité pour des impulsions courtes

La présence de Ca^{2+} à diverses concentrations dans le milieu de pulsation va peu modifier les pourcentages de cellules perméabilisées par un train de 8 impulsions de 0.1 ms. Cela est observé pour diverses intensités de champ électrique affectant des pourcentages croissants de la population cellulaire (Fig. 5). Par contre, la fluorescence du PI associée à chaque cellule perméabilisée se trouve fortement accrue avec une réponse qui croît avec la concentration de Ca^{2+} présent dans le milieu. Cela reflète une meilleure accessibilité de la sonde à ses sites de fixation sur les acides nucléiques.

La viabilité des cellules électropulsées va être dramatiquement affectée par la présence de Ca^{2+} (Fig. 5). Cet effet est d'autant plus net que l'intensité du champ a par elle-même un effet létal. Mais son amplification est très fortement dépendante de la concentration en Ca^{2+} . Cela est particulièrement mis en évidence si l'on s'intéresse au pourcentage de cellules perméabilisées viables PV. Alors qu'une concentration de 1 mM aboutit à une optimisation du phénomène, des concentrations plus élevées vont avoir un effet délétère.

La modulation des trains d'impulsions en jouant sur leur nombre et leur durée (de 25 à 100 μ s) pour une durée cumulée constante ne modifie pas les comportements de la perméabilisation et de la viabilité des cellules vis-à-vis de concentration de Ca^{2+} .

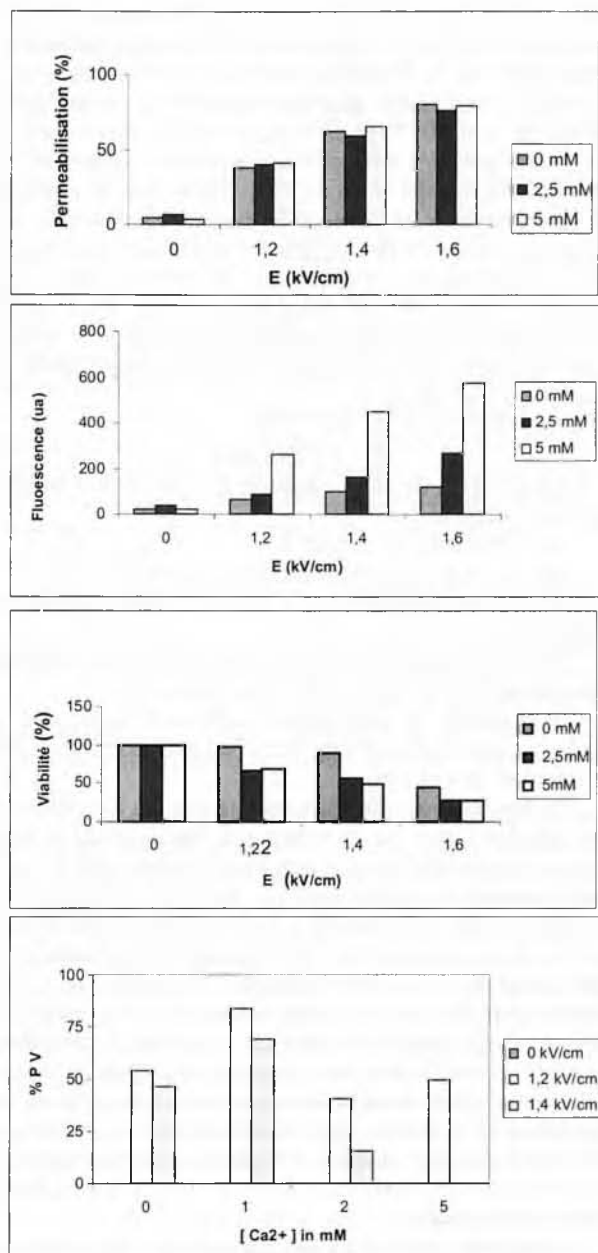


FIG. 5. – Effet d'impulsions courtes.

De haut en bas, sont représentées les évolutions des pourcentages de cellules perméabilisées, des niveaux de fluorescence du PI et des cellules qui restent viables suite à l'application de trains d'impulsions (8×0.1 ms) dans des milieux de pulsation à différents contenus calciques, en fonction de l'intensité du champ appliqué, puis le pourcentage de cellules perméabilisées viables (PV) soumises au même train d'impulsions pour 2 intensités de champ, en fonction de la concentration en calcium.

Réversibilité de la perméabilisation

Nous retrouvons les profils classiques. Les résultats de réversibilité font apparaître une cinétique peu modifiée mais surtout le fait que la mort à court terme, L(E), (Fig. 1) est accrue. Elle correspond en fait au niveau de

perméabilisation résiduelle que nous observons 8 min après les impulsions électriques (Tableau 1). La présence de 1 mM Ca^{2+} l'augmente de plus de 100 %.

La mort à long terme D(E) (Fig. 1) dépend fortement de la concentration en Ca^{2+} dans le milieu de pulsation. Elle est la différence entre mortalité à 4 h et perméabilisation à 15 min (Tableau 1). Elle ne peut pas être détectée en présence de 1 mM Ca^{2+} externe. En effet, le niveau de cellules perméabilisées n'évolue pas entre 15 min et 4 heures comme observé pour les cellules traitées dans un milieu pauvre en Ca^{2+} . Par contre, elle devient très importante en présence de 5 mM. De plus, à 10 mM, on voit apparaître cette mort à long terme D(E) dès les 15 min soit dans les 5-10 min qui suivent la fin du processus de disparition de l'état perméable. A 5 mM, cette mort à long terme est beaucoup plus lente.

TABLEAU 1. – Cinétique de la réparation membranaire.

	0 mM	1 mM	5 mM	10 mM
Perm.	62,100	67,930	65,300	64,270
Perm. à 3 min.	69,200	39,500	55,00	46,200
Perm. à 8 min.	12,9	28,0	31,4	37,8
Perm. à 15 min.	9,3	26,9	32,7	53,4
Mortalité à 4 h	10,6	24,2	51,1	51,8

Le pourcentage de cellules qui demeurent perméabilisées à la suite de l'application d'un train d'impulsions (8×0.1 ms, 1.4 kV/cm) est représenté en fonction du temps post impulsions et du contenu en calcium du milieu de pulsation.

Perméabilisation et viabilité pour des impulsions longues

Comme dans le cas d'impulsions courtes, la présence de Ca^{2+} à diverses concentrations dans le milieu de pulsation va peu modifier les pourcentages de cellules perméabilisées par un train de 10 impulsions de 5 ms. Cela est observé pour diverses intensités de champs électriques affectant des pourcentages croissants de la population cellulaire (Fig. 6). Comme classiquement décrit, de hauts niveaux de perméabilisation sont obtenus pour des intensités de champ plus faibles que dans le cas d'impulsions courtes. Par contre, la fluorescence du PI associée à chaque cellule perméabilisée n'est que peu affectée par la présence de Ca^{2+} .

La viabilité des cellules est affectée par la présence de Ca^{2+} . Cette sensibilité va être sous le contrôle de l'intensité du champ électrique appliqué. Pour des champs de l'ordre de 0,6 kV/cm, l'effet du Ca^{2+} n'apparaît que pour des concentrations supérieures à 2 mM. Si des conditions de champ plus intenses sont utilisées, la présence de Ca^{2+} va être détectée même à seulement 1 mM. Cet effet se traduit de manière très nette sur le paramètre PV. Les résultats à 0,6 kV/cm en présence de 1 mM ou de 0,8 kV/cm sans Ca^{2+} apparaissent les plus efficaces. Si des conditions soit de champ plus élevé, soit de concentration calcique plus forte, sont utilisées, le paramètre PV se trouve affaibli.

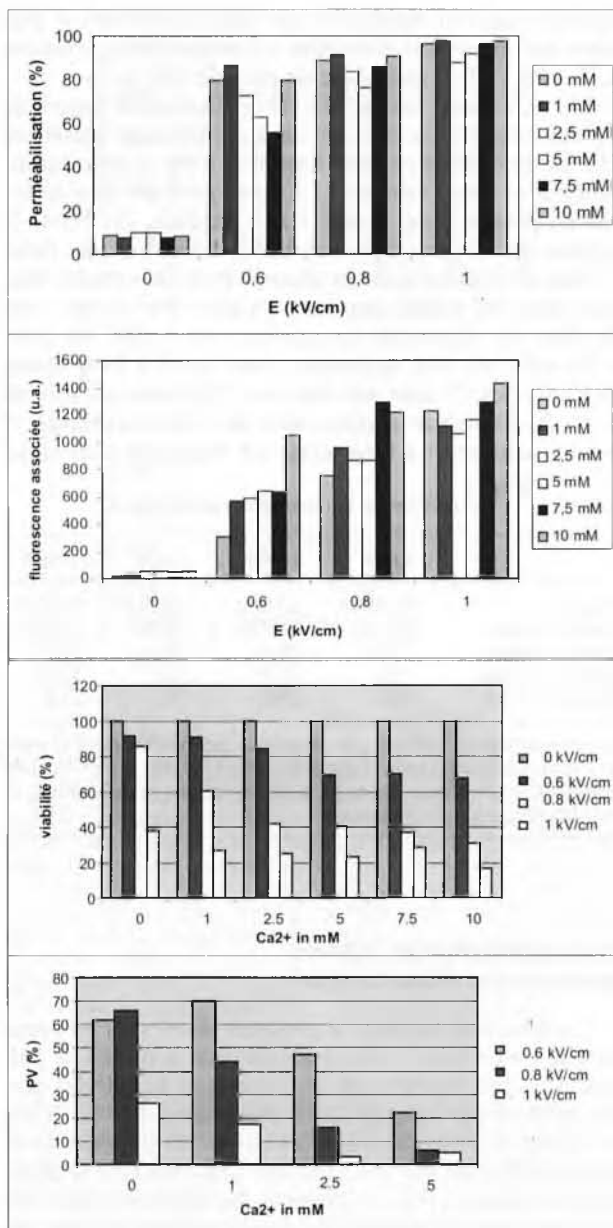


FIG. 6. – Effet d'impulsions longues.

De haut en bas, sont représentées les évolutions des pourcentages de cellules perméabilisées et des niveaux de fluorescence du PI suite à l'application de trains d'impulsions (10×5 ms) dans des milieux de pulsation à différents contenus calciques, en fonction de l'intensité du champ appliqué, puis le pourcentage de cellules viables et de cellules perméabilisées viables (PV) soumises au même train d'impulsions pour diverses intensités de champ, en fonction de la concentration en calcium.

CONCLUSIONS

L'analyse biophysique du processus d'électroperméabilisation a permis d'élaborer sa description théorique. Cela permet de disposer de l'équation du flux et de prédire ses implications. Les impulsions électriques induisent au delà d'un seuil E_p la perméabilisation d'une cer-

taine fraction de la surface cellulaire. Bien que la structure des assemblages pluri-moléculaires responsables de cette perte de la cohésion membranaire demeure mal connue, il est établi que leur densité va croître sous l'effet de la durée T et du nombre N des impulsions. Il en résulte pour les termes d'échanges des conditions de flux qui obéissent à la loi de Fick. C'est donc le gradient de concentration de l'espèce hydrophile S , soit ΔS , qui est la force motrice de l'échange. Cependant, cette modification structurale est transitoire et disparaît selon une loi du 1^o ordre. Nous aboutissons à une expression simple du flux d'échange résultant d'un train de N impulsions de durée T et d'intensité E à un temps t après le traitement électrique :

$$\Phi(S, t) = Cte \Delta S(t) X(T, N) (1 - E_p/E) \text{Exp}(-k(T, N)t).$$

La prédiction de cette équation est que le flux entrant de Ca^{2+} dépend :

- de l'intensité du champ E ,
- de la durée et du nombre des équations T et N ,
- de la concentration de Ca^{2+} libre dans le milieu de pulsation,
- et va disparaître selon un processus qui ne dépend que du nombre et de la durée des impulsions.

Cet ensemble de conclusions suppose bien sûr que le Ca^{2+} n'a pas d'effet propre sur l'état perméabilisé ni sur la création de cet état.

Nos observations expérimentales sont en accord avec les grandes lignes de ce schéma. L'intensité du champ permet de déclencher et d'amplifier le processus de perméabilisation. Les effets du Ca^{2+} sont plus marqués pour les fortes valeurs de champ. Les effets croisés de l'intensité et de la durée (et du nombre) des impulsions sont bien observés. Les effets associés à la présence de Ca^{2+} seront amplifiés par une augmentation de la concentration en Ca^{2+} dans le milieu de pulsation. Cependant, tout un ensemble d'observations ne s'inscrit pas dans cette description simplificatrice. Il traduit la réponse de la cellule à la fois à la perméabilisation et à l'entrée résultante de Ca^{2+} dans le cytoplasme. Nous observons une réponse cellulaire à ce qu'il convient d'appeler une agression calcique.

Nous avons observé que le signal de fluorescence associé à l'entrée de PI était affecté par cette présence de Ca^{2+} . Il n'y a pas de données de la littérature permettant d'envisager un effet direct sur le complexe ADN-PI. Par contre, nous avons établi que ce signal de fluorescence était beaucoup plus intense dans des cellules mortes. L'accroissement du signal de fluorescence du PI ne refléterait donc pas un état de plus forte électroperméabilisation mais serait à associer à une toxicité très rapide liée à l'entrée de Ca^{2+} . Cette interprétation est en accord avec l'effet de doses croissantes de Ca^{2+} qui amplifie fortement le signal PI et l'accroissement de la mort à court terme $L(E)$.

L'effet le plus dramatique de nos observations est clairement cette conséquence immédiate. Elle reflète la complexité du processus d'électroperméabilisation qui ne se limite pas à la création de quelques « pores » lipidiques

mais implique la machinerie cellulaire (Teissie & Rols, 1994; Rols *et al.*, 1998b).

Les résultats sur la réversibilité de l'état perméable (Tableau 1) mettent en évidence 2 classes d'effets. La mort à court terme est fortement amplifiée traduisant l'inhibition, par le Ca²⁺ ainsi introduit dans le cytoplasme, des mécanismes de « réparation » membranaire. Cet effet est sensible à de bas niveaux de Ca²⁺. L'amplification de L(E) apparaît comme saturée dès 1 mM.

De plus hauts niveaux calciques, à associer à une entrée plus massive, vont entraîner une amplification de la mort à long terme. Notons de plus que celle-ci va être déclenchée plus rapidement comme le montre la comparaison des observations à 5 et à 10 mM (Tableau 1). Dans cette dernière condition, la mort à long terme se déclenche visiblement pendant la phase de réparation et conduit à une apparente augmentation de L(E) mais il convient de noter que le niveau stationnaire de mort à long terme est présent dans cette condition dès 15 min post-impulsion.

L'origine de cette mortalité est à associer aux effets du Ca²⁺ sur les associations pluri-moléculaires présentes dans le cytoplasme. Nous avons mis en évidence que la vitesse de réparation de la membrane électroperméabilisée était sous le contrôle du niveau d'organisation du cytosquelette. Il est alors séduisant de proposer que le cytosquelette est l'une des cibles de cette entrée massive du Ca²⁺.

Les mitochondries et le réticulum endoplasmique jouent un rôle de pièges salvateurs lors d'influx calciques. Les observations de la figure 4 montrent que sur le long terme les excès calciques demeurent limités à des sous-compartiments dans le cytoplasme. Nous pouvons donc envisager que le Ca²⁺ électro-introduit va être « stocké » dans ces organites. Si son niveau atteint des valeurs critiques, cela conduit à des destructurations du réticulum endoplasmique et à la fragmentation de ces tubules (Subramanian & Meyer, 1997).

Il est de plus connu que la surcharge calcique dans les mitochondries est l'origine de processus de nécrose rencontrés dans des maladies du muscle (Wrogemann *et al.*, 1976).

Il convient d'insister sur le caractère massif des entrées de Ca²⁺ qui sont associées aux effets délétères. Ces conséquences négatives ne sont induites que lorsque le niveau calcique du milieu de pulsation est élevé et/ou lorsque les conditions électriques induisent un haut niveau de perméabilisation. Une observation essentielle est que les cellules sont capables de résister à des entrées importantes (1 mM en externe signifie plus de 3 ordres de grandeur dans le gradient). Ce mode d'introduction permet donc de suivre sur des populations les processus de défense des cellules sur de vastes gammes de calcium présent dans le cytoplasme.

Les perspectives de ce travail s'inscrivent de plus dans deux autres directions. En jouant sur la durée des impulsions et en présence de niveaux contrôlés de Ca²⁺ externe, il est possible de déclencher des processus de libération de Ca²⁺ induite par le Ca²⁺ (Dupond G. *et al.*, 1991). Mais de plus en utilisant des nano-électrodes, il

est possible de contrôler la position et la taille des structures perméabilisées dans la membrane (Lundqvist *et al.*, 1998; Ryttsen *et al.*, 2000). La pénétration de calcium devient alors topologiquement contrôlable à la surface de la cellule ou du tissu.

Il devient alors possible de repérer l'éventuelle ségrégation topologique de sites sensibles au calcium dans des cellules isolées ou même dans des groupes. Une telle stratégie est envisagée dans des perspectives de ciblage à haut débit de cibles intracellulaires (Nolkrantz *et al.*, 2002).

Remerciements. – Le CNRS, l'Union Européenne (projet « cliniporator »), l'ARC et la Ligue contre le Cancer (Haute Garonne) doivent être remerciées pour leurs aides financières.

BIBLIOGRAPHIE

- Bobanovic F., Bootman M.D., Berridge M.J., Parkinson N.A. & Lipp P. Elementary [Ca²⁺]_i signals generated by electroporation functionally mimic those evoked by hormonal stimulation. *FASEB J.*, 1999, 13, 365-376.
- Dupont G., Berridge M.J. & Goldbeter A. Signal-induced Ca²⁺ oscillations: properties of a model based on Ca(2+)-induced Ca²⁺ release. *Cell Calcium*, 1991, 12, 73-85.
- Gabriel B., Baldin V., Roman A.M., Bosc-Bierne I., Noailles-Depeyre J., Prats H., Teissie J., Bouche G. & Amalric F. Localization of peptide growth factors in the nucleus. *Methods Enzymol.*, 199, 198, 480-494.
- Gabriel B. & Teissie J. Control by electrical parameters of short- and long-term cell death resulting from electroperméabilization of Chinese hamster ovary cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 126, 6171-6178.
- Gabriel B. & Teissie J. Time courses of mammalian cell electroperméabilization observed by millisecond imaging of membrane property changes during the pulse. *Biophys. J.*, 1999, 76, 2158-2165.
- Gissel H. & Clausen T. Excitation-induced Ca²⁺ influx and skeletal muscle cell damage. *Acta Physiol. Scand.*, 2001, 171, 327-334.
- Lundqvist J.A., Sahlin F., Aberg M.A., Stromberg A., Eriksson P.S. & Orwar O. Altering the biochemical state of individual cultured cells and organelles with ultramicroelectrodes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 10356-10360.
- Meldrum R.A., Bowl M., Ong S.B. & Richardson S. Optimisation of electroporation for biochemical experiments in live cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999, 256, 235-239.
- Mir L.M., Glass L.F., Sersa G., Teissie J., Domenge C., Miklavcic D., Jaroszeski M.J., Orlowski S., Reintgen D.S., Rudolf Z., Belehradek M., Gilbert R., Rols M.P., Belehradek J., Bachaud J.M., DeConti R., Stabuc B., Cemazar M., Coninx P. & Heller R. Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumours by electrochemotherapy. *Brit. J. Cancer*, 1998, 77, 2336-2342.
- Nolkrantz K., Farre C., Hurtig K.J., Rylander P. & Orwar O. Functional screening of intracellular proteins in single cells and in patterned cell arrays using electroporation. *Anal. Chem.*, 2002, 74, 4300-4305.
- Pucihar G., Kotnik T., Kanduser M., Miklavcic D. The influence of medium conductivity on electroperméabilization and survival of cells *in vitro*. *Bioelectrochemistry*, 2001, 54, 107-115.
- Rols M.P. & Teissie J. Ionic-strength modulation of electrically induced permeabilization and associated fusion of mammalian cells. *Eur. J. Biochem.*, 1989, 179, 109-115.
- Rols M.P. & Teissie J. Electroperméabilization of mammalian cells

- to macromolecules : control by pulse duration. *Biophys. J.*, 1998, 75, 1415-1423.
- Rols M.P., Delteil C., Golzio M., Dumont P., Cros S. & Teissié J. *In vivo* electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma. *Nature Biotechnology*, 1998a, 16, 168-171.
- Rols M.P., Delteil C., Golzio M. & Teissié J. Control by nucleotides of voltage induced mammalian cell membrane permeabilization, gene transfer and resulting expression. *Eur. J. Biochem.*, 1998b, 254, 382-388.
- Ryttsen F., Farre C., Brennan C., Weber S.G., Nolkranz K., Jørdemark K., Chiu D.T. & Orwar O. Characterization of single-cell electroporation by using patch-clamp and fluorescence microscopy. *Biophys. J.*, 2000, 79, 1993-2001.
- Subramanian K. & Meyer T. Calcium induced restructuring of nuclear envelope and endoplasmic reticulum calcium stores. *Cell*, 1997, 89, 963-971.
- Teissié J. & Rols M.P. Manipulation of cell cytoskeleton affects the lifetime of cell membrane electropermeabilization. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1994, 720, 98-110.
- Teissié J., Eynard N., Gabriel B. & Rols M.P. Electropermeabilization of cell membranes. *Advanced drug delivery reviews*, 1998, 35, 3-19.
- Teruel M.N. & Meyer T. Electroporation-induced formation of individual calcium entry sites in the cell body and processes of adherent cells. *Biophys. J.*, 1997, 73, 1785-1796.
- Wolf H., Rols M.P., Bold E., Neumann E. & Teissié J. Control by pulse parameters of electric field mediated gene transfer in mammalian cells. *Biophys. J.*, 1994, 66, 524-531.
- Wrogemann K. & Pena S.D. Mitochondrial calcium overload: a general mechanism for cell-necrosis in muscle diseases. *Lancet*, 1976, 1, 672-674.