

**UNIVERSITÉ PARIS XI
FACULTÉ DE MÉDECINE PARIS-SUD**

Année 2000

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI
Spécialité: Biophysique

présentée et soutenue publiquement

par

Tadej KOTNIK

le 20 octobre 2000

**Influence de la dynamique du champ électrique
sur l'efficacité de l'électroperméabilisation
de la membrane cellulaire**

CO-DIRECTEURS DE THESE: M. Lluis M. MIR
(Directeur de Recherche, CNRS, Villejuif, FRANCE)
M. Damijan MIKLAVČIČ
(Professeur, Université de Ljubljana, SLOVENIE)

JURY

M. François ESCHWEGE (Professeur, Université Paris XI, FRANCE)	Président
M. Eberhard NEUMANN (Professeur, Université de Bielefeld, ALLEMAGNE)	Rapporteur
M. Justin TEISSIÉ (Directeur de Recherche, CNRS, Toulouse, FRANCE)	Rapporteur
M. Tadej BAJD (Professeur, Université de Ljubljana, SLOVENIE)	Examineur
M. Boštjan ŽEKŠ (Professeur, Université de Ljubljana, SLOVENIE)	Examineur
M. Lluis M. MIR (Directeur de Recherche, CNRS, Villejuif, FRANCE)	
M. Damijan MIKLAVČIČ (Professeur, Université de Ljubljana, SLOVENIE)	

Remerciements

Je tiens à remercier tout particulièrement Monsieur Lluís Mir, Directeur de Recherche au CNRS, et Monsieur Damijan Miklavčič, Professeur à l'Université de Ljubljana, mes directeurs de thèse, pour leur encadrement scientifique, pour leurs encouragements constants, et pour les nombreuses discussions intéressantes que nous avons pu avoir. Monsieur Lluís Mir a aussi passé de longues heures en essayant de m'apprendre les subtilités de la langue et les coutumes des Français.

Le travail expérimental de ma thèse a été effectué au Laboratoire de Physicochimie et Pharmacologie des Macromolécules Biologiques (LPPMB), UMR 8532 de CNRS, à l'Institut Gustave-Roussy. Je remercie Monsieur le Professeur Christian Auclair et Monsieur le Professeur Alain Jacquemin-Sablon, pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire.

Je remercie Monsieur Eberhard Neumann, Professeur à l'Université de Bielefeld, et Monsieur Justin Teissié, Directeur de Recherche au CNRS, d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse, ainsi que Monsieur François Eschwege, Professeur à l'Université Paris XI, d'avoir accepté de présider le jury de ma thèse. J'exprime également toute ma gratitude à Messieurs Tadej Bajd et Boštjan Žekš, Professeurs à l'Université de Ljubljana, pour avoir accepté de participer à ce jury.

Je désire exprimer ma reconnaissance à Karel Flisar et Marko Puc, qui ont investi beaucoup de temps et mis à contribution leurs compétences pour le développement de l'amplificateur bipolaire de haut voltage, appareil sans lequel mes expériences n'auraient pas pu être effectuées.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude à Nawel Mahrouf et Halima Mekid pour leurs conseils, leur attention et leur amitié, qui m'ont aidé à oublier de temps en temps que je suis loin de chez moi.

Je tiens également à remercier Alenka Maček-Lebar et Guenhaël Le Bourhis, qui m'ont appris ce que sont les cellules et comment les traiter.

Je désire aussi exprimer mes remerciements au Ministère des Sciences de la République de Slovénie et aux fondations TEMPUS et CNOUS, qui ont soutenu financièrement mes séjours en France et mon travail de recherche en général.

Ces remerciements ne sauraient s'achever sans l'expression de ma reconnaissance pour mon Ordinateur, qui a été mon compagnon persévérant pendant tant de nuits, rarement pris d'une crampe, et ne m'abandonnant jamais dans l'embarras.

Table des matières

1. INTRODUCTION	7
1.1 Transport transmembranaire des cellules	7
1.2 Voltage transmembranaire	11
1.2.1 Voltage transmembranaire de repos	11
1.2.2 La théorie classique du voltage transmembranaire induit	13
1.2.2.1 La situation statique	14
1.2.2.2 La situation dynamique (le modèle de premier ordre)	16
1.3 Électroperméabilisation de la membrane cellulaire	18
1.3.1 Données expérimentales sur l'électroperméabilisation	18
1.3.1.1 Mesures de capacité et de conductivité électrique	18
1.3.1.2 Observations microscopiques	20
1.3.1.3 Mesures des propriétés optiques	23
1.3.1.4 Mesures de survie et d'internalisation	17
1.3.1.5 Sommaire des observations expérimentales	25
1.3.2 Tentatives d'explication théorique de l'électroperméabilisation	26
1.3.2.1 Le modèle hydrodynamique	28
1.3.2.2 Le modèle élastique	29
1.3.2.3 Le modèle hydroélastique	31
1.3.2.4 Le modèle viscohydroélastique	32
1.3.2.5 Le modèle de transition de phase	35
1.3.2.6 Le modèle de dénaturation	38
1.3.2.7 Le modèle de rupture aux interfaces des domaines lipidiques	39
1.3.2.8 Le modèle "standard" de l'électroporation	40
1.3.2.9 Révisions du modèle "standard" de l'électroporation	44
1.3.3 Traitement théorique du transport transmembranaire	47
1.3.3.1 Transport par diffusion	47
1.3.3.2 Transport par électrophorèse	50
1.3.3.3 Transport par osmose	51
2. RÉSULTATS THÉORIQUES: MODÈLES DU VOLTAGE TRANSMEMBRANAIRE INDUIT	53
2.1 Article 1: Sensibilité du voltage transmembranaire induit	54
2.2 Article 2: Cours de temps du voltage transmembranaire induit	65
2.3 Article 3: Le modèle de deuxième ordre du champ électrique membranaire induit par champs alternatifs	81
2.4 Article 4: Voltage transmembranaire induit sur des cellules sphéroïdales	91
3. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX: ÉLECTROPERMÉABILISATION PAR DIVERSES IMPULSIONS	103
3.1 Matériels et méthodes	104
3.1.1 Cellules	104
3.1.2 Exposition aux impulsions électriques	104
3.1.3 Détermination de la survie des cellules	105
3.1.4 Détermination de l'internalisation de molécules exogènes	105

3.1.5 <i>Article 5</i> : Évaluation de l'électroperméabilisation par un agent cytotoxique non perméant	106
3.1.6 Traitement statistique des données expérimentales	113
3.2 Résultats	113
3.2.1 Amplitude, durée, et nombre d'impulsions	113
3.2.2 Impulsions rectangulaires monophasiques et biphasiques	115
3.2.3 Temps de montée et temps de descente de l'impulsion	117
3.2.4 Forme de l'impulsion	117
4. DISCUSSION	119
4.1 Implications des calculs théoriques	119
4.1.1 Les rôles de la conductivité du milieu et de la durée d'impulsion	119
4.1.2 Le rôle de la forme de l'impulsion	120
4.1.2.1 Impulsions biphasiques	120
4.1.2.2 Impulsions rectangulaires modulées et impulsions "ultracourtes"	122
4.1.3 Le rôle de la forme des cellules	123
4.2 Résultats expérimentaux et leur liaison avec les fondements théoriques .	123
4.2.1 Le rôle de l'amplitude, de la durée, et du nombre d'impulsions	124
4.2.2 L'efficacité augmentée des impulsions biphasiques	125
4.2.3 Le rôle du temps de montée et du temps de descente des impulsions .	126
4.2.4 Le rôle de la forme d'impulsion en général	127
5. CONCLUSIONS	129
Références	133

CHAPITRE 1

Introduction

1.1 TRANSPORT TRANSMEMBRANAIRE DES CELLULES

Pour le transfert des molécules et des ions dans la cellule, quatre mécanismes distincts de transport transmembranaire peuvent être sollicités (Alberts et al., 1998):

- *Diffusion à travers la bicouche lipidique.* Tandis que la bicouche lipidique est fortement imperméable à tous les ions et les molécules chargées, les petites molécules non polaires, telles que l' O_2 (32 g/mol) et le CO_2 (44 g/mol), se dissolvent aisément dans la bicouche lipidique de la membrane et diffusent à travers elle. Les petites molécules polaires chargées, telles que l'eau (18 g/mol) et l'éthanol (46 g/mol), diffusent également à travers la bicouche, mais à une vitesse inférieure. Avec l'augmentation de la taille moléculaire, la vitesse de diffusion diminue rapidement, et pour le glucose (180 g/mol) la diffusion devient presque indétectable.

- *Canaux protéiques.* Ils forment des pores aqueux dans la bicouche lipidique, fournissant une voie pour la diffusion à travers la membrane des ions et, moins souvent, des petites molécules organiques (Fig. 1).

En majeure partie, les canaux protéiques sont sélectifs, permettant seulement le transport d'une seule substance de taille et de charge précises. Pour la plupart, ils s'ouvrent transitoirement en réponse à un stimulus spécifique, tel qu'un changement de pression ou de voltage transmembranaire, ou l'attachement d'un ligand. Le transport par les canaux protéiques est passif, car il ne peut se faire que vers la diminution du gradient électrochimique.¹

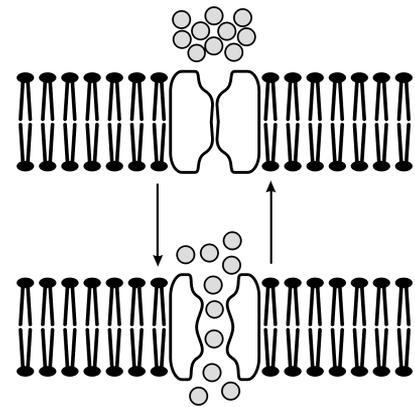


Figure 1

- *Transporteurs ou pompes protéiques.* Ceux-ci lient des ions ou de petites molécules organiques et les transfèrent à travers la membrane par changements conformationnels (Fig. 2). Ces changements exposent le site de liaison d'abord d'un côté de la

¹ Le gradient électrochimique est la force d'entraînement pour le transport des particules dissoutes chargées, et il est composée de deux forces d'entraînement - une occasionnée par le gradient du potentiel électrique et l'autre par le gradient de concentration à travers la membrane. Pour des particules dissoutes non chargées, le gradient électrochimique est identique au gradient de concentration.

membrane et ensuite de l'autre, grâce à l'énergie fournie par l'hydrolyse de ATP. Comme les canaux protéiques, les pompes protéiques sont également très spécifiques, attachant une seule molécule de taille et de charge précises. Cependant, à la différence des canaux protéiques, les pompes exigent un apport d'énergie pour remplir leur fonction, et ceci leur permet de transférer les ions et les molécules dans la direction de l'augmentation (transport actif) aussi bien que dans la direction de la diminution du gradient électrochimique (transport passif).

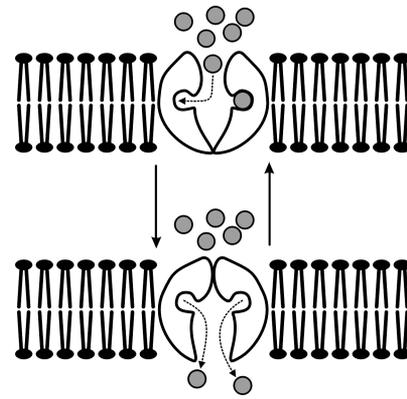


Figure 2

- *Endocytose.* Les cellules ingèrent du fluide, des molécules, et parfois même des complexes multimoléculaires par endocytose, dans lequel des régions de la membrane s'invaginent pour former des vésicules d'endocytose (Fig. 3; en haut est le milieu extracellulaire, et en bas l'intérieur de la cellule).

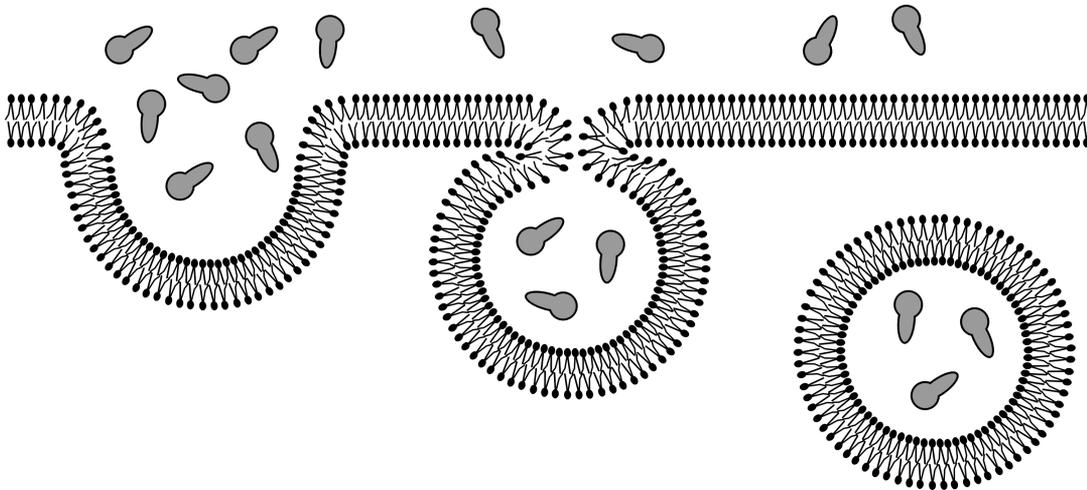


Figure 3

Pour chaque substance naturelle nécessaire à la cellule, il y a un mécanisme spécifique de transport dans au moins une des quatre classes données ci-dessus. Les petites molécules non chargées d'origine artificielle peuvent aussi entrer dans la cellule par diffusion. Par contre, aucun des trois des autres mécanismes du transport n'est conçu pour les substances artificielles ou les molécules physiologiques qui ne sont pas transportées naturellement à travers la membrane. Certaines de ces substances étrangères peuvent encore employer un de ces mécanismes à cause de la similitude structurale avec des molécules physiologiques, mais beaucoup d'autres ne peuvent pas employer ces voies. Pour cette raison, l'entrée dans la cellule des nombreuses molécules étrangères, telles que les agents antitumoraux, les substances immunoactives, et l'ADN se produit très lentement, ou pas du tout. Ceci représente un obstacle significatif pour la

chimiothérapie, immunothérapie et thérapie génique, et aussi pour la recherche fondamentale en biologie moléculaire.

Pour surmonter cet obstacle, plusieurs méthodes visant à perméabiliser la membrane de manière artificielle sont employées:

- *Microinjection et perméabilisation balistique.* La méthode de microinjection, qui a été employée pendant plusieurs décennies, utilise une aiguille très fine pour percer la membrane et injecter les molécules exogènes dans le cytoplasme. Pour la perméabilisation balistique, les molécules exogènes sont fixées à des microsphères d'or, et puis cette suspension est accélérée et dirigée vers la cellule, perçant la membrane par la pression qu'elle exerce. Cette méthode a trouvé son application en génétique, où on la connaît sous le nom de la méthode du "gene gun" (Fynan et al., 1993; Mahvi et al., 1997; Lin et al., 2000). La microinjection et la perméabilisation balistique ont comme avantage de permettre d'obtenir une haute fraction de cellules perméabilisées, accompagné d'une fraction relativement basse de cellules qui ne survivent pas à l'exposition. Par contre, le grande désavantage de ces méthodes réside dans le fait qu'elles ne soient applicable qu'à un niveau unicellulaire. Par conséquent, ni l'une ni l'autre de ces techniques ne peuvent être employées pour la perméabilisation d'une grande population (par exemple, quelques millions) des cellules, ce qui est souvent crucial dans des applications cliniques et dans la recherche expérimentale.
- *Perméabilisation chimique.* Pour cette méthode, les cellules sont en suspension dans une solution contenant les molécules exogènes et un produit chimique qui perturbe la membrane, habituellement un détergent (Bonnafous et al., 1982; Privalle et Burris, 1983). Pour arrêter la dégradation chimique de la membrane, les cellules doivent être lavées rapidement après l'exposition, ce qui introduit nécessairement des dommages mécaniques additionnels. Ces dernières années, on a proposé diverses modifications de cette méthode pour lesquelles une enzyme (Lemons et al., 1988) ou un antibiotique (Boyle et Lieberman, 1999; Suttitanamongkol et al., 2000) est employé à la place d'un détergent. Ces molécules agissent moins vigoureusement que les détergents, et perturbent la membrane de façon limitée.
- *Perméabilisation électrique.* Dans cette méthode, souvent nommée *l'électroperméabilisation*, ou *l'électroporation*, des impulsions électriques courtes et intenses sont appliquées aux cellules, en suspension ou dans les tissus, induisant un état passager de très grande perméabilité de la membrane, permettant aux molécules exogènes d'entrer dans la cellule (Neumann et Rosenheck, 1972). Cette méthode élimine les deux inconvénients trouvés dans les méthodes décrites ci-dessus — elle permet le traitement d'une grande population de cellules (tissus entiers y compris), et en même temps elle n'exige aucun traitement spécial après l'exposition. Pour rendre possible le rétablissement de l'état non perméabilisé, il suffit de cesser l'exposition aux impulsions électriques. Avec un choix approprié des paramètres (du nombre

d'impulsions et de leur amplitude, durée, fréquence de répétition, et forme), une haute fraction de cellules perméabilisées et une faible fraction de cellules mortes peuvent être obtenues. En raison de ses avantages, l'électroperméabilisation a rapidement trouvé ses applications dans le transfert de gènes (Wong et Neumann, 1982), dans la préparation des anticorps monoclonaux (Lo et al., 1984), et dans l'électrochimiothérapie antitumorale (Okino et Mohri, 1987; Mir et al., 1991). De nos jours, c'est une méthode largement établie employée en oncologie, en thérapie génique, et en plusieurs domaines de la biologie moléculaire.

L'électroperméabilisation, ses mécanismes, son application, et son amélioration représentent le but principal de cette thèse, et ainsi elle sera traitée plus en détails dans les sections qui suivent.

- *Perméabilisation ultrasonique.* Dans cette approche, la membrane est perméabilisée par ultrasons (Bao et al., 1997; Liu et al., 1998). Comme pour l'électroperméabilisation, avec un choix approprié de l'intensité, de la fréquence, et de la durée de l'exposition, l'effet est réversible. Vu que la perméabilisation aux ultrasons n'exige aucun traitement ultérieur et peut opérer sur de grandes populations de cellules, c'est un concurrent potentiel à l'électroperméabilisation. Cependant, par rapport à l'électroperméabilisation, relativement peu d'études employant la perméabilisation ultrasonique ont été publiées jusqu'ici, et il est trop tôt pour envisager l'importance future de cette méthode.
- *Perméabilisation par haute pression.* L'exposition à des impulsions de haute pression d'une durée de l'ordre de la microseconde a été également utilisée pour induire un état perméabilisé de la membrane (Delius et Adams, 1999). Un choix approprié de l'intensité et de la durée du choc mène à un effet réversible, aucun traitement ultérieur n'est nécessaire, et de grandes populations de cellules peuvent être traitées. A nouveau, comme la perméabilisation ultrasonique, cette méthode a été employée dans un nombre restreint d'études, et son intérêt sera mieux envisagé à l'avenir.
- *Perméabilisation par laser.* La membrane peut également être transitoirement perméabilisée en focalisant un rayon laser étroit sur la cellule (Montag et al., 2000). La perméabilisation par laser ne nécessite pas d'être suivie d'un traitement spécial, mais à l'aide d'un laser on ne peut traiter les cellules que une après l'autre, et ceci limite son utilisation pour les études comportant de grandes populations cellulaires.

Pratiquement toutes les applications cliniques (i.e., applications sur des tissus et des organes du corps) et un grand nombre d'applications expérimentales exigent (i) une perméabilisation réversible avec un rendement relativement élevé des cellules perméabilisées qui survivent au traitement, (ii) une récupération de l'état initial, non perméabilisé de la membrane, et (iii) une efficacité sur de grandes populations de cellules. Comme la liste ci-dessus le montre, parmi les méthodes qui répondent à ces exigences seule l'électroperméabilisation est une méthode établie, alors que dans un

proche avenir ce statut pourrait également être atteint par la perméabilisation ultrasonique et par la perméabilisation par haute pression.

Dans la dernière décennie, les rôles de l'amplitude, la durée, et le nombre d'impulsions dans l'obtention d'une électroperméabilisation efficace ont été étudiés intensivement dans les suspensions cellulaires aussi bien que dans les tissus. D'autre part, la gamme des générateurs disponibles pour obtenir des impulsions courtes de haut voltage a limité les études aux impulsions exponentielles et rectangulaires, et le rôle de la forme de l'impulsion n'a pas été étudié.

Le but de ce travail de recherche est d'étudier les possibilités d'amélioration de l'électroperméabilisation par détermination des formes de l'impulsion plus efficaces, avec une analyse limitée à la situation *in vitro*, i.e., aux études sur des suspensions cellulaires. Tandis qu'à partir du deuxième chapitre le texte est consacré à décrire la poursuite de ce but, ce chapitre d'introduction est dévolu à l'explication des mécanismes qui sont à la base de l'électroperméabilisation, aussi bien qu'à l'élucidation de la terminologie qui l'entoure.

1.2 VOLTAGE TRANSMEMBRANAIRE

L'exposition d'une cellule à un champ électrique peut produire une variété de réponses physiques et chimiques. La plupart de ces réponses sont basées sur la modification du voltage transmembranaire produit par le champ électrique appliqué (Robinson, 1985; Marszalek et al., 1990; Tsong, 1991; Krassowska et Neu, 1994). Alors que le voltage transmembranaire de repos est présent sur la membrane cellulaire à tout moment, l'exposition de la cellule à un champ électrique introduit une composante additionnelle: le voltage transmembranaire induit, qui se superpose au voltage de repos. En raison de la composante induite, le voltage transmembranaire en totalité devient dépendant de la position sur la membrane, et dans certains régions de la membrane il peut dépasser sa gamme physiologique de manière significative. Les paragraphes suivants exposent en détails les deux composantes du voltage transmembranaire.

1.2.1 Voltage transmembranaire de repos

Dans les conditions physiologiques, un voltage entre -90 mV et -40 mV est toujours présent sur la membrane cellulaire¹ (Cole, 1972; Atwood et Mackay, 1989). Ce voltage est produit par un petit déficit en ions positifs dans le cytoplasme par rapport aux ions négatifs, qui est une conséquence du transport spécifique d'ions à travers la membrane. Les acteurs les plus importants dans ce transport sont (i) les pompes Na^+/K^+ , qui exportent des ions Na^+ hors de la cellule et importent simultanément des ions K^+ dans la

¹ En utilisant la convention établie (Cole, 1972), le voltage transmembranaire est défini comme le potentiel électrique sur la surface interne de la membrane auquel on retire le potentiel électrique sur la surface externe de la membrane. Le signe négatif indique ainsi que l'intérieur de la cellule est à un potentiel inférieur que l'extérieur de la cellule.

cellule, et (ii) les canaux de fuite de K^+ , par lesquels les ions K^+ peuvent passer à travers la membrane dans les deux directions. Les pompes Na^+/K^+ produisent un fort gradient de concentration de K^+ , et poussés par ce gradient, les ions K^+ commencent à sortir de la cellule par les canaux de fuite de K^+ . Cependant, ce transfert crée une charge négative non équilibrée dans le cytoplasme, produisant un voltage transmembranaire qui se oppose à la sortie des ions K^+ . En quelques millisecondes, ce voltage atteint une valeur assez grande pour arrêter la sortie, et un état d'équilibre est obtenu. Comme l'exemple dans l'Insert 1 le démontre, pour des valeurs physiologiques de voltage de repos, les ions non équilibrés représentent une fraction très faible de tous les ions, et la différence de pression osmotique produite par ce déséquilibre est ainsi insignifiante.

Supposant que seulement les ions Na^+ et K^+ participent à la génération du voltage transmembranaire de repos, sa valeur à l'état d'équilibre est obtenue par un calcul relativement simple (Goldman, 1943; Hodgkin et Katz, 1949). Les détails sont donnés dans l'Insert 2, et le résultat final, qui est désigné souvent sous le nom de *l'équation de Goldman* (ou de *Goldman-Hodgkin-Katz*), est

$$U_{TR} = \frac{R_T T}{F} \cdot \ln \frac{q[Na^+]_e + [K^+]_e}{q[Na^+]_i + [K^+]_i},$$

où R_T représente la constante de gaz, T la température absolue, F la constante de Faraday, q le rapport des permeabilités de membrane pour le Na^+ et le K^+ , et $[Na^+]_e$, $[K^+]_e$, $[Na^+]_i$ et $[K^+]_i$ représentent respectivement les concentrations de Na^+ et K^+ dans le milieu extracellulaire et dans le cytoplasme.

Insert 1: Le déséquilibre d'ions et le voltage transmembranaire de repos

Une cellule typique avec un rayon $R = 10 \mu\text{m}$ et une épaisseur de membrane $d = 5 \text{ nm}$ a une aire S et un volume V

$$S = 4\pi R^2 \approx 1.3 \times 10^{-9} \text{ m}^2, \quad V = \frac{4\pi R^3}{3} \approx 4.2 \times 10^{-15} \text{ m}^3.$$

Compte tenu de la valeur de la constante diélectrique relative de la membrane, $\epsilon_{mr} \approx 5$ (Gascoyne et al., 1993), on obtient

$$C_m = \frac{\epsilon_m \epsilon_0 S}{d} = 1.1 \times 10^{-11} \text{ F},$$

pour la capacité de la membrane, où $\epsilon_0 \approx 8.85 \times 10^{-12} \text{ As/(Vm)}$ est la constante diélectrique du vide.

Un voltage transmembranaire de repos $U_{TR} = -60 \text{ mV}$ correspond alors à une charge nette sur la membrane de

$$Q = U_{TR} C_m = 6.7 \times 10^{-13} \text{ As},$$

qui, pour les ions monovalents, est équivalente à un déséquilibre de

$$\frac{6.7 \times 10^{-13} \text{ As}}{1.6 \times 10^{-19} \text{ As/ion}} \approx 4.2 \times 10^6 \text{ ions}.$$

Dans le cytoplasme la concentration ionique totale est $\approx 0,26 \text{ mol/l} = 1.6 \times 10^{26} \text{ ions/m}^3$, et il contient donc

$$1.6 \times 10^{26} \text{ ions/m}^3 \cdot 4.2 \times 10^{-15} \text{ m}^3 \approx 6.7 \times 10^{11} \text{ ions}.$$

Ainsi le cytoplasme contient moins de sept ions non équilibrés pour chaque million d'ions.

Insert 2: L'équation de Goldman

On analyse la situation représentée schématiquement sur la figure de droite, où la concentration $[S]$ des ions S et le potentiel électrique Ψ sont dépendants de la position sur la membrane. Le flux J_S est ainsi conduit par la combinaison de la force électrique due au gradient de potentiel électrique et de la force diffusive due au gradient de concentration,

$$J_S = -D_S \frac{d[S]}{dx} - \frac{Z_S F}{R_T T} D_S [S] \frac{d\Psi}{dx},$$

où D_S est le coefficient de diffusion pour les ions S, F est la constante de Faraday (9.684×10^4 As), R_T la constante de gaz ($8.314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T la température absolue de la solution, et Z_S est la valence des ions S. Pour simplifier, on introduit

$$k = \frac{Z_S F}{R_T T},$$

et en multipliant l'expression de J_S par $e^{k\Psi}$, on a

$$J_S e^{k\Psi} = -D_S \left(e^{k\Psi} \frac{d[S]}{dx} + k e^{k\Psi} [S] \frac{d\Psi}{dx} \right) = -D_S \frac{d}{dx} ([S] e^{k\Psi}).$$

L'intégration à travers la membrane donne alors

$$J_S \int_0^d e^{k\Psi} dx = -D_S \int_0^d \left(\frac{d}{dx} ([S] e^{k\Psi}) \right) dx = D_S ([S] e^{k\Psi} \Big|_{x=0} - [S] e^{k\Psi} \Big|_{x=d})$$

Le potentiel nul peut être placé arbitrairement, et on choisit $\Psi_e = 0$. Ainsi $\Psi_i = U_{TR}$ (le voltage de repos), et

$$J_S \int_0^d e^{k\Psi} dx = D_S ([S]_i e^{kU_{TR}} - [S]_e).$$

On définit maintenant la perméabilité diffusive de la membrane pour les ions S par $P_S = D_S/d$, et on dénote

$$f(\Psi) = \frac{d}{\int_0^d e^{k\Psi} dx}.$$

Par conséquent

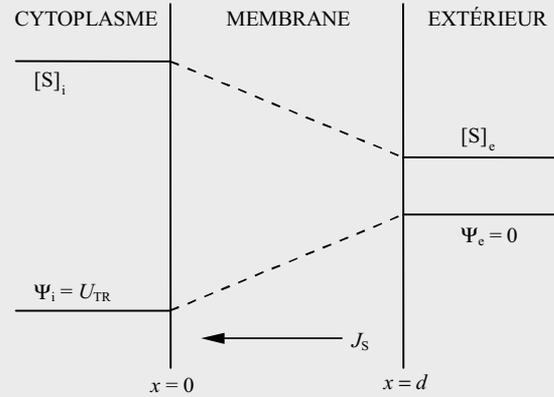
$$J_S = f(\Psi) P_S ([S]_i e^{kU_{TR}} - [S]_e).$$

Dans l'état d'équilibre, le courant ionique total est nul, et par conséquent la connaissance de la fonction $f(\Psi)$ n'est pas nécessaire pour la détermination d' U_{TR} . Considérant les deux ions les plus importants, K^+ et Na^+ , on a $J_{Na} + J_K = 0$, et

$$P_{Na} ([Na^+]_i e^{kU_{TR}} - [Na^+]_e) + P_K ([K^+]_i e^{kU_{TR}} - [K^+]_e) = 0$$

Réintroduisant k , appliquant $Z_K = Z_{Na} = 1$ et indiquant $q = P_{Na}/P_K$, on obtient finalement

$$U_{TR} = \frac{R_T T}{F} \cdot \ln \frac{q [Na^+]_e + [K^+]_e}{q [Na^+]_i + [K^+]_i}$$

**1.2.2 La théorie classique du voltage transmembranaire induit**

L'exposition d'une cellule à un champ électrique mène à une déformation locale du champ dans la cellule et à sa proximité. Comme la conductivité de la membrane cellulaire est inférieure à celles du cytoplasme et du milieu extracellulaire physiologique de plusieurs ordres de grandeur, le champ électrique dans la membrane est supérieur à

celui dans le cytoplasme de plusieurs ordres de grandeur. Après qu'un champ constant commence à agir sur la cellule (i.e., après que le champ soit établi, ou après que la cellule soit placée dans le champ), le voltage transmembranaire induit atteint l'état d'équilibre en quelques microsecondes après le début de l'exposition, avec une concordance très bonne entre les prévisions théoriques (Grosse et Schwan, 1992) et les résultats expérimentaux (Hibino et al., 1993; voir également la Section 1.3.1). Le voltage transmembranaire induit est dépendant de la position sur la membrane, et comme il se superpose au voltage de repos, le voltage transmembranaire total devient aussi dépendant de la position sur la membrane.

La théorie classique de l'induction du voltage transmembranaire est fondée sur plusieurs hypothèses qui permettent de faire des calculs plus simples et d'obtenir des résultats plus clairs. Néanmoins, cette approche limite en même temps la validité de la théorie classique aux conditions dans lesquelles les hypothèses présupposées sont vérifiées. Par exemple, le voltage transmembranaire induit par des champs alternatifs est décrite très exactement par la théorie classique (Section 1.2.2.2) pour des fréquences jusqu'à plusieurs MHz. Cependant, à des fréquences plus élevées les prévisions de la théorie classique deviennent progressivement moins précises, et dans la gamme du GHz elles ne sont plus valables. En outre, cette théorie ne fournit pas les outils de la détermination du cours du temps du voltage transmembranaire induit par divers champs non sinusoïdaux, tels que des impulsions exponentielles. Finalement, la théorie classique a été seulement développée pour les cellules sphériques, et elle est ainsi applicable uniquement aux cellules avec une forme similaire à une sphère. Ceci est applicable pour la majorité de cellules en suspension, mais ce n'est clairement pas le cas pour les érythrocytes ou les bacilles.

Alors que les deux sous-sections qui suivent récapitulent les résultats de la théorie classique, le Chapitre 2 de cette thèse est consacré à la dérivation des outils analytiques qui peuvent être utilisés dans les situations décrites ci-dessus, où la théorie classique échoue.

1.2.2.1 La situation statique

En raison de la rapidité relative de l'induction du voltage transmembranaire, il est souvent acceptable de négliger l'état transitoire qui a lieu pendant ce processus, et de considérer seulement l'état d'équilibre qui est atteint ensuite. La description analytique du voltage transmembranaire induit établi pour les cellules sphériques a été dérivée il y a plus de quatre décennies (Schwan, 1957). Pour simplifier la dérivation, H. P. Schwan a considéré que la membrane est non conductive, ce qui a mené à la relation bien connue, souvent désignée sous le nom de *l'équation statique de Schwan*,

$$U_{\text{TI}} = \frac{3}{2} ER \cos \varphi,$$

où U_{TI} représente le voltage transmembranaire induit, E le champ électrique extérieur, R le rayon de la cellule, et φ l'angle polaire mesuré à partir du centre de la cellule par

rapport à la direction du champ. Un abrégé de la dérivation de l'équation statique de Schwan est donné dans l'Insert 3, alors qu'un traité détaillé peut être trouvé dans l'annexe d'article contenu dans la Section 2.1.4.

Insert 3: L'équation statique de Schwan

La cellule est modélisée par une sphère (le cytoplasme) entourée par une couche concentrique (la membrane) positionnée avec son centre à l'origine du système de coordonnées sphériques $\{(r, \varphi, \vartheta): x = r \cos \varphi, y = r \sin \varphi \cos \vartheta, z = r \sin \varphi \sin \vartheta\}$, et on orientera l'axe des x dans la direction du champ électrique. On décrit la distribution spatiale du potentiel électrique Ψ au moyen de l'équation de Laplace

$$\frac{1}{r^2} \left(\frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial \Psi}{\partial r} \right) + \frac{1}{\sin \varphi} \frac{\partial}{\partial \varphi} \left(\sin \varphi \frac{\partial \Psi}{\partial \varphi} \right) \right) = 0.$$

En utilisant la séparation des variables, on obtient la solution

$$\Psi(r, \varphi) = \sum_{n=0}^{\infty} A r^n P_n(\cos \varphi) + B \frac{P_n(\cos \varphi)}{r^{n+1}},$$

où P_n représente le n -ième polynôme de Legendre, et A, B sont des constantes.

Loin de la cellule, le potentiel est une fonction linéaire de r . Ceci donne $n = 1$ et

$$\Psi(r, \varphi) = A r \cos \varphi + B \frac{\cos \varphi}{r^2}.$$

Pour le cytoplasme, la membrane, et l'extérieur de la cellule, on peut ainsi décrire le potentiel électrique par une expression de cette forme. Désignant par R le rayon de la cellule, et par d l'épaisseur de la membrane, on a

$$\Psi(r, \varphi) = \begin{cases} \Psi_i(r, \varphi) = A_i r \cos \varphi + B_i \frac{\cos \varphi}{r^2}; & 0 \leq r \leq R-d \\ \Psi_m(r, \varphi) = A_m r \cos \varphi + B_m \frac{\cos \varphi}{r^2}; & R-d \leq r \leq R \\ \Psi_e(r, \varphi) = A_e r \cos \varphi + B_e \frac{\cos \varphi}{r^2}; & R \leq r \end{cases}$$

Postulant que la membrane est non conductive, les conditions aux limites sont alors:

(a) homogénéité du champ électrique loin de la cellule (représentant par E l'intensité du champ homogène),

$$\left| \lim_{r \rightarrow \infty} \frac{d\Psi}{dr} \right| = -E;$$

(b) le caractère fini du potentiel électrique à l'intérieur de la cellule,

$$\lim_{r \rightarrow 0} \Psi < \infty;$$

(c) continuité du potentiel électrique et absence de courant électrique sur les surfaces de la membrane,

$$\begin{aligned} (\Psi_i - \Psi_m)|_{r=R-d} &= 0, & \sigma_i \frac{d\Psi_i}{dr} \Big|_{r=R-d} &= 0, \\ (\Psi_m - \Psi_e)|_{r=R} &= 0, & \sigma_e \frac{d\Psi_e}{dr} \Big|_{r=R} &= 0. \end{aligned}$$

L'application de ces conditions à $\Psi(r, \varphi)$ donne

$$A_i = 0, \quad B_i = 0, \quad A_m = -\frac{3ER^3}{2R^3 - 2(R-d)^3}, \quad B_m = -\frac{3ER^3(R-d)^3}{2R^3 - 2(R-d)^3}, \quad A_e = -E, \quad B_e = -\frac{ER^3}{2}.$$

Le voltage transmembranaire induit peut maintenant être calculé par

$$U_{\text{TI}} = \Psi_i|_{r=R-d} - \Psi_e|_{r=R}$$

(voir la première note en bas de la page dans la Section 1.2.1), et on obtient ainsi

$$U_{\text{TI}} = 0 - \left(-ER \cos \varphi - \frac{ER^3 \cos \varphi}{2R^2} \right) = \frac{3}{2} ER \cos \varphi.$$

Appliquées aux cellules sphériques, dans des conditions physiologiques et avec des champs électriques qui maintiennent leur valeur pendant des millisecondes ou plus, les prévisions de l'équation statique de Schwan servent d'évaluations très précises du voltage transmembranaire induit.² D'autre part, les variations de la forme des cellules par rapport à la sphère idéale peuvent mener à des divergences importantes de l' U_{TI} réel par rapport à l' U_{TI} prévu par l'équation de Schwan (Section 2.1.4).

1.2.2.2 La situation dynamique (le modèle de premier ordre)

L'analyse statique présentée ci-dessus ne fournit aucune information au sujet de la dynamique qui caractérise le processus d'induction du voltage transmembranaire. En fait, l'hypothèse concernant les propriétés purement conductrices de tous les matériaux (comme dans l'Insert 3) conduit à un processus d'induction instantané, qui ne peut certainement être qu'une approximation de la situation réelle. Faisant une étape de plus vers la réalité, H. Pauly et H. P. Schwan ont attribué à la membrane une conductivité électrique différente de zéro et une constante diélectrique différente de zéro, traitant toujours le cytoplasme et le milieu externe comme des conducteurs purs (Fig. 4). De cette façon ils ont obtenu l'équation de premier ordre de Schwan qui décrit le cours du temps du voltage transmembranaire induit par un champ électrique constant (Pauly et Schwan, 1959)

$$U_{TI} = \frac{3}{2} ER \cos \varphi \left[1 - e^{-t/\tau_m} \right],$$

où τ_m est la constante de temps de la membrane, donnée par

$$\tau_m = \frac{R \epsilon_m}{2d \frac{\sigma_i \sigma_e}{\sigma_i + 2\sigma_e} + R\sigma_m}$$

avec σ_i , σ_m et σ_e représentant respectivement les conductivités du cytoplasme, de la membrane cellulaire, et du milieu extracellulaire, R le rayon de la cellule, d l'épaisseur de la membrane, et ϵ_m la constante diélectrique de la membrane. Il est facile de voir que, quand le temps écoulé dépasse le τ_m de manière significative, le résultat obtenu par l'équation de premier ordre de Schwan approche la valeur prévue par l'équation statique de Schwan.

La dérivation de l'équation de premier ordre de Schwan ne sera pas présentée ici, car elle est contenue en détail dans la Section 2.1.3 qui donne également une description plus précise dans laquelle tous les matériaux ont des conductivités électriques et des

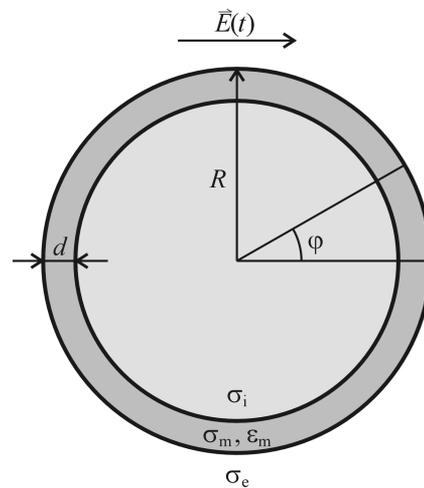


Figure 4

² C'est à dire, les prévisions de l'équation statique de Schwan ne diffèrent jamais par plus que quelques parties pour mille par rapport à la formule qui tient compte de la conductivité de membrane (Section 2.1.1).

constantes diélectriques différentes de zéro. En raison de la nature de premier ordre du processus d'induction comme il est décrit par les formules données ci-dessus, on peut également décrire le voltage transmembranaire induit par un champ alternatif de la fréquence ν au moyen de la constante de temps τ_m . Dans un plan complexe, ceci est formulé comme *l'équation alternative de Schwan* (Grosse et Schwan, 1992),

$$U_{TI}(\nu) = \frac{3}{2} ER \cos \varphi \frac{1}{1 + j2\pi\nu\tau_m}.$$

La valeur absolue d' U_{TI} équivaut à son amplitude, et l'argument d' U_{TI} correspond au déphasage entre U_{TI} et E (cette valeur est toujours négative, impliquant un retard d' U_{TI} par rapport à E).

Introduisant les valeurs typiques des paramètres (voir le Tableau 1 dans la Section 1.3.2) dans les expressions données ci-dessus, on obtient une valeur de $\tau_m \approx 0.33 \mu\text{s}$. En conséquence on peut tracer le cours du temps du voltage transmembranaire induit par l'application d'un champ électrique constant (Fig. 5), et aussi l'amplitude du voltage transmembranaire induit par un champ alternatif en fonction de la fréquence du champ (Fig. 6).³

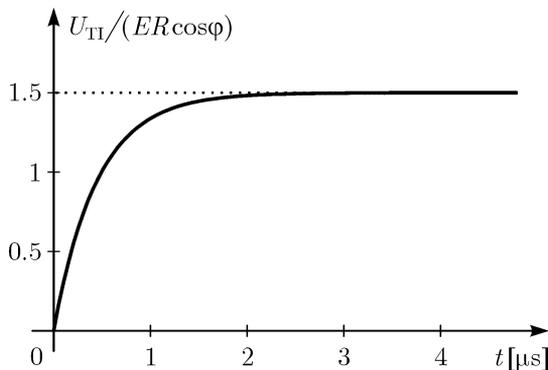


Figure 5

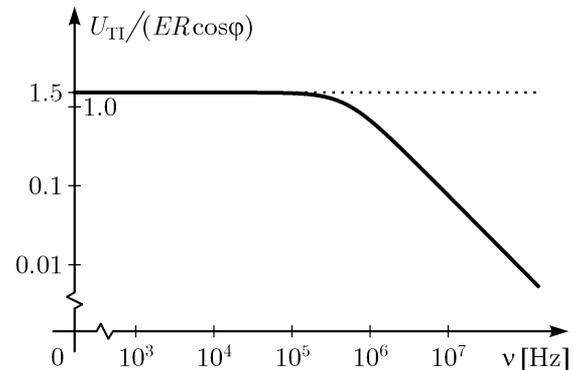


Figure 6

En résumé, dans les conditions physiologiques, l'équation statique de Schwan est bien adaptée pour la description du voltage transmembranaire induit par des champs constants qui durent plus que plusieurs microsecondes, et par les champs alternatifs ayant des fréquences allant jusqu'aux centaines de kHz.⁴ Pour élargir cette gamme, la théorie classique fournit l'équation de premier ordre de Schwan qui peut être appliquée pour des impulsions rectangulaires d'une durée aussi courte que quelques dizaines de nanosecondes, et l'équation alternative de Schwan, qui prolonge l'analyse des effets des champs alternatifs jusqu'aux dizaines de MHz. Cependant, alors que l'équation de premier ordre de Schwan est ainsi applicable à la plupart des impulsions rectangulaires

³ Il faut noter que le graphique de la Fig. 5 est tracé sur une échelle linéaire, alors que l'échelle du graphique de la Fig. 6 est logarithmique.

⁴ Comme il est discuté en détail dans la Section 2.1.1, ces limites deviennent considérablement plus étroites dans certaines conditions non physiologiques, telles que l'utilisation d'un milieu extracellulaire artificiel avec une conductivité électrique considérablement inférieure.

disponibles avec la technologie courante, les champs alternatifs atteignent de nos jours des fréquences de l'ordre de quelques GHz, pour lesquelles l'équation alternative de Schwan n'est plus satisfaisante. La limite supérieure des fréquences pour lesquelles les études théoriques sont valables peut être augmentée en attribuant des conductivités électriques et des constantes diélectriques différentes de zéro à tous les matériaux, et les Sections 2.1.2 et 2.1.3 discutent ceci plus en détails.

1.3 ÉLECTROPERMÉABILISATION DE LA MEMBRANE CELLULAIRE

Cette section décrit les connaissances existantes sur l'électroperméabilisation. L'évidence expérimentale est passée en revue dans la Section 1.3.1, les tentatives d'explication théorique sont considérées dans la Section 1.3.2, et le traitement théorique du transport transmembranaire qui accompagne l'électroperméabilisation est le sujet de la Section 1.3.3.

1.3.1 Données expérimentales sur l'électroperméabilisation

Le rapport le plus tôt sur la rupture électrique réversible de la membrane remonte aux années 50 (Stämpfli, 1958), mais pendant longtemps cette publication est restée à peu près inaperçue. Presque une décennie plus tard, Sale et Hamilton ont rendu compte de la destruction électrique athermique des microorganismes en utilisant des impulsions électriques de forte intensité (Sale et Hamilton, 1967; Hamilton et Sale, 1967; Sale et Hamilton, 1968). Après cinq années supplémentaires, Neumann et Rosenheck ont prouvé que les impulsions électriques induisent une grande augmentation de perméabilité de la membrane des vésicules normales (Neumann et Rosenheck, 1972). Ce rapport peut être considéré comme une frontière, car il a motivé une série d'autres investigations, et depuis ce moment-là les données ont commencé à s'accumuler plus rapidement et systématiquement. Nous passons maintenant en revue des techniques différentes de recherche, essayant de suivre l'écoulement temporel des investigations expérimentales.

1.3.1.1 Mesures de capacité et de conductivité électrique

Les premières investigations systématiques sur l'électroperméabilisation ont été basées sur l'analyse des changements des propriétés électriques de la membrane provoqués par l'exposition aux impulsions électriques. Ces études peuvent être subdivisées en mesures de capacité et de conductivité électrique de la membrane.

La première description rapportée du changement de la capacité de la membrane induit par l'exposition aux impulsions électriques (Babakov et Ermishkin, 1966) a précédé le papier de Neumann et Rosenheck, alors que deux autres études étaient publiées peu après (Wobshall, 1972; Benz et Janko, 1976). Dans ces expériences, exécutées sur des bicouches lipidiques planes pures, à un voltage de 0.3 V, une rupture irréversible de la

membrane s'est produite avec un retard d'environ une seconde, alors qu'à des voltages plus élevés, le temps écoulé avant la rupture diminuait rapidement. Il a été déterminé que le changement de la capacité membranaire du début de l'impulsion jusqu'à la rupture était de moins de 1 %, mais une mesure plus précise ne pouvait pas être effectuée à cause de la sensibilité insuffisante de l'équipement. Une étude ultérieure a indiqué que la capacité membranaire avant la rupture déroule en deux phases distinctes (Alvarez et Latorre, 1978). Pendant la première phase qui dure quelques microsecondes, la capacité augmente presque proportionnellement au carré du voltage, avec une augmentation de 2 % à un voltage de 0.3 V, et de 1 % à 0.8 V. Durant la seconde phase, la capacité se stabilise jusqu'à la rupture, qui se produit aux voltages au-dessus de 0.3 V. Lorsque le voltage augmente, le temps écoulé avant la rupture se réduit de quelques centaines de millisecondes à 0.3 V jusqu'à quelques dizaines de millisecondes à 0.8 V.

Les mesures de capacité de la membrane ont ainsi indiqué que la rupture irréversible se produit entre quelques dizaines et quelques centaines de millisecondes, et pour des voltages transmembranaires au-dessus de $\approx 0,3$ V. Il a été démontré que le temps écoulé avant la rupture de la membrane et le voltage minimum menant à la rupture sont stochastiques (i.e., chaque fois que l'expérience est répétée, différentes valeurs de ces paramètres sont trouvées). La petite modification de la capacité implique aussi que la compression de la membrane avant la rupture soit très limitée, et offre ainsi un argument fort contre l'explication hypothétique de l'électroperméabilisation par l'électrocompression globale de la membrane (voir la Section 1.3.2.2).

Des mesures de conductivité électrique ont été effectuées sur des bicouches lipidiques pures (Abidor et al., 1979; Benz et al, 1979; Benz et Zimmermann, 1980a; Benz et Zimmermann, 1980b; Benz et Zimmermann, 1981) ainsi que sur des membranes cellulaires (Kinosita et Tsong, 1979; Benz et Zimmermann, 1980a; Benz et Conti, 1981; Chernomordik et al., 1982). Ces expériences ont prouvé que quelques microsecondes après le début d'une impulsion électrique de voltage suffisant, la conductivité de la membrane est augmentée d'un facteur 10^3 à 10^6 . En fonction des paramètres de l'impulsion et des conditions expérimentales spécifiques, l'effet est réversible (la membrane récupère son intégrité après la fin de l'exposition) ou irréversible.¹ Les études sur les membranes cellulaires ont également indiqué que la majeure partie de l'augmentation est localisée au niveau des régions lipidiques, ce qui a stimulé l'intérêt pour l'étude des bicouches lipidiques dans l'élucidation des mécanismes moléculaires de l'électroperméabilisation.

Abidor et ses collaborateurs ont montré qu'avant la rupture, la membrane traverse deux états distincts de conductivité (Abidor et al., 1979). Au début de l'impulsion commence l'état de courant stable, dans lequel un voltage transmembranaire de 0.4–0.5 V produit à

¹ Ces premiers articles ont employé les termes *rupture réversible* et *rupture irréversible*. Aujourd'hui, le terme *rupture* (angl. breakdown) est habituellement appliquée au phénomène irréversible, alors que l'effet réversible est désigné sous le nom de *électroperméabilisation* (ou, par les avocats du modèle de la formation des pores aqueux — voir la Section 1.3.2.8 — sous le nom de *électroporation*).

travers la membrane un courant électrique d'une densité de l'ordre de 1 A/m^2 . En quelques microsecondes l'état de courant fluctuant est atteint, durant lequel la densité de courant électrique monte jusqu'à 10^4 A/m^2 , avec une amplitude qui oscille considérablement. Avec des impulsions ayant des durées proches d'une seconde, une rupture irréversible se produit, tandis qu'avec des durées plus courtes l'état de courant stable est rétabli. Pour des voltages transmembranaires de 0.6–1.0 V, l'état de courant fluctuant est aussi obtenu en quelque microsecondes après le début de l'impulsion, et la durée de cet état avant l'apparition de la rupture irréversible diminue rapidement avec l'augmentation d'amplitude des impulsions. Cependant, à ces voltages, si l'impulsion est terminée avant la rupture, au lieu du retour à l'état de courant stable, un état altéré de longue durée est obtenu, durant lequel la conductivité reste élevée pendant quelques minutes. En accord avec les mesures de la capacité, les mesures de conductivité membranaire ont démontré que le processus d'électroperméabilisation est un processus stochastique, avec l'obtention de durées et de conductivités variables lorsque la même expérience est répétée.²

En résumé, les mesures électriques prouvent que le processus d'électroperméabilisation procède au moins en deux étapes successives. La première étape, qui dure quelques microsecondes, se caractérise par une augmentation régulière, mais très limitée, de la capacité membranaire, et par une conductivité basse et stable de la membrane. La deuxième étape se produit seulement aux voltages qui dépassent une certaine valeur critique de l'ordre de quelques centaines de millivolts, et elle dure pendant quelques dizaines de millisecondes jusqu'à quelques secondes. Pendant cette étape, la capacité membranaire se stabilise, alors que sa conductivité augmente de plusieurs ordres de grandeur et commence à fluctuer de manière significative. Si l'exposition n'est pas terminée, cette étape est suivie d'une destruction irréversible de la membrane. Dans le cas opposé, la membrane retourne à l'état initial; à des plus basses voltages ceci se produit pratiquement immédiatement, tandis qu'à des voltages plus élevés il est précédé par un état de conductivité élevée qui peut durer quelques minutes.³

1.3.1.2 Observations microscopiques

Depuis que l'électroperméabilisation est une méthode établie, des efforts significatifs ont été fournis pour tenter d'observer le phénomène directement, i.e., en le photographiant. Ces efforts peuvent être subdivisés en ceux de l'observation des changements de la structure membranaire, des changements du voltage transmembranaire, et de la détection du transport transmembranaire causé par l'électroperméabilisation. Les changements de structure membranaire et de voltage transmembranaire sont très rapides, exigeant une résolution temporelle du niveau de la microseconde, et les études dans ces

² La stochasticité est observée dans les bicouches lipidiques aussi bien que dans les membranes cellulaires, et la reproductibilité quantitative de la rupture dans les membranes cellulaires est inférieure à celle observée dans des bicouches lipidiques pures.

³ Une étude ultérieure a montré que dans l'état altéré de longue durée, la capacité de la membrane reste à une valeur de 0.5 à 1.0 % au-dessus de la valeur initiale (Chernomordik et Abidor, 1980).

deux domaines sont passées en revue dans cette section. D'autre part, une résolution temporelle de l'ordre de quelques centaines de millisecondes est suffisante pour suivre le transport transmembranaire, et ces études seront traitées dans la Section 1.3.1.4.

En 1990, un article a été publié rapportant une observation directe de pores d'une forme "volcanique" d'un diamètre de 20 à 50 nm en utilisant la cryofracture et la microscopie électronique (Chang et Reese, 1990). Au début, ce résultat a semblé fournir un argument décisif au modèle de l'électroporation selon lequel l'électroperméabilisation est une conséquence des pores aqueux qui se forment dans la membrane (Section 1.3.2.8), mais les résultats de Chang et Reese n'ont été jamais reproduits. Il y a maintenant des indications crédibles que les pores aqueux dans la membrane – à condition qu'ils représentent le mécanisme réel de l'électroperméabilisation – ne peuvent pas excéder un diamètre de quelques nanomètres (Weaver et Chizmadzhev, 1996). C'est presque un ordre de grandeur au-dessous de la résolution de la microscopie électronique en transmission quand des structures biologiques sont impliquées⁴ (Bozzola et Russell, 1998; Afzelius et Maunsbach, 1999), et il semble ainsi que l'observation microscopique directe de l'électroperméabilisation de la membrane est présentement impossible. Il reste la perspective d'observations au niveau moléculaire en utilisant la diffraction des neutrons ou la microscopie aux rayons X, mais la structure moléculaire complexe de la bicouche lipidique représente un obstacle sérieux dans l'interprétation des résultats obtenus par ces méthodes (Bradshaw et al., 1997; Jacobsen, 1999).

Contrairement à la restructuration de la membrane pendant l'électroperméabilisation qui n'a pas encore été visualisée, les changements de voltage transmembranaire qui l'accompagnent ont été détectés avec succès par plusieurs investigateurs. En général, ces expériences sont fondées sur la méthode de mesure du voltage transmembranaire par un colorant fluorescent potentiométrique (Gross et al., 1986; Ehrenberg et al., 1988). En améliorant cette technique, un groupe japonais conduit par K. Kinoshita Jr. a développé un système ayant une résolution temporelle au-dessous de la microseconde, et a employé ce système pour observer l'électroperméabilisation des œufs d'oursin (Kinoshita et al., 1988; Hibino et al., 1991; Hibino et al., 1993).

Les premières expériences de Kinoshita et ses collaborateurs ont prouvé que entre moins de 1 μ s (dans un milieu physiologique) et 4 μ s (dans un milieu avec une conductivité dix fois inférieure) après le début d'une impulsion électrique rectangulaire, le voltage transmembranaire induit atteint une distribution spatiale imposée par un cosinus, comme prévu par l'équation de Schwan (Section 1.2.2). Plus tard, toujours entre une et quelques microsecondes, dans les régions où le voltage transmembranaire dépasse une valeur critique d'environ 750 mV, le voltage transmembrane diminue jusqu'au niveau atteint à la frontière de ces régions. En quelques secondes après la fin de l'exposition, la membrane revient à l'état où les effets sont qualitativement reproductibles par une

⁴ On note que les plus petites tailles observables en microscopie électronique à balayage sont encore plus grandes.

nouvelle exposition, alors que la durée d'un rétablissement complet était estimé à plusieurs secondes voire à plusieurs minutes (Kinosita et al., 1988).

Le deuxième rapport du groupe japonais (Hibino et al., 1991) s'est concentré sur des données quantitatives. Ils ont analysé l'influence de la durée de l'impulsion sur la valeur-seuil du voltage transmembranaire au-dessus de laquelle l'électroperméabilisation a été détectée, déterminant un seuil de voltage transmembranaire de 1 V pour une impulsion de 2 μ s, de 0.65 V pour une impulsion de 8 μ s, et de 0.60 V pour une impulsion de 18 μ s. Ils ont aussi montré que la chute du voltage transmembranaire commence moins de 1 μ s après le début de l'impulsion, et s'accomplit en quelques dizaines de microsecondes. La plupart du temps, ils ont observé une électroperméabilisation bilatérale, où la chute du voltage transmembranaire s'est produite sur les deux pôles de la cellule (i.e., sur les deux régions de la cellule qui ont fait face aux électrodes).

Dans leur troisième rapport (Hibino et autres, 1993), le groupe japonais a amélioré la résolution temporelle à 0.5 μ s. Ils ont démontré qu'avec des expositions sous-critiques la constante de temps de l'induction du voltage transmembranaire est identique à la constante de temps de sa diminution après la fin de l'exposition. Une fois encore, la plupart du temps, une électroperméabilisation bilatérale a été observée, et avec le voltage transmembranaire dépassant le niveau critique, les effets étaient déjà observables au bout de 0.5 μ s après le début de l'impulsion. Ces mesures ont également prouvé que la chute rapide du voltage transmembranaire reflète seulement le début des changements de structure membranaire, alors que l'augmentation de la conductivité de la membrane se poursuit pendant \approx 1 ms. En cours de rétablissement, deux étapes distinctes ont été détectées — dans les premières 7 μ s après la fin de l'exposition, la conductivité de la membrane diminue d'un ordre de grandeur, alors que durant les suivantes 0.5 ms, une deuxième diminution d'un ordre de grandeur est observée.

Récemment, Gabriel et Teissié ont suivi au cours du temps de l'électroperméabilisation en utilisant une combinaison de colorants sensibles aux changements de structure membranaire (Gabriel et Teissié, 1997; Gabriel et Teissié, 1999). Ils ont observé que l'intensité des changements augmente en fonction de l'augmentation de la durée de l'impulsion, alors que la surface soumise à ces changements est asymétrique et augmente en fonction de l'augmentation de la durée de l'amplitude de l'impulsion. Pour des amplitudes inférieures, l'électroperméabilisation est seulement obtenue au pôle faisant face à l'électrode positive, alors qu'à des amplitudes plus élevées elle est obtenue aux deux pôles de la cellule. Ils ont aussi observé qu'au pôle faisant face à l'électrode positive, les changements se produisent pratiquement simultanément au début de l'exposition, alors qu'au pôle faisant face à l'électrode négative ils devenaient perceptibles avec un certain retard. Combinant le suivi de l'activité du colorant avec l'observation de l'entrée des ions Ca^{2+} dans la cellule, Gabriel et Teissié ont également prouvé que les régions où la structure change correspondent aux régions où les ions entrent.

1.3.1.3 Mesures des propriétés optiques

Pour analyser les événements liés à l'électroperméabilisation au niveau moléculaire, Kakorin et ses collaborateurs ont mesuré l'absorbance et la polarisation de la lumière à 365 nm dans une suspension de vésicules lipidiques contenant du diphenylhexatriène qui sont étés exposées aux impulsions électriques (Kakorin et al., 1996). Les changements de polarisation parallèlement et perpendiculairement au champ ont été employés pour évaluer les événements moléculaires, et en particulier la réorientation des têtes lipidiques. Dans ces expériences, les changements se sont produits en quelques microsecondes après le début de l'impulsion, et avec l'augmentation de l'amplitude de l'impulsion, le pôle faisant face à l'électrode positive était le premier à montrer des changements caractéristiques de l'électroperméabilisation. Les mesures de polarisation ont également suggéré que pendant l'électroperméabilisation l'eau pénètre dans la bicouche, et que la région électroperméabilisée représente de 0.02 à 0.2% de l'aire initiale de la membrane. Les auteurs ont conclu que ces résultats donnent un support fort à la théorie de la formation des pores aqueux (Section 1.3.2.8). Dans les expériences décrites ci-dessus, indépendamment de l'amplitude de l'impulsion, le voltage transmembranaire n'a jamais excédé $\approx 0,53$ V.

1.3.1.4 Mesures de survie et d'internalisation

Les expériences décrites ci-dessus ont été, pour la plupart, effectuées pour la compréhension des mécanismes de l'électroperméabilisation en général. En outre, il y a eu aussi beaucoup d'études qui se sont concentrées sur un aspect plus pratique — celui de déterminer les conditions expérimentales dans lesquelles l'électroperméabilisation optimale est obtenue. Dans ce but, les rôles des paramètres des impulsions, de la température externe, de la pression osmotique, et d'autres paramètres ont été analysés.

Pour la grande majorité des applications, l'efficacité de l'électroperméabilisation est déterminée par le taux des cellules perméabilisées de manière réversible par rapport à la population totale des cellules exposées aux impulsions. Pour optimiser l'électroperméabilisation, on cherche ainsi les paramètres des impulsions qui, sous des conditions expérimentales données, fournissent le plus haut pourcentage de cellules perméabilisées de manière réversible (i.e., de cellules perméabilisées qui survivent l'exposition). Aussi, pour que le traitement atteigne son objectif, il est souvent nécessaire qu'une certaine quantité de molécules exogènes entre dans chaque cellule, et dans ce cas les paramètres optimaux devraient également assurer une internalisation suffisante de molécules par chaque cellule.

En raison de ces arguments, le rôle des paramètres des impulsions est habituellement étudié en utilisant une combinaison d'essais qui permettent d'estimer le pourcentage des cellules qui survivent au traitement, le pourcentage des cellules perméabilisées, la quantité de molécules exogènes internalisées par cellule, et parfois également la durée nécessaire pour le recouvrement complet de l'état non perméabilisé.

La gamme probablement la plus ample d'investigations avec des impulsions rectangulaires a été effectuée par M.-P. Rols, J. Teissié et leurs collaborateurs (Rols et Teissié, 1989; Rols et Teissié, 1990a; Rols et Teissié, 1990b; Teissié et Rols, 1993; Rols et al., 1994; Wolf et al., 1994; Rols et Teissié, 1998a; Golzio et al., 1998). Ils ont démontré que (i) l'amplitude de l'impulsion détermine l'aire perméabilisée de la membrane, (ii) le produit du nombre des impulsions par la durée de l'impulsion détermine l'intensité de la perméabilisation, et ainsi la quantité de molécules internalisées, et (iii) pour l'internalisation des macromolécules, une plus longue durée des impulsions est nécessaire (Rols et Teissié, 1989; Rols et Teissié, 1990a; Wolf et al., 1994; Rols et Teissié, 1998a).

Dans ces expériences, le pourcentage de cellules électroperméabilisées a augmenté de façon sigmoïdale avec l'augmentation de l'amplitude des impulsions, et ils ont estimé que l'électroperméabilisation se produisait pour des voltages transmembranaires supérieures à 250 mV (Teissié et Rols, 1993). Ils ont aussi démontré que le seuil d'électroperméabilisation et le transport à travers la membrane sont influencés par la pression osmotique (Rols et Teissié, 1990b; Golzio et al., 1998). Enfin, ils ont étudié le rôle de la température sur l'efficacité de la perméabilisation, prouvant qu'en élevant la température d'incubation après la pulsation de 4°C à 37°C, la survie des cellules et l'internalisation des molécules augmentent (Rols et al., 1994).

En utilisant une large gamme de paramètres des impulsions rectangulaires, Maček-Lebar et ses collaborateurs ont prouvé que l'énergie totale d'un train d'impulsions ne constitue pas un paramètre crucial ni pour l'internalisation de petits molécules ni pour la survie. Au contraire, ils ont observé des variations claires d'internalisation induite par des trains d'impulsions différentes ayant la même énergie totale (Maček-Lebar et al., 1998).

Čemažar et ses collaborateurs ont comparé l'électroperméabilisation de six lignées de cellules (Čemažar et al., 1998). Ils ont conclu que la dépendance de l'électroperméabilisation et de la survie par rapport à l'amplitude des impulsions varie considérablement entre les diverses lignées. Certaines des variations observées peuvent être attribuées aux différences de taille des cellules, mais ces résultats impliquent que des différences de la structure membranaire pourraient aussi jouer un rôle important.

Avec des impulsions exponentielles, Tomov a prouvé que le pourcentage de cellules électroperméabilisées augmente de façon sigmoïdale avec l'augmentation de l'amplitude initiale des impulsions et de la constante de temps de l'impulsion (Tomov, 1995).

À ce jour, les études traitant de l'influence de la forme de l'impulsion sur l'efficacité de l'électroperméabilisation de cellules sont très rares. Dans une certaine mesure, ceci est dû au manque de générateurs disponibles pour produire des impulsions de haut voltage d'une forme autre qu'exponentielle, qui est produite par une décharge simple, ou rectangulaire, avec laquelle le voltage est stabilisée durant de l'exposition. Les études sur des impulsions rectangulaires biphasiques ont été limitées aux membranes planes et aux régions de "patch-clamp", où le même voltage a produit l'électroperméabilisation avec des impulsions monophasiques et biphasiques (Tovar et Tung, 1991). Jusqu'à maintenant, la

seule application des impulsions alternatives non rectangulaires à haut voltage est trouvée dans les défibrillateurs cardiaques externes. Ceux-ci emploient une décharge exponentielle avec une polarité qui s'inverse pendant l'impulsion, des décharges consécutives de deux condensateurs polarisés à l'opposé, ou une onde sinusoïdale atténuée. Pour toutes ces approches, une défibrillation améliorée a été obtenue par rapport à l'effet des formes correspondantes monophasiques (Bardy et al., 1996; Yamanouchi et al., 1999).

Chang et ses collaborateurs ont rapporté une plus grande efficacité d'électroperméabilisation quand une ondulation sinusoïdale de fréquence de 5-50 kHz est superposée sur une impulsion rectangulaire (Chang, 1989; Chang et al., 1991). Récemment, Schoenbach et ses collaborateurs ont aussi rendu compte de l'électroperméabilisation avec des impulsions très courtes, ayant une durée du 60 ns à 2 μ s (Schoenbach et al., 1997).

1.3.1.5 Sommaire des observations expérimentales

Alors que certains des résultats expérimentaux décrits ci-dessus restent à confirmer, et que d'autres sont encore contradictoires, il y a de nombreux faits expérimentaux dont validité fait aujourd'hui l'objet d'un consensus général. Ceux-ci peuvent être récapitulés comme suit:

- Pour les cellules des tissus ou en suspension, l'exposition aux impulsions électriques avec une amplitude qui dépasse une certaine valeur critique mène à une grande augmentation de la perméabilité et de la conductivité électrique de leur membrane. Le phénomène est initialisé en moins d'une microseconde après le début de l'impulsion (la chute du voltage transmembranaire), et atteint sa pleine ampleur en quelques dizaines de microsecondes (perméabilité et conductivité augmentées de plus de trois ordres de grandeur).
- Si l'amplitude, la durée, et le nombre d'impulsions ne sont pas trop élevés, la membrane récupère son état initial après la fin de l'exposition. Le rétablissement commence en quelques microsecondes, mais l'état initial est atteint après quelques secondes ou quelques minutes.
- L'électroperméabilisation est liée à l'induction du voltage transmembranaire. Le voltage transmembranaire critique, au-dessus duquel l'électroperméabilisation se produit, se situe entre 0.2 V et 1 V, suivant la lignée cellulaire et les conditions expérimentales.
- L'électroperméabilisation ne se produit pas à la même amplitude d'impulsion pour toute la population cellulaire. Le pourcentage des cellules perméabilisées augmente, et le pourcentage des cellules survivantes diminue avec l'accroissement de l'amplitude de l'impulsion. Le pourcentage de cellules perméabilisées et l'internalisation augmentent avec l'augmentation de la durée des impulsions et de leur nombre.
- Les petites molécules peuvent entrer dans la cellule par diffusion, mais l'électrophorèse joue un rôle significatif dans l'internalisation des macromolécules (e.g. l'ADN), et une durée plus longue d'impulsions est nécessaire pour un effet satisfaisant.

1.3.2 Tentatives d'explication théorique de l'électroperméabilisation

Ce sous-chapitre donne une vue d'ensemble des modèles théoriques qui ont été proposés à un moment ou à un autre comme explications possibles du phénomène d'électroperméabilisation. Bien que certains d'entre eux soient évidemment plus plausibles que d'autres, chacun des modèles présentés a eu, au moins pendant un certain temps, ses défenseurs. En outre, des modèles abandonnés sont parfois rétablis à la lumière de nouvelles découvertes ou de nouvelles hypothèses. Ici, on essaye de présenter les modèles dans leur ordre chronologique, reflétant de ce fait également la progression historique des développements dans le domaine.

Basés sur les propriétés expérimentalement déterminées de l'électroperméabilisation qui ont été décrites dans les sections précédentes, nous pouvons également définir plusieurs conditions spécifiques qu'un modèle réussi devrait réunir:

- L'image physique réaliste de la membrane électroperméabilisée. À la différence des véritables processus de rupture, tels qu'une déchirure d'un fil trop tendu, l'électroperméabilisation ne mène pas à une désintégration totale du système, mais reste un phénomène local, et souvent également réversible. Par conséquent, le modèle de l'électroperméabilisation devrait décrire la membrane perméabilisée aussi bien que la membrane non perméabilisée.
- La durabilité de l'état électroperméabilisé. Les expériences prouvent que l'état de perméabilité élevé peut durer quelques minutes après que la dernière impulsion électrique ait été délivrée (Section 1.3.1.1). Si le modèle donne une image réelle de la membrane électroperméabilisée, il doit aussi expliquer le fait que la récupération de l'état initial ne se produise pas immédiatement après la fin de l'exposition.
- La réversibilité limitée de l'état électroperméabilisé. Si l'amplitude et la durée des impulsions électriques se situent dans une certaine gamme, les cellules récupèrent et retournent après un certain temps à l'état initial, non perméabilisé. Pour des valeurs supérieures de ces paramètres, les impulsions induisent la mort des cellules, apparemment en raison de l'irréversibilité de l'état électroperméabilisé.
- La dépendance par rapport à la durée de l'impulsion et du nombre des impulsions. Les impulsions trop courtes n'induisent pas l'électroperméabilisation, alors que dans la gamme de durées entre quelques microsecondes et quelques millisecondes l'intensité du phénomène augmente avec l'augmentation de la durée de l'impulsion et de leur nombre (Section 1.3.1.4). Les modèles qui ne fournissent pas d'explications à ces propriétés sont donc incorrects ou incomplets.
- Une valeur réaliste du voltage transmembranaire critique pour lequel la rupture de la membrane se produit. La plupart des modèles décrits dans ce chapitre sont quantitatifs et donnent une expression explicite pour le voltage transmembranaire critique. Cette prévision devrait être en accord avec les données expérimentales qui se situent dans la gamme de 0.2 V à 1 V (Section 1.3.1.5). Pour permettre des

comparaisons, on a essayé d'appliquer à chaque formule des valeurs typiques des paramètres. Les paramètres qui sont utilisés plus d'une fois sont contenus dans le Tableau 1, alors que ceux qui sont nécessaires pour seulement un modèle particulier sont donnés dans le traitement de ce modèle.

Comme le Tableau 1 le montre, les valeurs de beaucoup de paramètres sont connues seulement par une approximation de l'ordre de grandeur (ils sont désignés par le symbole \sim), ou changent considérablement d'une cellule à une autre (ceux-ci sont désignés par un astérisque). En raison de l'incertitude et de la variabilité de ces paramètres, l'évaluation du voltage transmembranaire critique peut seulement servir pour le rejet des modèles qui donnent des prévisions trop éloignées par rapport aux valeurs expérimentales.

- Stochasticité de l'électroperméabilisation. Le phénomène ne se produit pas à la même amplitude d'impulsions pour toutes les cellules, et quelques auteurs considèrent cette propriété comme étant très importante dans l'évaluation des modèles de l'électroperméabilisation [Weaver et Chizmadzhev, 1996].

Cependant, dans le cas des cellules en suspension, au moins une partie de la variabilité de l'amplitude de l'impulsion critique peut être expliquée par la variabilité de la taille des cellules dans la population traitée. Puisque le voltage transmembranaire induit par une impulsion d'amplitude donnée est proportionnel au rayon de la cellule, la stochasticité de l'électroperméabilisation est au moins dans une certaine mesure une conséquence de la stochasticité de la taille de cellules.

Tableau 1. Valeurs typiques des paramètres utilisés pour l'évaluation des modèles d'électroperméabilisation. \sim désigne les valeurs qui sont seulement connues par une approximation de l'ordre de grandeur, et * les valeurs qui changent de manière significative d'une cellule à une autre.

Paramètre	Notation	Valeur	Référence ou explication
Cellule, rayon	R	* 1×10^{-5} m	une valeur typique pour les cellules eukaryotiques
Membrane, épaisseur (non déformée)	d (d_0)	5×10^{-9} m	Gennis, 1989
conductivité électrique	σ_m	$\sim 3 \times 10^{-7}$ Sm ⁻¹	Gascoyne et al., 1993
constante diélectrique	ϵ_m	4.4×10^{-11} Fm ⁻¹	Gascoyne et al., 1993
module d'élasticité	Y	$\sim 1 \times 10^8$ Nm ⁻²	Sugár, 1979
viscosité	μ	0.6 Nsm ⁻²	Dimitrov et Jain, 1984
tension de surface	Γ	$\sim 1 \times 10^{-3}$ Jm ⁻²	Weaver et Chizmadzhev, 1996
tension de bord	γ	$\sim 1 \times 10^{-11}$ Jm ⁻¹	Weaver et Chizmadzhev, 1996
Cytoplasme, conductivité électrique	σ_i	0.3 Sm ⁻¹	Harris et Kell, 1983; Hölzel et Lamprecht, 1992
constante diélectrique	ϵ_i	7.1×10^{-10} Fm ⁻¹	attribué la même valeur que ϵ_e
Milieu extracellulaire, conductivité électrique	σ_e	1.2 Sm ⁻¹	Sunderman, 1945 (serum de sang à 35°C)
constante diélectrique	ϵ_e	7.1×10^{-10} Fm ⁻¹	Nörtemann et al., 1997 (saline physiologique à 35°C)

1.3.2.1 Le modèle hydrodynamique

Le modèle hydrodynamique, développé au début des années 70, décrit le comportement d'une couche chargée d'un liquide non conducteur séparant deux liquides conductifs (Michael et O'Neill, 1970; Taylor et Michael, 1973). Ce modèle essaye d'expliquer l'électroperméabilisation de la membrane en supposant que la membrane cellulaire est semblable à un liquide non conducteur et non compressible.

Dans le modèle hydrodynamique, le voltage transmembranaire produit une pression compressive, mais puisque la membrane a un volume non compressible, la diminution de l'épaisseur mène à une augmentation correspondante de la surface de la membrane. Le cytoplasme qui est enveloppé par la membrane doit également maintenir un volume constant, et par conséquent la surface de la membrane devient ondulée (Fig. 7).

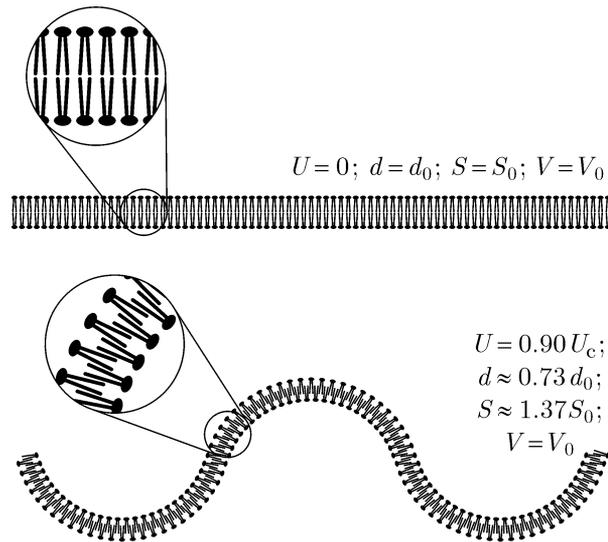


Figure 7

L'expansion de la surface de la membrane a comme conséquence une augmentation progressive de la tension de surface et de ce fait d'une pression qui s'oppose à la diminution d'épaisseur. Aux voltages suffisamment bas, les deux pressions atteignent un équilibre, et l'épaisseur de la membrane se stabilise. Pourtant, comme l'Insert 4 l'explique en détail, l'atteinte de l'équilibre est seulement possible jusqu'au voltage critique

$$U_c = \sqrt{\frac{\Gamma d_0}{2\epsilon_m}},$$

où Γ est la tension de surface, ϵ_m la constante diélectrique, et d_0 l'épaisseur de la membrane dans l'état non déformé. Au-dessus d' U_c , pour lequel l'épaisseur de membrane est $d = d_0/2$, une instabilité se produit: la pression compressive l'emporte, menant à la rupture de la membrane. Avec des valeurs typiques des paramètres (Tableau 1), on obtient $U_c \approx 0.24$ V, qui est dans une concordance relativement bonne avec les données expérimentales (Section 1.3.1.5). Les équations du modèle (Insert 4) permettent également de tracer l'épaisseur de la membrane en fonction du voltage transmembranaire (Fig. 8).

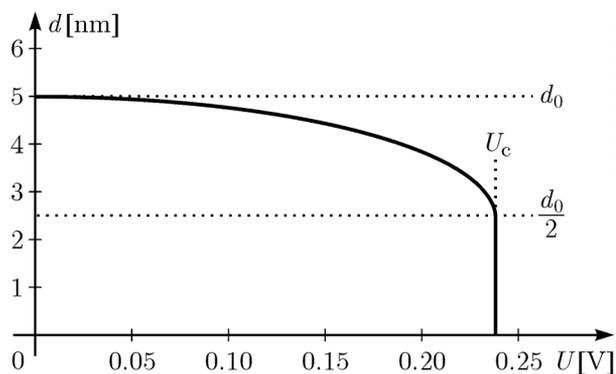


Figure 8

Insert 4: L'instabilité selon le modèle hydrodynamique

Dans ce modèle, la membrane est une couche de liquide nonconductif avec une constante diélectrique ϵ_m et une tension de surface Γ . Le volume V de cette couche est constant, alors que sa surface S et son épaisseur d sont variables, avec des valeurs initiales désignées par S_0 et d_0 . La pression exercée sur la couche par le voltage transmembranaire U est

$$p_1 = \frac{\epsilon_m U^2}{2d^2},$$

et elle est contrecarrée par la pression produite par l'augmentation de la surface membranaire,

$$p_2 = -\frac{\Gamma}{V} \int_{S_0}^S dS = -\frac{\Gamma(S - S_0)}{dS}.$$

Puisque dans ce modèle le volume est constant, $dS = d_0 S_0$, on peut écrire

$$p_2 = -\frac{\Gamma(S - S_0)}{d_0 S_0} = -\frac{\Gamma}{d_0} \left(\frac{S}{S_0} - 1 \right) = -\frac{\Gamma}{d_0} \left(\frac{d_0}{d} - 1 \right) = -\Gamma \left(\frac{1}{d} - \frac{1}{d_0} \right).$$

L'équilibre est obtenu à une valeur de d à laquelle $p_1 + p_2 = 0$:

$$\frac{\epsilon_m U^2}{2d^2} - \Gamma \left(\frac{1}{d} - \frac{1}{d_0} \right) = 0,$$

On recompose cette relation comme

$$\frac{1}{d_0} d^2 - d + \frac{U^2 \epsilon_m}{2\Gamma} = 0.$$

C'est une équation quadratique et a ainsi deux solutions, mais comme pour $U = 0$ l'épaisseur de la membrane est $d = d_0$, seulement une de ces solutions,

$$d = \frac{d_0}{2} (1 + \sqrt{D}), \quad \text{où } D = 1 - \frac{2U^2 \epsilon_m}{\Gamma d_0}.$$

a une signification physique. Une solution réelle existe ainsi seulement pour $D \geq 0$, et l'équilibre est atteint seulement aux voltages au-dessous de la valeur critique donnée par

$$U_c = \sqrt{\frac{\Gamma d_0}{2\epsilon_m}}.$$

Le modèle hydrodynamique a plusieurs désavantages. D'abord, il s'applique aux liquides avec une fluidité isotropique, et cela n'est pas valable pour la membrane, où le mouvement transversal des molécules est très limité. En outre, il ne répond pas à la première condition donnée au début de ce chapitre, car il ne décrit pas la membrane électroperméabilisée. Des autres conditions énumérées, la seule à laquelle il répond est la prévision d'une valeur réelle du voltage transmembranaire critique.

1.3.2.2 Le modèle élastique

Présenté peu après le modèle hydrodynamique, ce modèle décrit le comportement d'une couche élastique chargée ayant une surface constante (Crowley, 1973). Contrairement au modèle hydrodynamique, qui suppose que la membrane a un volume constant et une surface variable, le modèle élastique présume que le volume de la membrane est variable et que sa surface est constante (Fig. 9).

Dans le modèle élastique, le voltage transmembranaire produit une pression compressive, et tandis que le volume de la membrane diminue, une pression élastique qui augmente graduellement s'oppose à la compression. Comme le modèle hydrodynamique, le modèle élastique prédit l'existence d'un voltage critique au-dessus duquel l'équilibre

devient impossible (l'Insert 5 donne une dérivation détaillée). Ce voltage est

$$U_c \approx 0.61 d_0 \sqrt{\frac{Y}{\epsilon_m}},$$

où Y est le module d'élasticité, d_0 l'épaisseur initiale de la membrane, et ϵ_m la constante diélectrique de la membrane. Au-dessus d' U_c , à lequel $d \approx 0.61 d_0$, une instabilité se produit, menant à la rupture de la membrane.

Avec les valeurs typiques des paramètres du Tableau 1, on obtient $U_c \approx 4.57$ V, qui est un ordre de grandeur plus haut que la valeur suggérée par les données expérimentales. Les équations du modèle permettent aussi de tracer l'épaisseur de la membrane en fonction du voltage transmembranaire (Fig. 10).

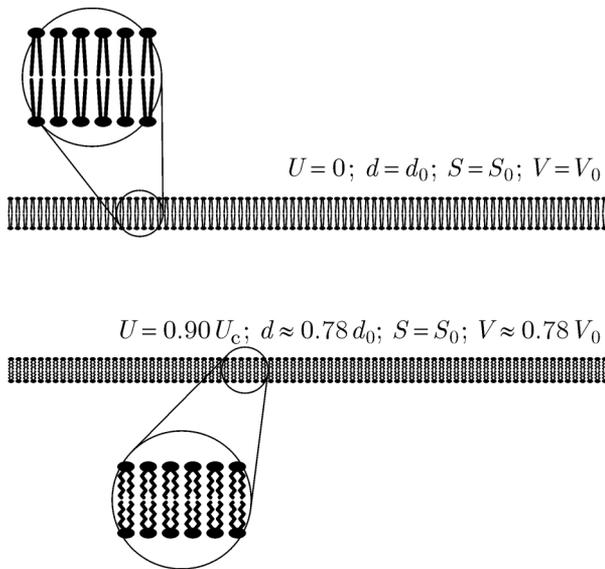


Figure 9

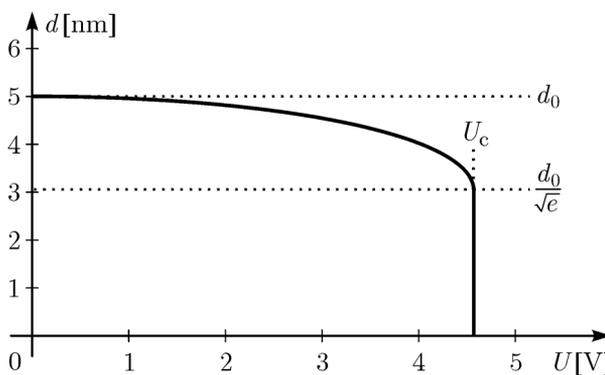


Figure 10

Insert 5: L'instabilité selon le modèle élastique

Dans ce modèle, la membrane est une couche élastique avec une constante diélectrique ϵ_m et un module d'élasticité Y . La surface de la membrane S est constante, alors que son volume V et son épaisseur d sont variables, avec les valeurs initiales V_0 et d_0 . La pression produite par le voltage U ,

$$p_1 = \frac{\epsilon_m U^2}{2d^2},$$

est opposé par la pression due à la réduction du volume membranaire,

$$p_2 = \int_{V_0}^V \frac{Y(V)}{V} dV.$$

Si Y ne change pas avec la déformation, on a

$$p_2 = Y \int_{V_0}^V \frac{dV}{V} = -Y \ln \frac{V_0}{V} = -Y \left(\ln \frac{d_0}{d} + \ln \frac{S_0}{S} \right).$$

Comme la surface membranaire est constante, $S = S_0$, le deuxième logarithme est nul, et

$$p_2 = -Y \ln \frac{d_0}{d}.$$

L'équilibre est obtenu à d qui donne $p_1 + p_2 = 0$:

$$\frac{\epsilon_m U^2}{2d^2} - Y \ln \frac{d_0}{d} = 0,$$

$$\frac{\epsilon_m U^2}{Y d^2} = \ln \frac{d_0^2}{d^2}.$$

Soit $\chi = d_0^2 / d^2$; donc

$$K \chi = \ln \chi, \quad \text{où } K = \frac{\epsilon_m U^2}{Y d_0^2}.$$

Les solutions de cette equation n'ont pas une forme explicite, mais on le vérifie facilement que ces solutions existent seulement pour $K \leq 1/e$. Ainsi, l'équilibre est seulement atteint au-dessous du voltage critique donnée par

$$U_c = d_0 \sqrt{\frac{Y}{e \epsilon_m}} \approx 0.61 d_0 \sqrt{\frac{Y}{\epsilon_m}}.$$

En plus de la prévision d'un voltage critique trop haut, le modèle suppose que Y ne change pas avec la déformation, ce qui est certainement incorrect à une compression de $\approx 39\%$ au point s'instabilité. En outre, selon le modèle élastique, la membrane perméabilisée est une couche d'épaisseur nulle, ce qui est évidemment absurde. De plus, ce modèle n'arrive pas à remplir n'importe quelle autre condition de notre liste.

1.3.2.3 Le modèle hydroélastique

Les hypothèses sur lesquelles sont établis le modèle hydrodynamique et le modèle élastique s'excluent mutuellement, car on suppose pour le premier un volume constant de la cellule, et pour le deuxième une surface constante de la membrane. Ces hypothèses ne sont pas nécessaires si on traite la membrane comme un liquide ayant une tension de surface ainsi qu'une élasticité. De cette manière on obtient le modèle hydroélastique dans lequel le volume et la surface de la membrane varient, et la membrane chargée devient simultanément comprimée en volume et ondulée (Fig. 11).

Comme les deux modèles décrits précédemment, le modèle hydroélastique prévoit une instabilité (Insert 6). Avec les valeurs typiques des paramètres du Tableau 1, on obtient $U_c \approx 0.34$ V, en accord très étroit avec les données expérimentales. Selon ce modèle, à U_c l'épaisseur de la membrane est réduite à $\approx 50\%$ de sa valeur initiale (Fig. 12), sa surface est agrandie presque à 200% (Fig. 13), et le volume cellulaire est réduit à $\approx 99,8\%$ (Fig. 14).

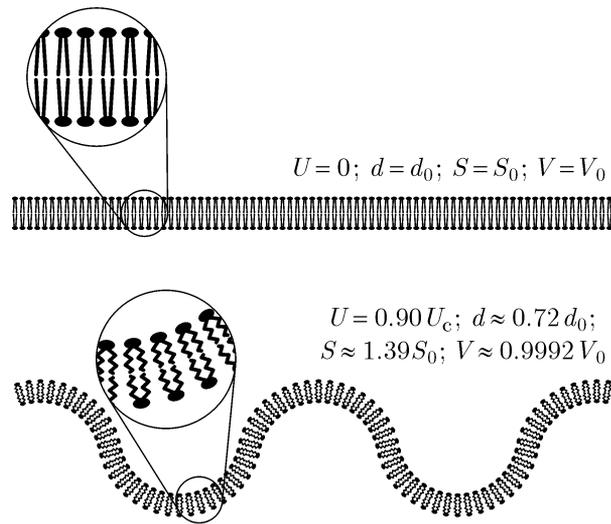


Figure 11

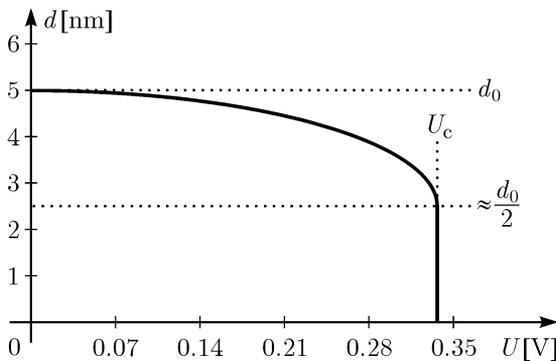


Figure 12

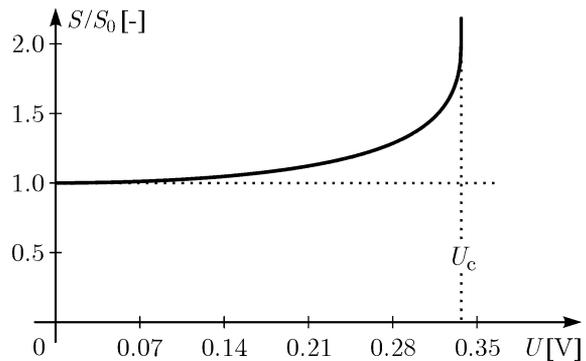


Figure 13

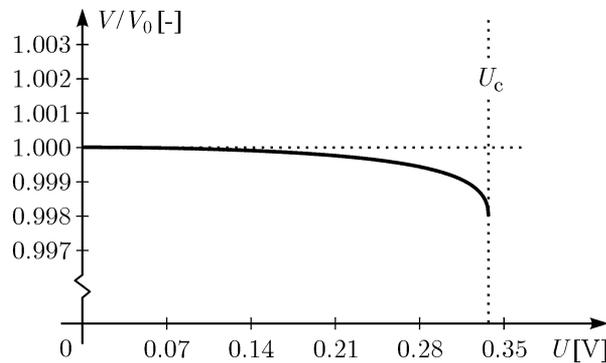


Figure 14

Comme la Fig. 14 le montre, selon le modèle hydroélastique, la compression du volume est très petite, et même au voltage critique le volume membranaire est réduit de seulement 0.2% par rapport à la valeur initiale. Par conséquent, dans ce modèle, la supposition d'une valeur constante du module d'élasticité est beaucoup plus raisonnable que dans le modèle élastique, où la rupture de la membrane est associée à une réduction du volume de presque 39%. Ainsi, la description de l'instabilité compressive fournie par le modèle hydroélastique est plus réelle que celles du modèle hydrodynamique ou du modèle élastique. Néanmoins, elle a le même problème général — elle donne une image impossible de la membrane électroperméabilisée: une couche d'épaisseur nulle, seulement cette fois en plus ondulée. Excepté une prévision réelle du voltage transmembranaire critique, le modèle n'arrive pas également à atteindre n'importe quelle autre condition donnée dans la liste présentée au début de ce chapitre.

1.3.2.4 Le modèle viscohydroélastique

Dans une étape de plus vers la complexité, le modèle viscohydroélastique (désigné par ses auteurs sous le nom de modèle viscoélastique) développe le modèle hydroélastique en ajoutant la viscosité membranaire (Maldarelli et al., 1980; Steinchen et al., 1982). Comme dans le modèle hydroélastique, dans ce modèle la membrane chargée est comprimée et ondulée. À la différence du modèle hydroélastique, dans le modèle viscohydroélastique la déformation n'est pas instantanée, mais suit graduellement l'induction du voltage transmembranaire. C'est une conséquence de l'inhibition du flux moléculaire à cause de la viscosité.

En l'absence de la viscosité, le flux moléculaire n'est pas restreint, et dans les modèles décrits précédemment, l'épaisseur de la membrane est

Insert 6: L'instabilité selon le modèle hydroélastique

On considère une membrane avec la constante diélectrique ϵ_m , la tension de surface Γ et le module d'élasticité Y . On suppose que le volume V , la surface S et l'épaisseur d de la membrane sont tous variables, avec des valeurs initiales des deux dernières représentées par S_0 and d_0 . La pression produite par le voltage transmembranaire est contrecarrée par les pressions dues à l'élasticité de la membrane et à sa tension de surface (voir l'Inserts 4 et 5), avec l'équilibre donné par

$$\frac{\epsilon_m U^2}{2d^2} - \frac{\Gamma(S - S_0)}{dS} - Y \ln \frac{d_0}{d} - Y \ln \frac{S_0}{S} = 0.$$

On reformule cette expression:

$$\frac{\epsilon_m U^2}{2Yd^2} + \frac{\Gamma S_0}{YdS} - \frac{\Gamma}{Yd} = \ln \frac{d_0}{d} + \ln \frac{S_0}{S}$$

et on substitue $\psi = d_0/d$, $\xi = S_0/S$, obtenant

$$K_1 \psi^2 - K_2 \psi(1 - \xi) = \ln \psi + \ln \xi,$$

où $K_1 = \frac{\epsilon_m U^2}{2Yd_0^2}$ et $K_2 = \frac{\Gamma}{Yd_0}$.

Dans la direction perpendiculaire à la surface membranaire, les pressions dues à l'élasticité et la tension de surface sont coorientées, mais dans la direction parallèle à la membrane elles s'opposent. Ainsi à l'équilibre

$$\frac{\Gamma(S - S_0)}{dS} - Y \ln \frac{d_0}{d} - Y \ln \frac{S_0}{S} = 0.$$

Avec la notation utilisée ci-dessus, ceci donne

$$K_2 \psi(1 - \xi) = \ln \psi + \ln \xi.$$

Soustrayant cette équation de la première équation d'équilibre, on a

$$K_1 \psi^2 - 2K_2 \psi(1 - \xi) = 0,$$

et par conséquent

$$1 - \xi = \frac{K_1}{2K_2} \psi.$$

Insérant ce résultat dans la deuxième équation d'équilibre, finalement on obtient

$$\frac{K_1 \psi^2}{2} = \ln \psi + \ln \left(1 - \frac{K_1}{2K_2} \psi \right).$$

Cette equation n'a pas une solution explicite, et pour déterminer la valeur d' U_c , on insère les valeurs des paramètres et on calcule ψ numériquement en augmentant la valeur d' U jusqu'au point $U = U_c$ pour lequel la solution n'existe plus.

donc toujours uniforme. Pour maintenir cette uniformité pendant la déformation, le flux moléculaire change avec la position sur la membrane. En présence de viscosité, le flux ralentit, l'épaisseur uniforme ne peut pas être maintenue, et la membrane devient amincie aux endroits où l'afflux le plus élevé des molécules serait exigé pour maintenir une épaisseur uniforme (Fig. 15). Jusqu'à un certain voltage, la membrane atteint toujours un état d'équilibre, mais aux voltages plus élevés, l'intégrité de la membrane ne peut pas être préservée, et des discontinuités se forment aux endroits où l'amincissement est le plus prononcé. L'analyse d'une telle instabilité est sophistiquée (Dimitrov, 1984; Dimitrov and Jain, 1984). L'Insert 7 donne seulement un abrégé de cette analyse, qui établit que dans le modèle viscohydroélastique, l'instabilité se produit seulement si le voltage transmembranaire excède une amplitude critique donnée par

$$U_c = \sqrt[4]{\frac{8\Gamma Y d_0^3}{\epsilon_m^2}},$$

pendant une durée supérieure à la durée critique,

$$\tau_c = \frac{24\mu}{\frac{\epsilon_m^2 U^4}{\Gamma d_0^3} - 8Y},$$

où μ représente la viscosité de la membrane, et les paramètres restants sont les mêmes que dans les modèles décrits précédemment. Avec les valeurs typiques des paramètres du Tableau 1, on obtient $U_c \approx 2.68$ V. De ce point de vue, le modèle viscohydroélastique est encore moins valable que le modèle hydroélastique et le modèle hydrodynamique, mais en même temps il offre un avantage principal par rapport à tous les modèles décrits précédemment. Dans le modèle viscohydroélastique, le voltage au-dessus de la valeur critique ne suffit pas pour l'électroperméabilisation, car une durée des impulsions au-dessus de la valeur critique est aussi nécessaire, ce qui explique ainsi la dépendance d'électroperméabilisation de la durée des impulsions. Ceci est mis en évidence dans la Fig. 16, qui montre la relation entre l'amplitude et la durée critique du voltage transmembranaire. À $U = 1.01 \times U_c \approx 2.71$ V, la durée critique est ≈ 450 ns, ce qui est en accord étroit avec les données suggérées par les observations microscopiques (Section 1.3.1.2). De plus, la figure montre qu'avec l'augmentation du voltage, τ_c critique

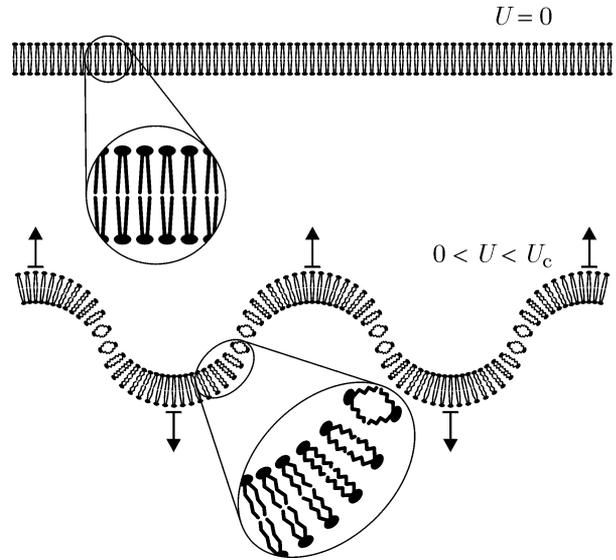


Figure 15

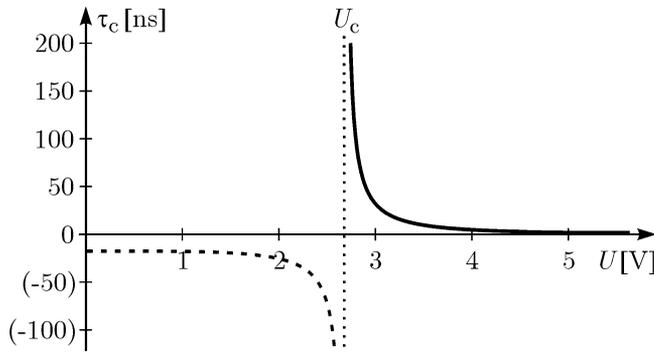


Figure 16

diminue très rapidement, et à $U = 1.20 \times U_c \approx 3.12$ V, on obtient déjà $\tau_c \approx 17$ ns. Par contre, comme le voltage transmembranaire est induit avec une constante de temps de plusieurs microsecondes (Section 1.2.2.2, Section 2.1.3), les durées les plus courtes des impulsions avec lesquelles l'électroperméabilisation

peut être réalisé ont une valeur de l'ordre de quelques microsecondes. Selon le modèle viscohydroélastique, une fois que le voltage transmembranaire est établi, la rupture se produit pratiquement instantanément. Par conséquent, ce modèle ne peut pas également expliquer les données expérimentales qui montrent que, par exemple, une impulsion de la durée du 1 ms réalise une électroperméabilisation beaucoup plus prononcée qu'une impulsion d'une durée de 100 μ s (Section 1.3.1.5, Section 3.2). En outre, selon ce modèle, la membrane électroperméabilisée est fêlée le long des

Insert 7: L'instabilité selon le modèle viscohydroélastique

On traite une membrane avec la constante diélectrique ϵ_m , la tension de surface Γ , le module d'élasticité Y et la viscosité μ . Selon le modèle viscohydroélastique, les discontinuités se produisent après qu'un voltage transmembranaire U ait été présente pour la durée critique

$$\tau_c = \frac{24\mu}{2\epsilon_m U^2 k^2 - 8Y - \Gamma d_0^3 k^4},$$

où k est le nombre ondulatoire (la réciproque de la longueur de l'ondulation sur la membrane). Aux valeurs basses de U , on obtient une valeur négative du τ_c , qui est physiquement impossible; ceci signifie que la membrane est stable, et les discontinuités ne peuvent se produire pour aucune durée des impulsions (ceci peut être écrit comme $\tau_c \rightarrow \infty$).

Si l'ondulation peut se former librement (i.e., s'il n'y a aucun point fixe sur la membrane), pour une valeur donné d' U le nombre ondulatoire prend une valeur pour laquelle la valeur de τ_c est minimale,

$$\frac{d\tau_c}{dk} = \frac{96\mu(\epsilon_m U^2 k - \Gamma d_0^3 k^3)}{(2\epsilon_m U^2 k^2 - 8Y - \Gamma d_0^3 k^4)^2}.$$

La solution triviale $k = 0$ est sans signification car elle impliquerait que les ondes sont infiniment grandes, et donc il faut retenir la solution

$$k^2 = \frac{\epsilon_m U^2}{\Gamma d_0^3}.$$

Insérant cette valeur dans l'expression de la durée critique, on obtient

$$\tau_c = \frac{24\mu}{\frac{\epsilon_m^2 U^4}{\Gamma d_0^3} - 8Y}.$$

Cette expression prend une valeur positive seulement pour les voltages au-dessus de l'amplitude critique donnée par

$$U_c = \sqrt[4]{\frac{8\Gamma Y d_0^3}{\epsilon_m^2}},$$

et les discontinuités se produisent si le voltage transmembranaire $U > U_c$ dure plus longtemps que la correspondante durée critique (voir Fig. 16).

ondulations, et un tel effet devrait avoir comme conséquence des longues ruptures dans la membrane. Cependant, de telles ruptures n'ont jusqu'ici jamais été observées, et la description offerte par le modèle viscohydroélastique, bien que plus plausible que celles des trois modèles décrits précédemment, reste incertaine.

1.3.2.5 Le modèle de transition de phase

Selon tous les modèles présentés jusqu'ici, l'électroperméabilisation est une modification de la structure supramoléculaire de la membrane. Au contraire, le modèle de transition de phase traite le phénomène comme un changement conformationnel des molécules lipidiques dans la membrane (Sugár, 1979). À l'échelle moléculaire, les pressions sont remplacées par des énergies moléculaires, et l'état d'équilibre de pression correspond à l'état d'énergie libre minimale. Si plusieurs états localement minimaux existent, ceci implique que plusieurs états stables sont possibles, chacun correspondant à une phase distincte.⁵

Le modèle de transition de phase est une extension du modèle mécanique statistique de la structure de la membrane lipidique (Jacobs et al., 1975; Jacobs et al., 1977). Selon ce modèle, l'énergie libre de la membrane à une température T et à une surface moléculaire moyenne S est donné par une expression de forme générale

$$W(T, S) = W_f(S) + W_c(T, S) + W_{ic}(T, S) + W_{ih}(T, S),$$

où W_f représente l'énergie de la flexibilité (reflétant des déformations continues, e.g. compression), W_c l'énergie conformationnelle (reflétant des déformations discrètes, e.g. les transitions *cis-trans*), W_{ic} l'énergie des interactions entre les chaînes d'hydrocarbures, et W_{ih} l'énergie des interactions entre les têtes polaires des molécules lipidiques. Malheureusement, dans le modèle mécanique statistique de Jacobs et ses collaborateurs, seulement $W_f(S)$ est une expression ayant un fondement physique, alors que les autres sont des polynômes obtenus par régression des données expérimentales. En outre, le modèle contient plusieurs paramètres arbitraires,⁶ et en adaptant le choix de leurs valeurs, on peut obtenir des résultats aussi proches des données expérimentales que voulus. Tandis que pour cette discussion les expressions spécifiques et les résultats quantitatifs du modèle présentent peu d'intérêt, la description qualitative qu'il fournit est assez réaliste, et donc présente de plus d'intérêt. La Fig. 17 illustre cette description en représentant le graphique de l'énergie libre par molécule en fonction de la surface moyenne occupée par molécule, à quatre températures différentes, et avec des unités arbitraires sur les deux axes.

⁵ Dans des bicouches lipidiques, il y a en général deux de telles phases – la phase solide (gel) et la phase liquide, avec plusieurs sous-classes.

⁶ Dans les articles originaux, à ces paramètres ont été attribués des valeurs qui ont conduit les prévisions théoriques à être en accord avec les données expérimentales, mais les valeurs réelles de ces paramètres n'ont pas été encore mesurées.

Comme le montré la Fig. 17, aux températures au-dessous de T_{c1} , la dépendance entre l'énergie libre et la surface occupée par molécule a un seul minimum, qui correspond à la phase solide (gel), qui est le seul état possible (Fig. 18, gauche). Entre T_{c1} et T_{c2} , un deuxième minimum apparaît, correspondant à la phase liquide. Dans cette gamme de températures, les deux phases peuvent exister, mais la phase qui correspond au minimum absolu est la plus probable. Au-dessus de T_{c2} , le premier minimum disparaît, et la membrane peut seulement exister dans la phase liquide (Fig. 18, centre). Finalement, aux températures au-dessus de T_{c3} , le minimum restant cesse également d'exister, et la membrane se dissout dans l'eau environnante, formant de petites micelles (Fig. 18, droite). Par exemple, pour la bicouche de dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), $T_{c1} \approx 25^\circ\text{C}$, $T_{c2} \approx 40^\circ\text{C}$, and $T_{c3} \approx 165^\circ\text{C}$ (Gennis, 1989).

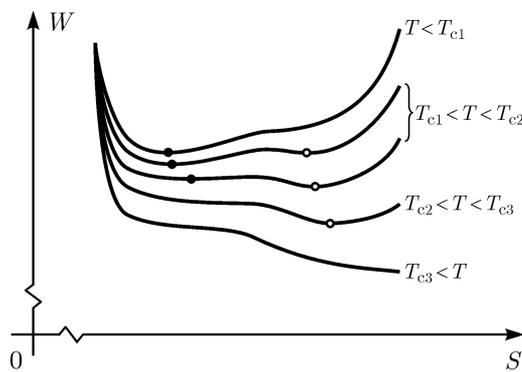


Figure 17

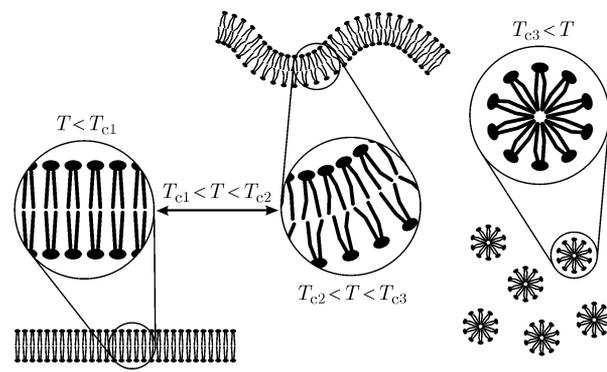


Figure 18

En présence d'un voltage transmembranaire imposé, le modèle décrit ci-dessus doit prendre en compte une composante additionnelle de l'énergie libre – l'énergie électrique W_e . Ainsi, l'énergie libre totale devient

$$W(T, S, U) = W_f(S) + W_c(T, S) + W_{ic}(T, S) + W_{ih}(T, S) + W_e(T, S, U),$$

où l'on a supposé que l'énergie électrique dépend non seulement du voltage transmembranaire, mais aussi de la température et de la surface moléculaire. Dans son modèle, Sugár a dérivé l'approximation suivante pour $W_e(T, S, U)$:

$$W_e(T, S, U) = kT \log \frac{YS}{l\pi kT} - \frac{\epsilon_m^2 S}{128 l^3 Y} U^4,$$

où k représente la constante de Boltzmann, T la température absolue, Y le module d'élasticité des molécules lipidiques dans la direction de leurs chaînes d'hydrocarbures, S la surface moyenne des molécules, l la longueur des chaînes d'hydrocarbures, ϵ_m la constante diélectrique des molécules lipidiques, et U le voltage transmembranaire. Dans cette formule il est évident qu'en présence d'un voltage transmembranaire suffisant, la contribution de l'énergie électrique devient négative, décalant la courbe entière d'énergie libre vers le bas, et ce décalage est plus prononcé pour des surfaces moléculaires plus élevées. La Fig. 19 montre cet effet à une température physiologique T , pour laquelle $T_{c1} < T < T_{c2}$ (pour les raisons décrites ci-dessus, on utilise encore des unités arbitraires

pour les deux axes). À un voltage U_{c1} , le premier minimum d'énergie libre disparaît, forçant la membrane à passer à l'état liquide. À un voltage U_{c2} un peu plus élevé, le minimum restant cesse également d'exister, ce qui mène à la rupture de la membrane. Les états de la membrane lipidique aux divers voltages sont ainsi analogues à ceux correspondant aux diverses températures présentées dans la Fig. 18. En utilisant des valeurs numériques pour tous les paramètres de son modèle, Sugár a calculé que pour la bicouche de DPPC, $U_{c1} \approx 260$ mV et $U_{c2} \approx 280$ mV (Sugár, 1979).

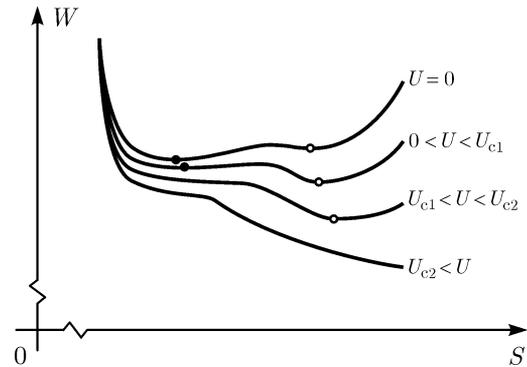


Figure 19

Un comparaison entre les Figs. 17 et 19 prouve que selon le modèle de transition de phase, le voltage transmembranaire agit d'une façon semblable à un échauffement de la membrane. Aux voltages transmembranaires excédant une certaine valeur, une transition se produit de l'état solide à l'état strictement liquide, et à une valeur un peu plus élevée une autre transition a lieu, qui mène à la décomposition de la membrane. Selon ce modèle, l'électroperméabilisation est donc semblable à la désintégration de la membrane aux températures hautes, qui produit des micelles ou des molécules lipidiques séparées. Une telle description de l'électroperméabilisation est très peu réelle, puisqu'au lieu d'une désintégration complète, la membrane électroperméabilisée continue à envelopper le cytoplasme, et la cellule revient souvent à l'état non perméabilisé.

Pour une évaluation objective de la valeur prévue du voltage transmembranaire critique, les paramètres du modèle qui sont actuellement arbitraires doivent être déterminés par des expériences. En outre, ce modèle reste incomplet jusqu'à ce que les expressions obtenues par régression ne soient remplacées par des lois physiques.

Néanmoins, le modèle de transition de phase répond à plusieurs exigences auxquelles les modèles précédents ont tous échoué. L'état électroperméabilisé est un état d'énergie libre minimale, et le retour à l'état non perméabilisé exige un apport suffisant d'énergie, ce qui explique la longue durée de l'état électroperméabilisé. De même, la transition à l'état électroperméabilisé exige également un apport suffisant d'énergie, ce qui explique le rôle de la durée de l'impulsion. Au-dessus du deuxième voltage critique, la pente de la courbe de l'énergie libre vers le bas n'est jamais renversée, menant à la rupture et expliquant la réversibilité limitée de l'électroperméabilisation dans ce cas. Hormis l'explication du rôle du nombre des impulsions, le modèle de transition de phase répond ainsi à toutes les exigences qualitatives de la liste donnée au début de ce chapitre. Ceci implique que l'approche basée sur l'énergie libre est prometteuse.

1.3.2.6 Le modèle de dénaturation

Tous les modèles d'électroperméabilisation présentés jusqu'ici ont un défaut commun – aucun d'eux ne donne une image plausible de la membrane électroperméabilisée. Ce défaut n'est pas retrouvée dans le modèle de dénaturation, qui attribue l'électroperméabilisation à la dénaturation des protéines membranaires (Tsong, 1991). Comme le modèle de transition de phase, le modèle de dénaturation traite les événements sur une échelle moléculaire, en se focalisant sur les protéines membranaires, qui ne sont pas pris en compte dans les cinq modèles précédents.

La membrane cellulaire contient de nombreuses protéines, dont certaines constituent des canaux pour le transport transmembranaire (Section 1.1). Parmi ceux-là ont trouvé les canaux voltage-dépendants, qui sont seulement ouverts si le voltage transmembranaire dépasse une certaine valeur U_t . En conditions physiologiques, de telles voltages ne durent que quelques microsecondes. Pendant cette période, le voltage transmembranaire fournit également la force d'entraînement pour les ions et les molécules polarisées, et leur flux par les canaux représente un courant électrique qui produit une dissipation la chaleur. Aux amplitudes et aux durées des modifications physiologiques du voltage transmembranaire, les effets thermiques sont insignifiants, mais un voltage artificiellement induit avec une amplitude ou une durée largement au-dessus de la gamme physiologique mène à une dissipation élevée de chaleur dans les canaux. Selon le modèle de dénaturation, une impulsion électrique d'amplitude suffisante, $U > U_c$, et de durée suffisante à cette amplitude, $\tau > \tau_c(U)$, cause la dénaturation des canaux voltage-dépendants. Ceci empêche leur fermeture et laisse la membrane dans un état de perméabilité accrue (Fig. 20).

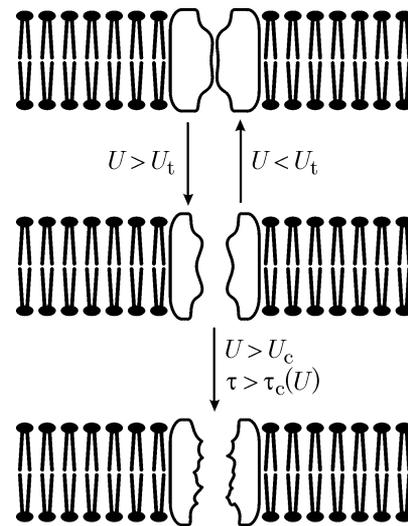


Figure 20

Un désavantage considérable du modèle de dénaturation est qu'il est purement descriptif, et donc ne donne aucune prévision quantitative de l'amplitude critique ou de la durée critique du voltage transmembranaire. En principe, une version quantitative de ce modèle peut être envisagée, mais les calculs précis sont difficiles, car ils devraient prendre en compte le transfert de la chaleur de l'intérieur des canaux aqueux vers les régions adjacentes.

Une désavantage considérable du modèle de dénaturation est qu'il est purement descriptif, et donc ne donne aucune prévision quantitative de l'amplitude critique ou de la durée critique du voltage transmembranaire. En principe, une version quantitative de ce modèle peut être envisagée, mais les calculs précis sont difficiles, car ils devraient prendre en compte le transfert de la chaleur de l'intérieur des canaux aqueux vers les régions adjacentes.

Le modèle de dénaturation décrit la membrane électroperméabilisée, qui est une membrane intacte à l'exception de ses canaux voltage-dépendants, qui restent ouverts de manière permanente. Il offre une explication de la longue durée de l'état électroperméabilisé, car l'état initial est récupéré seulement après que tous les canaux dénaturés aient été retirés de la membrane, et ce processus peut demander plusieurs heures (Ohad et al., 1984). Il explique aussi la dépendance de l'efficacité de l'électroperméabilisation

en fonction de la durée de l'impulsion, puisque seulement les impulsions de durée suffisante ont comme conséquence une dénaturation des canaux. Néanmoins, les données expérimentales prouvent que la dénaturation se produit en quelques millisecondes (Kim et Baldwin, 1982), mais que les impulsions d'une durée de 20 μ s peuvent induire l'électroperméabilisation (Section 1.3.1.5).

La faiblesse cruciale du modèle de dénaturation est le fait que ce modèle prévoit que les protéines membranaires sont responsables de l'électroperméabilisation, alors que ce phénomène se produit également dans des membranes lipidiques pures, des bicouches planes et des vésicules (Section 1.3.1.1). Par conséquent, comme l'auteur du modèle de dénaturation lui-même le propose, ce modèle peut seulement servir en accompagnant un modèle qui décrit l'électroperméabilisation des membranes lipidiques (Tsong, 1991).

1.3.2.7 Le modèle de rupture aux interfaces des domaines lipidiques

Comme le modèle de transition de phase, le modèle de rupture aux interfaces des domaines lipidiques essaye d'expliquer l'électroperméabilisation comme conséquence des instabilités liées aux transitions de phase des molécules lipidiques. Néanmoins, ce modèle tient compte du fait que la membrane cellulaire n'est pas homogène, mais se compose de domaines distincts qui diffèrent dans leur structure lipidique, en particulier par leur contenu en cholestérol. Selon le modèle de rupture aux interfaces des domaines lipidiques, l'électroperméabilisation est localisée aux frontières entre les domaines lipidiques (Cruzeiro-Hansson et Mouritsen, 1988; Cruzeiro-Hansson et al., 1989). L'électroperméabilisation est ainsi interprétée comme une rupture le long des interfaces des domaines lipidiques, comme la Fig. 21 le montre schématiquement.

Comme le modèle viscohydroélastique, le modèle de rupture aux interfaces des domaines lipidiques considère que la perméabilité accrue est un résultat de ruptures, avec la différence que dans le modèle viscohydroélastique ces ruptures se produisent le long des ondulations, alors qu'ici elles se forment le long des interfaces des domaines lipidiques. Par conséquent, comme avec le modèle viscohydroélastique, on peut conclure qu'il est parmi les plus plausibles des modèles décrits jusqu'ici, mais qu'il reste incertain, car de telles ruptures n'ont jamais été observées. Tandis que selon ce modèle l'électroperméabilisation est localisée aux interfaces des domaines lipidiques, le phénomène est également observé dans des bicouches et vésicules artificielles avec une structure lipidique homogène. Donc, comme dans le cas de la dénaturation des protéines, la rupture aux interfaces des domaines lipidiques peut seulement servir comme un mécanisme additionnel, qui peut augmenter l'électroperméabilisation des membranes cellulaires par rapport à celle qui se produit dans les bicouches et les vésicules lipidiques.

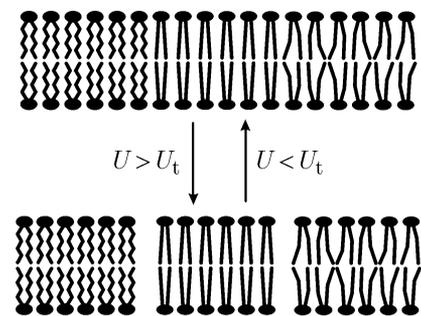


Figure 21

1.3.2.8 Le modèle "standard" de l'électroporation

Dans les quatre premiers modèles traités jusqu'ici – les modèles hydrodynamique, élastique, viscoélastique et viscohydroélastique – l'électroperméabilisation est vue comme un phénomène à grande échelle, où la structure moléculaire de la membrane ne joue aucun rôle. Les deux modèles suivants – les modèles de transition de phase et de dénaturation – représentent l'autre extrême, essayant d'expliquer le phénomène par les modifications de structure moléculaire, pour lesquelles la structure membranaire globale est sans importance.

Un compromis entre ces deux approches est offert par le modèle d'électroporation, qui explique l'électroperméabilisation comme une conséquence de la formation de pores aqueux transitoires dans la bicouche lipidique. Selon ce modèle, chaque pore est constitué par un grand nombre de molécules lipidiques, mais sa forme, sa taille, et sa stabilité sont fortement influencées par la structure spécifique de chacune de ces molécules.

Le modèle d'électroporation sera le dernier décrit ici. Sous sa forme actuelle, il est considéré par la plupart comme étant l'explication théorique de l'électroperméabilisation la plus concluante. Par conséquent, dans les paragraphes suivants le développement de ce modèle est commenté en détails, de son début jusqu'à sa forme actuelle.

Le premier modèle de formation des pores aqueux a été développé indépendamment par deux groupes qui ont analysé la possibilité de formation spontanée de pores dans des bicouches lipidiques (Litster, 1975; Taupin et al., 1975). Selon ce modèle, qui n'a pas expliqué les effets du voltage transmembranaire, la formation d'un pore cylindrique de rayon r change l'énergie libre de la membrane par

$$\Delta W(r) = 2\gamma\pi r - \Gamma\pi r^2,$$

où γ représente la tension du bord, et Γ la tension de surface membranaire. Le premier terme, l'énergie de bord, est positif, puisque le pore crée un bord dans la membrane, avec une longueur qui correspond à la circonférence du pore. Le deuxième terme de l'expression, l'énergie de surface, est négatif, parce qu'un pore réduit la surface de la membrane. Cette expression indique que la modification de l'énergie libre est positive pour les petits pores, et négative pour les pores suffisamment grands. Ceci implique que la formation spontanée d'un pore est empêchée par une barrière d'énergie, et explique la stabilité de la membrane en conditions physiologiques. Le rayon critique pour lequel la barrière d'énergie atteint un maximum et la taille de ce maximum sont

$$r_c = \frac{\gamma}{\Gamma}, \quad \Delta W_c = \Delta W(r_c) = \frac{\pi\gamma^2}{\Gamma}.$$

Avec les valeurs typiques des paramètres du Tableau 1, on obtient $r_c \approx 10$ nm. Si un plus grand pore est artificiellement créé (par exemple en perçant la membrane), la barrière de ΔW_c est dépassée, et comme aucun état stable n'existe pour des plus grands rayons de pore, la membrane se décompose.

Si le pore se forme en présence du voltage transmembranaire, l'énergie capacitive de la membrane augmente. Ceci réduit l'énergie libre de la membrane par la quantité désignée sous le nom d'énergie électrique, qui est donnée par,

$$\Delta W_e = \frac{\epsilon_m \pi r^2}{2d} U^2 - \frac{\epsilon_e \pi r^2}{2d} U^2 = -\frac{(\epsilon_e - \epsilon_m) \pi r^2}{2d} U^2,$$

où ϵ_e représente la constante diélectrique du milieu aqueux qui occupe l'intérieur du pore (approximativement celle de l'eau), et ϵ_m la constante diélectrique de la membrane. En ajoutant ce terme dans l'expression décrivant le changement de l'énergie libre, Abidor et ses collaborateurs ont obtenu une expression plus générale (Abidor et al., 1979),

$$\Delta W(r, U) = 2\gamma\pi r - \Gamma\pi r^2 - \frac{(\epsilon_e - \epsilon_m) \pi r^2}{2d} U^2.$$

Cette expression indique que la présence du voltage transmembranaire réduit le rayon critique du pore et la barrière d'énergie, qui sont maintenant donnés par

$$r_c(U) = \frac{\gamma}{\Gamma + \frac{\epsilon_e - \epsilon_m}{2d} U^2}, \quad \Delta W_c(U) = \Delta W(r_c, U) = \frac{\pi\gamma^2}{\Gamma + \frac{\epsilon_e - \epsilon_m}{2d} U^2}.$$

Avec les valeurs typiques des paramètres du Tableau 1, la Fig. 22 montre l'énergie libre en fonction du rayon du pore en l'absence et en présence du voltage transmembranaire (les lignes continues). En présence d'un voltage transmembranaire de 250 mV, le rayon critique est réduit de $r_c \approx 10$ nm (en dehors de la gamme de graphique) à $r_c \approx 1.93$ nm, et la barrière d'énergie diminue proportionnellement.

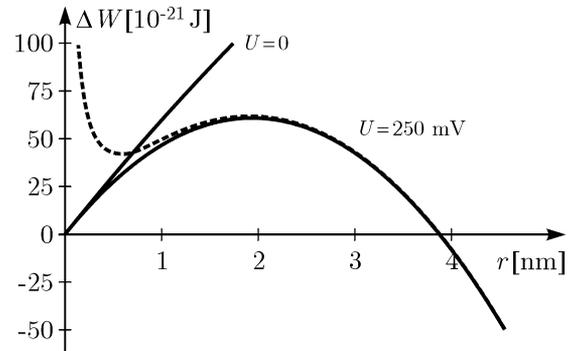


Figure 22

Comme plusieurs des modèles présentés auparavant, cette version du modèle d'électroporation ne fournit pas une image réaliste de la membrane perméabilisée, puisqu'un voltage au-dessus de la valeur critique mène à une rupture complète de la membrane.

Le modèle d'électroporation comme défini ci-dessus a un autre désavantage, qui devient évident en regardant la structure d'un pore aqueux proposée par ce modèle (bas de la Fig. 23).⁷ Comme cette figure le montre, les lipides situés du côté de l'intérieur aqueux du pore sont réorientés de manière à ce que leurs têtes hydrophiles soient face au pore, alors que leurs chaînes hydrophobes sont cachées à l'intérieur de la membrane. Weaver et Mintzer ont prévu qu'à des rayons de plus en plus petits, une telle réorientation exige un apport d'énergie de plus en plus grand (Weaver and Mintzer, 1981), ce qui accroît l'énergie libre de la membrane (Fig. 22, la ligne à tirets). Ils ont proposé que cet effet

⁷ Selon les versions du modèle d'électroporation présentées jusqu'ici, la situation décrite est seulement une image instantanée d'un état transitoire, après quoi la membrane récupère (à $r < r_c$) ou se décompose (pour $r > r_c$).

puisse être analysé en considérant l'énergie de bord comme une fonction $\gamma(r)$ dont la valeur devient plus grande lorsque le rayon du pore diminue, et ainsi

$$\Delta W(r, U) = 2\gamma(r)\pi r - \Gamma\pi r^2 - \frac{(\epsilon_e - \epsilon_m)\pi r^2}{2d} U^2.$$

Malgré cela, Weaver et Mintzer n'ont fourni aucune expression pour la fonction $\gamma(r)$.

La prochaine étape dans l'évolution du modèle d'électroporation a été cruciale, car elle a finalement envisagé un état stable du pore et donc a donné une explication de l'électroperméabilisation (Glaser et al., 1988). La raison qui a mené à cette évolution apparaît dans la Fig. 23. Comme cette figure le montre (et comme l'intuition le suggère), la structure hydrophile du pore peut seulement être obtenue par une transition continue à partir d'un état initial, hydrophobe, dans lequel les lipides ont toujours leur orientation originale. Jusqu'ici, les expressions qui décrivent le changement de l'énergie libre en raison de la formation des pores n'analysent pas encore cette transition, et envisagent un pore hydrophile lors de toutes les étapes de sa formation. Glaser et ses collaborateurs ont raisonnablement prédit que jusqu'au rayon de pore r_p pour lequel l'état hydrophile se forme, la situation énergétique d'un pore hydrophobe doit être analysée. Pour le changement de l'énergie libre dû à un pore hydrophobe, ils ont dérivé l'expression (Insert 8)

$$\Delta W(r, U) = 2\pi d r \Gamma_h \frac{I_1(r/\lambda)}{I_0(r/\lambda)},$$

où Γ_h représente la tension de surface de la surface intérieure du pore hydrophobe, λ le rayon caractéristique d'action des interactions hydrophobes, et I_k la fonction modifiée de Bessel de k -ème ordre. Comme dans le cas du pore hydrophile, le changement total d'énergie libre inclut également un terme qui reflète la diminution de la surface membranaire. Si un voltage est présent sur la membrane, l'énergie électrique doit aussi être ajoutée à cette expression.

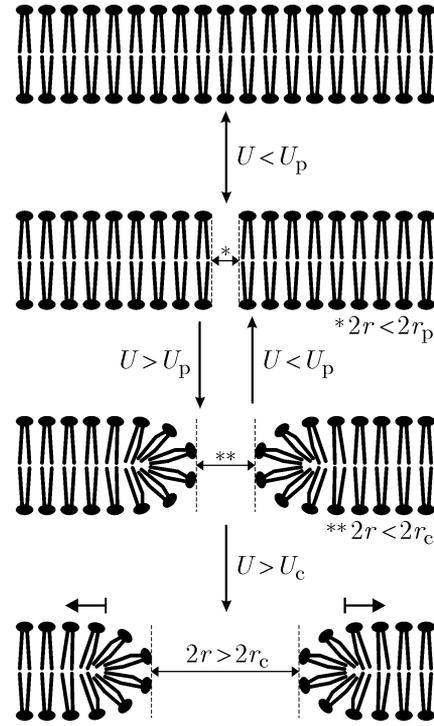


Figure 23

Insert 8: L'énergie du pore hydrophobe

À une distance ρ du centre d'un pore cylindrique de rayon r , la force de l'interaction hydrophobe est donnée par (Leikin et al., 1993)

$$\eta(\rho) = \eta_0 \frac{I_0(\rho/\lambda)}{I_1(r/\lambda)},$$

où η_0 est la valeur de $\eta(\rho)$ à la surface, λ le rayon caractéristique d'action des interactions hydrophobes, et I_k la fonction modifiée de Bessel de k -ème ordre. Le changement de l'énergie libre produit par cette interaction est

$$\Delta W = 2\pi d \int_0^r \left[\eta^2(\rho) + \lambda^2 \left(\frac{d\eta(\rho)}{d\rho} \right)^2 \right] \rho d\rho,$$

où d représente la hauteur du pore (i.e., l'épaisseur de la membrane).

En combinant ces expressions, on obtient

$$W = 2\pi d r \lambda \eta_0^2 \frac{I_0(r/\lambda)}{I_1(r/\lambda)}.$$

À $r \gg \lambda$, on a $I_0(r/\lambda)/I_1(r/\lambda) \rightarrow 1$, et W est proportionnel à la surface de pore S ,

$$W = S \lambda \eta_0^2,$$

ce qui démontre que $\lambda \eta_0^2$ est la tension de surface intérieure du pore hydrophobe, Γ_h . Elle est mesurable, et on écrit alors

$$W = 2\pi d r \Gamma_h \frac{I_1(r/\lambda)}{I_0(r/\lambda)}.$$

Par conséquent, le changement de l'énergie libre de la membrane est maintenant décrit par le système⁸

$$\Delta W(r, U) = \begin{cases} 2\pi dr\Gamma_h \frac{I_1(r/\lambda)}{I_0(r/\lambda)} - \Gamma\pi r^2 - \frac{(\epsilon_e - \epsilon_m)\pi r^2}{2d} U^2; & r < r_p \\ 2\pi r\gamma(r) - \Gamma\pi r^2 - \frac{(\epsilon_e - \epsilon_m)\pi r^2}{2d} U^2; & r > r_p \end{cases}$$

Le rayon de pore r_p pour lequel la transition de l'état hydrophobe à l'état hydrophile se produit correspond à l'intersection de la branche hydrophile et de la branche hydrophobe de ΔW , mais comme la fonction $\gamma(r)$ n'est pas définie, il est également impossible de donner une formulation explicite de r_p .

En utilisant $\lambda = 1$ nm (Israelachvili et Pashley, 1984), $\Gamma_h = 0.05$ Nm⁻¹ (Glaser et al., 1988), et avec les autres valeurs du Tableau 1, nous pouvons esquisser les deux branches de ΔW dans le même graphique, comme la Fig. 24 le montre. Pour des voltages transmembranaires de 250 mV et 350 mV, les lignes continues donnent la résultante des branches hydrophobe et hydrophile, et les lignes à tirets sont les extrapolations de ces deux branches au delà de leurs domaines effectifs.

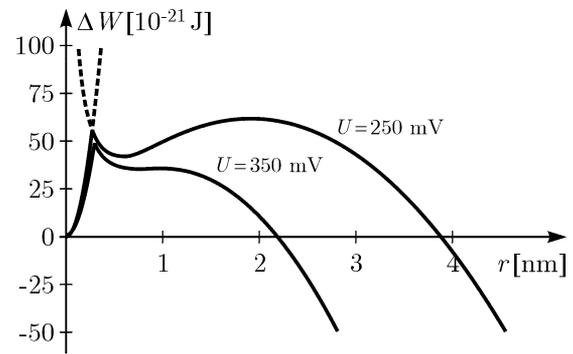


Figure 24

Malheureusement, la branche hydrophile est quelque peu fictive, car le $\gamma(r)$ non défini empêche de représenter cette branche de manière quantitative.

Le modèle de la formation des pores illustré par les Figs. 23 et 24 représente ce qui est aujourd'hui nommé le modèle "standard" de l'électroporation. Selon ce modèle, le voltage transmembranaire réduit l'énergie nécessaire pour une transition de l'état hydrophobe⁹ à l'état hydrophile. Puisqu'ils correspondent à un minimum local d'énergie libre, les pores hydrophiles sont stables, ce qui explique la longue durée de l'état électroperméabilisée. La réversibilité de cet état est limitée parce qu'un voltage au-dessus de la valeur critique cause une rupture irréversible de la membrane.

⁸ Certains auteurs écrivent les deux équations sans prendre en compte l'énergie de surface (le deuxième terme), raisonnant que la surface de la membrane reste constante, et que le volume de cellules augmente (Weaver et Chizmadzhev, 1996). Cependant, l'énergie électrique (le troisième terme) devrait également être modifiée de façon analogue, ce qui donnerait

$$\Delta W(r, U) = \begin{cases} 2\pi dr\Gamma_h \frac{I_1(r/\lambda)}{I_0(r/\lambda)} - \frac{\epsilon_e \pi r^2}{2d} U^2; & r < r_p \\ 2\pi r\gamma(r) - \frac{\epsilon_e \pi r^2}{2d} U^2; & r > r_p \end{cases}$$

une formule encore plus simple dans laquelle l'effet du voltage transmembranaire est un peu plus fort. Une telle modification de l'énergie libre n'est jamais présentée.

⁹ En raison des fluctuations thermiques latérales des molécules lipidiques, les pores hydrophobes d'une durée de quelques picosecondes sont toujours présents dans la membrane en une certaine quantité.

D'un point de vue qualitatif, la dépendance de l'électroperméabilisation par rapport à la durée de l'impulsion est aussi expliquée par le modèle d'électroporation, puisque la formation des pores exige un apport d'énergie suffisant pour la transition à l'état hydrophile. Dans les modèles d'électroporation, y compris le modèle standard, le voltage transmembranaire ne cause pas lui-même la formation des pores hydrophiles, mais la facilite, ce qui peut expliquer la stochasticité de l'électroperméabilisation. Comme les Figs. 22 et 24 l'attestent, les valeurs auxquelles cet effet facilitant devient prononcé sont en bon accord avec les observations expérimentales.

Néanmoins, le modèle standard de l'électroporation a deux déficiences significatives. La première est clairement observable dans la Fig. 24: avec des valeurs réalistes des paramètres, le voltage transmembranaire réduit la barrière de la transition hydrophobe-hydrophile, mais il réduit la barrière de la rupture irréversible de façon beaucoup plus forte. De cette manière, aux voltages transmembranaires au-dessus de ≈ 361 mV, la barrière de la formation des pores est réduite de seulement quelques pour cents, mais le minimum local de l'énergie libre est supprimé entièrement, et ainsi à ces voltages, après la formation du pore, une rupture irréversible devrait être imminente. Cet effet est indépendant du choix de $\gamma(r)$, puisqu'il est régi exclusivement par la composante électrique de l'énergie libre. Le manque de définition de $\gamma(r)$ est la deuxième déficience principale du modèle standard de l'électroporation. En l'absence de cette définition, les expressions qui décrivent la barrière d'énergie qui empêche la transition de l'état hydrophobe à l'état hydrophile, et le rayon minimum d'un pore hydrophile, r_p , restent également non définis. Cette imperfection sera probablement corrigée dans un proche avenir, soit théoriquement, par une dérivation d'une loi physique qui définirait le $\gamma(r)$, ou expérimentalement, par une mesure de ses valeurs. Sur le long terme, la première alternative est certainement préférable.

Les paragraphes suivants concluent la discussion des modèles théoriques de l'électroperméabilisation par une vue d'ensemble courte des diverses révisions du modèle standard de l'électroporation qui ont été proposées par différents auteurs.

1.3.2.9 Révisions du modèle "standard" de l'électroporation

Ces dernières années, on a proposé plusieurs approches pour améliorer le modèle "standard" de l'électroporation présenté dans la section précédente. Deux de celles-ci (Barnett et Weaver, 1991; Freeman et al., 1994) ont amélioré la prévision douteuse de ce modèle selon laquelle le voltage transmembranaire facilite surtout la rupture irréversible. Barnett et Weaver ont considéré qu'un pore modifie aussi l'énergie conductive de la membrane, et ils ont reformulé l'énergie électrique de la façon suivante¹⁰

$$\Delta W_e = -\frac{(\epsilon_e - \epsilon_m)\pi}{d} U^2 \int_0^r \frac{\rho d\rho}{(1 + \lambda(\rho))^2},$$

¹⁰ Avec $\lambda(\rho) = 0$, on retrouve le ΔW_e du modèle standard (i.e., le résultat dérivé par Abidor et ses collaborateurs).

avec

$$\lambda(\rho) = \frac{\pi \rho \sigma_p}{2d \sigma_e},$$

où σ_e représente la conductivité du milieu aqueux en dehors du pore, et σ_p la conductivité à l'intérieur du pore. La valeur exacte du σ_p dépend des propriétés des têtes lipidiques et du milieu aqueux, mais il est plausible d'estimer que $\sigma_p \approx \sigma_e$. Avec cette approximation, on a

$$\lambda(\rho) = \frac{\pi \rho}{2d},$$

et ainsi l'énergie électrique est donnée par

$$\Delta W_e = -(\epsilon_e - \epsilon_m) U^2 \left(\frac{4d \log\left(1 + \frac{\pi r}{2d}\right)}{\pi} - \frac{2r}{1 + \frac{\pi r}{2d}} \right).$$

La Fig. 25 compare, pour un voltage transmembranaire de 350 mV, le changement d'énergie libre de la membrane introduit par la modification de l'énergie électrique décrite au-dessus (la ligne continue) et sans cette modification (la ligne à tirets). La courbe corrigée du changement d'énergie libre montre une gamme sensiblement élargie pour les rayons des pores stables. Le voltage qui

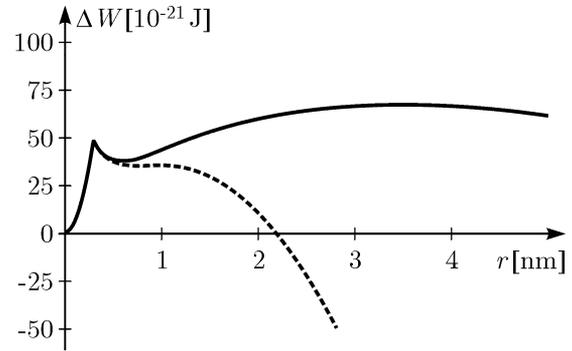


Figure 25

mène à une rupture irréversible est décalé jusqu'à ≈ 458 mV, qui est une amélioration en ce qui concerne la valeur précédente de ≈ 361 mV, bien qu'il est toujours relativement bas. Comme dans le modèle standard, dans ce modèle révisé l'effet facilitant du voltage transmembranaire sur la formation des pores aqueux est très faible.

Freeman et ses collaborateurs (Freeman et al., 1994) ont essayé d'améliorer ce modèle en prenant en considération l'énergie nécessaire aux particules chargées pour traverser le pore (l'énergie de Born), ce qui a mené à une expression plus compliquée pour le $\lambda(\rho)$. Cependant, leur résultat est basé sur une régression des données expérimentales à des polynômes, et il ne sera pas discuté en détail ici.

Une autre étude a analysé l'effet de la différence entre les osmolarités du milieu extracellulaire et du cytoplasme (Weaver et Chizmadzhev, 1996). Pour analyser cet effet, le changement de l'énergie libre doit incorporer le changement de l'énergie osmotique généré par la formation d'un pore,

$$\Delta W_{\text{osm}} = -\frac{|p_e - p_i| R}{2} \pi r^2$$

où p_e et p_i représentent respectivement les pressions osmotiques dans le milieu

extracellulaire et dans le cytoplasme, et R le rayon de la cellule. L'énergie osmotique agit ainsi autant que l'énergie extérieure et l'énergie électrique - elle réduit l'énergie libre de la membrane, et elle est proportionnelle à r^2 . Ceci implique qu'une différence entre les osmolarités rend la membrane plus réceptive aux effets du voltage transmembranaire, ce qui a été confirmé par des expériences (Rols et Teissié, 1990b; Golzio et al., 1998).

Récemment, l'effet de la courbure de la membrane sur l'électroporation a aussi été analysé (Neumann et al., 1999). À la différence des bicouches planes, la membrane de cellules est courbée, et la courbure augmente avec la diminution du rayon des cellules. Selon les calculs de Neumann et de ses collaborateurs, le changement de l'énergie de courbure provoqué par la formation d'un pore est

$$\Delta W_{\text{crv}} = -\frac{64Y}{Rd}\pi^2 r^2,$$

où Y représente le module d'élasticité de la membrane, et R est le rayon de la cellule. Ceci prouve que la courbure réduit l'énergie libre de la membrane et implique que, à un voltage transmembranaire donné, l'électroporation est plus intense pour des cellules plus petites.¹¹

Aujourd'hui, la majorité de chercheurs considèrent l'électroporation comme l'explication la plus concluante de l'électroperméabilisation. Si à l'avenir elle préserve cette position, la recherche future, et en particulier les mesures des quantités physiques appropriées, auront graduellement comme conséquence l'amélioration du modèle standard. Il est raisonnable de compter que certaines des améliorations proposées décrites ci-dessus seront bientôt incorporées au modèle standard, alors que des propositions entièrement nouvelles continueront à apparaître. Il est également raisonnable d'attendre qu'une formulation de la fonction $\gamma(r)$ devrait être donnée dans un proche avenir. On peut espérer qu'une méthode avancée de visualisation ou un type différent de détection fournira un jour une image de la membrane électroperméabilisée à une échelle de quelques nanomètres, et permettra d'obtenir, de ce fait, une évaluation sûre de la validité du concept d'électroporation.

¹¹ Cela est valable pour un voltage transmembranaire donné, mais pas pour une amplitude d'impulsion donnée, puisque le voltage transmembranaire induit par l'impulsion est proportionnel au rayon des cellules (Section 1.2.2).

1.3.3 Traitement théorique du transport transmembranaire

Tandis que la section précédente s'est concentrée sur l'électroperméabilisation elle-même, cette section s'occupe de la conséquence la plus importante de ce phénomène – le transport à travers la membrane électroperméabilisée. En complément des nombreuses études expérimentales qui ont quantitativement évalué ce transport (Section 1.3.1.4), une description théorique appropriée du transport à travers la membrane électroperméabilisée a une importance incontestable. Alors que les études expérimentales peuvent seulement se concentrer sur le transport d'un type spécifique de molécules, un traitement théorique peut fournir une image beaucoup plus large, décrivant l'entrée des molécules exogènes en général, et aussi la sortie des molécules endogènes.¹²

Il y a trois mécanismes généraux de transport transmembranaire:

- *la diffusion*, générée par le gradient de concentration moléculaire à travers la membrane;
- *l'électrophorèse*, générée par le gradient de potentiel électrique à travers la membrane; et
- *l'osmose*, générée par la différence entre les pressions osmotiques au niveau des deux côtés de la membrane.

Dans les sous-sections suivantes, chacun de ces trois mécanismes est traité séparément. Un accent substantiel est mis sur la diffusion, car c'est le mécanisme qui guide le transport des petites molécules, et qui a été exploité au cours du travail expérimental de cette thèse. L'électrophorèse joue un rôle important surtout dans le transport des macromolécules telles que l'ADN (Klenchin et al., 1991; Sukharev et al., 1992; Rols et Teissié, 1998a; Neumann et al., 1999), et le transport par osmose nécessite une différence entre les pressions osmotiques au niveau des deux côtés de la membrane qui n'a pas été abordée dans notre travail. Ces deux derniers mécanismes seront traités avec moins de détail.

1.3.3.1 Transport par diffusion

Quand la membrane est électroperméabilisée, la différence entre les concentrations des molécules du type M en dehors et à l'intérieur de la cellule a comme conséquence la diffusion de ces molécules à travers la membrane vers le compartement où la concentration est la plus faible. Le flux des molécules à travers la membrane au temps t après le début de l'électroperméabilisation peut être généralement écrit comme

$$\Phi_M(U, N, T, F, t) = \Delta C_M(t) \int_{\substack{S(U, N, T, F) \\ \xi=(x, y, z) \in S}} P_M(U, N, T, F, \xi, t) dS,$$

où ΔC_M représente la différence entre la concentration externe et la concentration

¹² Tandis que l'entrée des molécules dans la cellule représente le motif principal d'utilisation de l'électroperméabilisation, une telle entrée est accompagnée par une sortie des molécules cytoplasmiques, qui est délétère pour les cellules, et peut finalement mener à leur mort. Ceci rend l'évaluation de la sortie également importante.

interne des molécules M , S la surface de la région électroperméabilisée de la membrane, P_M la perméabilité diffusive de la membrane¹³ pour les molécules M , U l'amplitude des impulsions, N le nombre d'impulsions, T la durée de chaque impulsion, \mathcal{F} symbolise la forme d'impulsion, et ξ donne l'endroit sur la surface de l'intégration (i.e., la surface perméabilisée S).

Pour se diriger vers des expressions plus simples, on peut faire diverses hypothèses:

1) Si la perméabilité de la membrane est constante au niveau de toute la surface perméabilisée (i.e., si P_M est indépendant de U et de ξ), le flux moléculaire devient

$$\Phi_M(U, N, T, \mathcal{F}, t) = \Delta C_M(t) P_M(N, T, \mathcal{F}, t) S_p(U, N, T, \mathcal{F}).$$

où S_p représente l'aire de la surface perméabilisée S .

Tandis que l'hypothèse d'une valeur de P_M constante dans la surface perméabilisée élimine la nécessité d'intégrer sur S , on doit discuter brièvement la plausibilité d'une telle hypothèse. Puisque le voltage transmembranaire induit par une impulsion électrique d'une amplitude donnée U est position-dépendant (Section 1.2.2), supposer que la P_M est indépendante de ξ est équivalent à postuler que la P_M est indépendante du voltage transmembranaire – pourvu qu'une valeur-seuil U_c soit dépassée. Plus formellement, cette hypothèse peut être formulée comme

$$P_M = \begin{cases} 0, & |U_{TI} + U_{TR}| < U_c \\ P_{M0}, & |U_{TI} + U_{TR}| \geq U_c \end{cases} \quad (1)$$

où U_{TR} représente le voltage transmembranaire de repos (Section 1.2.1), et U_{TI} le voltage transmembranaire induit.

D'une part, une telle hypothèse est soutenue par le fait que le voltage transmembranaire s'effondre en moins qu'une microseconde après le début d'une impulsion qui produit l'électroperméabilisation¹⁴ (Hibino et al., 1993; voir Section 1.3.1.2). D'autre part, l'effondrement n'est pas complet, et donc le voltage induit joue également un rôle après que l'effondrement soit achevé. Les effets plus prononcés de l'électroperméabilisation pour des amplitudes d'impulsions plus élevées ne sont pas nécessairement une conséquence d'une P_M élevée, mais peuvent aussi être le résultat d'un plus grand aire électroperméabilisée de la membrane. Néanmoins, le voltage induit pourrait aussi jouer un rôle avant son effondrement, ce qui rend la P_M dépendante de l'amplitude de l'impulsion, et de la position sur la membrane.

¹³ P_M [m s^{-1}] est définie comme le coefficient de diffusion de la membrane pour les molécules M , D_M [$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$], divisé par l'épaisseur de la membrane, d [m].

¹⁴ Ceci ne veut pas dire que la membrane atteint l'état perméabilisé définitif pendant la première microseconde après le début de l'impulsion. Les expériences potentiométriques de Hibino et de ses collaborateurs impliquent seulement qu'au cours de cette période, la conductivité de la membrane augmente au moins par deux ordres de grandeur. Comme des impulsions d'une durée au-dessous de 10 μs ne produisent aucun transport perceptible à travers la membrane (Sections 1.3.1 et 3.2.1), l'évolution de la membrane perméabilisée vers l'état où le transport des molécules devient possible dure apparemment au moins quelques microsecondes.

2) Pour le calcul du S_p , il est habituel de supposer (i) qu' $U_{TR} = 0$, (ii) que les cellules sont sphériques, et (iii) que l'électroperméabilisation se produit aux endroits où une certaine valeur critique du voltage transmembranaire, U_c , est dépassée, indépendamment des valeurs de N , T , et \mathcal{F} . Ainsi, S_p peut être écrit comme (voir l'Insert 9 pour des détails de la dérivation)

$$S_p = 4\pi R^2 \begin{cases} 0, & U_{TI0} < U_c \\ 1 - U_c / U_{TI0}, & U_{TI0} \geq U_c \end{cases} \quad (2)$$

où U_{TI0} représente la valeur maximale du voltage transmembranaire induit (i.e., l' U_{TI} au deux pôles de la cellule qui font face aux électrodes) qui peut être estimé comme (Section 1.2.2)

$$U_{TI0} \approx \frac{1.5UR}{l}, \quad (3)$$

où U représente l'amplitude de l'impulsion, et l la distance entre les électrodes.

Pour une cellule donnée, U_c a une valeur constante, et ainsi

$$\Phi_M(U, N, T, \mathcal{F}, t) = \Delta C_M(t) P_M(N, T, \mathcal{F}, t) S_p(U, \mathcal{F}),$$

avec S_p défini par (2) et U_{TI0} donné par (3).

Les valeurs typiques d' U_c dépassent les valeurs typiques du voltage transmembranaire de repos d'au moins un facteur cinq (Sections 1.2.1 et 1.3.2.1), et la marge d'erreur introduite par l'ignorance du voltage transmembranaire de repos n'est pas ainsi très

Insert 9: L'aire de la membrane où le voltage transmembranaire dépasse la valeur-seuil U_c (à $U_{TR} = 0$)

L'aire d'une coupole sphérique est indiquée par

$$S_c = 2\pi R^2 (1 - \cos \varphi_c),$$

où R représente le rayon de la sphère, et φ_c l'angle polaire mesuré à partir du centre de la sphère au bord de la coupole (voir la figure).

Le voltage transmembranaire induit sur une sphère est donné par (Section 1.2.2)

$$U_{TI} = U_{TI0} \cos \varphi,$$

où U_{TI0} représente la valeur maximale d' U_{TI} .

Ainsi, en l'absence du voltage de repos, un voltage transmembranaire au-dessus d'une valeur critique, $|U_{TI}| \geq U_c$, se produit à

$$|\cos \varphi| \geq \cos \varphi_c = U_c / U_{TI0},$$

ce qui nous permet de formuler l'aire S_c comme

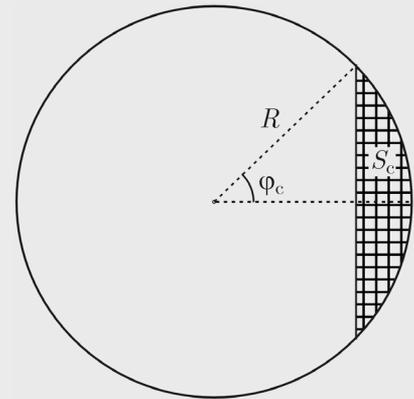
$$S_c = 2\pi R^2 (1 - U_c / U_{TI0}).$$

La même situation se produit aux coupoles faisant face à chacune des électrodes, et donc la surface totale électroperméabilisée S_p est donnée par

$$S_p = 2S_c = 4\pi R^2 (1 - U_c / U_{TI0}),$$

pour $U_{TI0} \geq U_c$, et $S_p = 0$ autrement.

Cette dérivation ignore le voltage de repos qui est en réalité également présent sur la membrane. Le voltage de repos réduit le voltage transmembranaire total à un pôle, et l'augmente de la même quantité au pôle opposé. L'expression qui prend cet effet en considération sera donnée dans la Section 4.4.



grande, mais elle n'est pas négligeable. Dans la Section 4.4, on discutera de cette marge d'erreur et de ses implications plus en détail.

3) Si le temps écoulé après le début de l'électroperméabilisation est beaucoup plus court que la constante de temps qui caractérise l'équilibration des concentrations de M, leur différence peut être considérée comme une constante, et on obtient

$$\Phi_M(U, N, T, F, t) = \Delta C_M P_M(N, T, F, t) S_p(U, F), \quad (4)$$

4) Abstraction faite de \mathcal{F} , et avec l'hypothèse que P_M diminue avec le temps de manière exponentielle,

$$P_M(N, T, t) = P_{M0}(N, T) e^{-k(N, T)t},$$

on obtient – excepté pour la notation – l'expression dérivée par Rols et Teissié (Rols et Teissié, 1990a; Rols et Teissié, 1998a),

$$\Phi_M(U, N, T, t) = \Delta C_M P_{M0}(N, T) A(1 - U_c / U_{TI0}) e^{-k(N, T)t}.$$

où $A = 4\pi R^2$ représente l'aire de la membrane, et $U_{TI0}(U)$ est donné par (3).

Pour obtenir le montant total des molécules transportées pendant la durée t après le début de l'électroperméabilisation, le flux moléculaire est intégré par rapport au temps,

$$N_M(U, N, T, F, t) = \int_0^t \Phi_M(U, N, T, F, \tau) d\tau. \quad (5)$$

Un des objectifs principaux de ce travail doit contribuer à la connaissance, et peut-être à la compréhension, du rôle des divers paramètres des impulsions dans le transport transmembranaire des molécules, qui est le but primaire de l'électroperméabilisation. Les expressions (4) et (5) représentent le fondement pour une évaluation analytique de ce rôle. À partir de cette évaluation, on peut espérer obtenir des indications qui permettront d'ajuster les paramètres des impulsions en vue de l'augmentation de l'efficacité de l'électroperméabilisation *in vitro*.

1.3.3.2 Transport par électrophorèse

L'électrophorèse représente un autre mécanisme de transport transmembranaire qui, à la différence de la diffusion, est actif seulement pendant l'impulsion électrique, et fonctionne seulement pour les molécules chargées. Par des expériences, on a établi que la force d'entraînement électrophorétique joue un rôle important dans le transport des macromolécules (Rols and Teissié, 1998a). Par contre, l'électrophorèse n'a pas une forte incidence dans le transport des petites molécules, pour lesquelles le transport se produit surtout par diffusion. Ceci a mené à une distinction relativement pointue entre les protocoles d'électroperméabilisation utilisés pour le transport de petites molécules et ceux utilisés pour l'internalisation des macromolécules. Pour le transport des petites molécules, l'électroperméabilisation suffit, et les impulsions avec des durées de quelques dizaines de microsecondes jusqu'à plusieurs millisecondes réalisent ce but

avec succès. Par contre, le transport électrophorétique des macromolécules se manifeste seulement pendant l'impulsion, et pour réaliser une entrée suffisante de macromolécules, les impulsions de durées typiques comprises entre quelques millisecondes et quelques dizaines de millisecondes sont utilisées (Wolf et al., 1994; Rols et Teissié, 1998a; Mir et al., 1999). Pour molécules ayant une concentration extracellulaire C_M et une charge électrique e_M , le flux à travers la membrane est donné par

$$\Phi_M(U, N, T, F, t) = C_M(t) e_M^2 \int_{\substack{S(U, N, T, F) \\ \xi=(x, y, z) \in S}} [U_i(U, \xi) + U_r] P_{ME}(U, N, T, F, \xi, t) dS,$$

où P_{ME} représente la perméabilité électrophorétique de la membrane¹⁵ pour les molécules M, le reste de la notation étant le même que dans la Section 1.3.3.1.

Comme dans le cas de la diffusion, la quantité totale des molécules transportées par électrophorèse est obtenu par l'intégration par rapport au temps. Néanmoins, alors que pour la diffusion l'intégration s'étend toujours jusqu'au temps t écoulé après le début de l'électroperméabilisation, pour l'électrophorèse la limite supérieure de l'intégration est la durée de l'impulsion t_F . Ainsi, la quantité totale des molécules transportées est donné par

$$N_M(U, N, T, F, t) = \begin{cases} \int_0^t \Phi_M(U, N, T, F, \tau) d\tau, & t \leq t_F \\ \int_0^{t_F} \Phi_M(U, N, T, F, \tau) d\tau, & t > t_F \end{cases}$$

Pour les expressions ci-dessus, des hypothèses analogues au cas de la diffusion peuvent être postulées, menant à des simplifications similaires. En outre, si l'électroperméabilisation est modélisée par l'électroporation (Section 1.3.2.8), une analyse spécifique peut être exécutée pour le transport électrophorétique à travers des pores aqueux cylindriques (Parsegian, 1969; Weaver et Chizmadzhev, 1996).

1.3.3.3 Transport par osmose

Si les pressions osmotiques sur les deux côtés de la membrane ne sont pas égales, un flux du soluté se produit à travers la membrane électroperméabilisée dans la direction de l'équilibration des pressions. Pour une différence des pressions osmotiques Δp et pour une concentration C_M des molécules M dans la solution, le flux à travers la membrane est donné par

$$\Phi_M(U, N, T, F, t) = C_M(t) \Delta p(t) \int_{\substack{S(U, N, T, F) \\ \xi=(x, y, z) \in S}} P_{MP}(U, N, T, F, \xi, t) dS,$$

où P_{MP} représente la perméabilité osmotique de la membrane¹⁶ pour les molécules M, le

¹⁵ i.e., la perméabilité par unité de voltage transmembranaire et par le carré de la charge des molécules M [$\text{ms}^{-1}\text{C}^{-2}\text{V}^{-1}$].

¹⁶ i.e., la perméabilité par unité de différence des pressions osmotiques sur les deux côtés de la membrane [$\text{ms}^{-1}\text{Pa}^{-1}$].

reste de la notation étant le même que dans la Section 1.3.3.1.

La quantité de molécules transportées à travers la membrane est encore calculée par intégration, et comme dans le cas de la diffusion, le transport osmotique n'est pas limité à la durée de l'impulsion,

$$N_M(U, N, T, F, t) = \int_0^t \Phi_M(U, N, T, F, \tau) d\tau.$$

Dans le cas du transport osmotique, la différence des pressions osmotiques change également avec le temps, et l'intégrale donné ci-dessus peut seulement être transformée à une expression élémentaire pour les durées pendant lesquelles le changement de la concentration et le changement de la différence de pression sont insignifiants. Dans le modèle de l'electroporation, une analyse plus détaillée est possible pour le transport osmotique à travers les pores aqueux cylindriques (Weaver et Chizmadzhev, 1996).

CHAPITRE 2

Résultats théoriques: modèles du voltage transmembranaire induit

Ce chapitre présente des considérations théoriques sur la validité de quatre approximations faites dans la théorie classique du voltage transmembranaire induit (voir la Section 1.2.2).

La théorie classique suppose que la membrane est entièrement non conductive, et sur cette hypothèse le voltage transmembranaire induit dépend seulement du champ électrique et du rayon de la cellule. Dans la Section 2.1, nous considérons le cas plus général d'une membrane conductive, et nous analysons la sensibilité du voltage transmembranaire induit aux conductivités de la membrane, du milieu externe et du cytoplasme, aussi bien que du rayon de cellules. On étudie également le rôle de ces paramètres dans la constante de temps de l'induction comme elle est formulée par la théorie classique.

La théorie classique fournit un outil pour l'évaluation au cours du temps du voltage transmembranaire induit par des impulsions rectangulaires et des ondes sinusoïdales. Dans la Section 2.2, nous développons une méthode d'analyse au cours du temps du voltage transmembranaire induit par un champ électrique général qui varie avec le temps, et nous appliquons cette méthode pour analyser l'induction du voltage transmembranaire par des impulsions exponentielles, des impulsions rectangulaires modulées par des ondes sinusoïdales, et des trains d'impulsions rectangulaires.

Selon la théorie classique, le processus d'induction du voltage transmembranaire est un processus de premier ordre, et pour des champs alternatifs ayant des fréquences au-dessous de 1 MHz, cette approximation est entièrement valide. Dans la Section 2.3, nous développons un modèle plus général de l'induction par des champs alternatifs, attribuant au cytoplasme, à la membrane, et au milieu externe non seulement des conductivités électriques, mais aussi des constantes diélectriques. Ceci mène à un modèle de deuxième ordre, et nous analysons les différences entre les prévisions de ce modèle et le modèle classique de premier ordre.

Les équations de la théorie classique ont été dérivées uniquement pour le cas des cellules sphériques, et ceci est seulement applicable à certaines cellules en suspension. En outre, il y a des cellules avec des formes beaucoup plus aplaties (telles que les

érythrocytes) et aussi des formes beaucoup plus allongées (telles que les bacilles) que celle de la sphère. Dans la Section 2.4, nous dérivons l'analogie de l'équation de Schwan pour les cellules sphéroïdales aplaties et allongées, et nous démontrons que nous pouvons obtenir des distributions du voltage transmembranaire induit sur la membrane qui sont loin de la loi de cosinus donnée par l'équation de Schwan.

2.1 ARTICLE 1

Sensitivity of transmembrane voltage induced by applied electric fields — a theoretical analysis

[Analyse théorique de la sensibilité du voltage transmembranaire induit par des champs électriques]

Publié dans *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 43: 285-291, 1997

Sommaire: La dépendance du voltage transmembranaire induit par rapport à la conductivité du milieu extracellulaire, la conductivité de la membrane, la conductivité cytoplasmique, le rayon des cellules et la durée d'impulsion électrique ont été étudiés. Nous avons dérivé d'abord la formule qui donne le voltage transmembranaire induit pour le cas où des conductivités différentes de zéro sont attribuées au cytoplasme, à la membrane, et au milieu extracellulaire:

$$\Delta\Phi = \frac{3}{2} \frac{\lambda_o [3dR^2\lambda_i + (3d^2R - d^3)(\lambda_m - \lambda_i)]}{R^3(\lambda_m + 2\lambda_e)(\lambda_m + \frac{1}{2}\lambda_i) - (R-d)^3(\lambda_o - \lambda_m)(\lambda_i - \lambda_m)} ER \cos \varphi$$

où λ_i , λ_m et λ_o représentent respectivement les conductivités électriques du cytoplasme, de la membrane cellulaire et du milieu extracellulaire, R le rayon de la cellule, d l'épaisseur de la membrane, et φ l'angle polaire mesuré à partir du centre de la cellule par rapport à la direction du champ.¹ Il est facile de vérifier que l'attribution de $\lambda_m = 0$ mène à l'annulation de d , λ_i et λ_e , et que de ce fait la simplification de la formule donnée ci-dessus se produit, menant à l'équation de Schwan.²

Cette étude prouve que les variations de la conductivité de la membrane, de la conductivité cytoplasmique et du rayon des cellules dans des marges des valeurs physiologiques n'influencent pas le voltage transmembranaire induit d'une manière importante. Ceci est valable à la condition que la conductivité extracellulaire corresponde aussi aux conditions physiologiques, et que la durée de l'impulsion électrique soit au-dessus de 10 μ s.

¹ Cette équation est valable seulement dans le cas d'une membrane d'épaisseur et de conductivité constantes.

² Certains journaux exigent l'utilisation de symboles spécifiques pour désigner certaines quantités, et malheureusement, ces conditions diffèrent d'un journal à l'autre. Ainsi, dans cet article et dans l'article de la Section 2.2, la conductivité électrique est désignée par λ , alors que dans le texte de cette thèse, ainsi que dans les articles des Sections 2.3 et 2.4, la conductivité électrique est désignée par σ .

Cependant, si la conductivité extracellulaire est réduite aux valeurs typiques des "milieux de basse conductivité", le voltage transmembranaire induit diminue considérablement, et le temps de chargement de la membrane augmente jusqu'à une valeur de quelques millisecondes. Ceci augmente l'amplitude et la durée minimales des impulsions électriques capables de produire une électroperméabilisation des cellules. Dans des "milieux de basse conductivité", le voltage transmembranaire induit est aussi largement plus sensible aux variations du rayon de cellules, de la conductivité de la membrane, et de la conductivité cytoplasmique. De tels milieux sont employés dans beaucoup d'études concernant les effets du champ électrique sur des cellules *in vitro*. Notre étude montre que dans ces cas, pour évaluer le voltage transmembranaire induit, il est important de prendre en considération les valeurs des conductivités et du rayon des cellules utilisées, ainsi que la durée des impulsions électriques appliquées.

Sensitivity of transmembrane voltage induced by applied electric fields—a theoretical analysis

Tadej Kotnik, Feđa Bobanović^{*}, Damijan Miklavčič

University of Ljubljana, Faculty of Electrical Engineering, Tržaška 25, 1000 Ljubljana, Slovenia

Received 4 December 1996; revised 20 January 1997

Abstract

The sensitivity of induced transmembrane voltage to extracellular conductivity, membrane conductivity, cytoplasmic conductivity, cell radius and electric pulse duration has been studied. The study showed that variations of membrane conductivity, cytoplasmic conductivity and cell radius within the ranges of their physiological values do not influence induced transmembrane voltage substantially, provided that extracellular conductivity also corresponds to the physiological conditions, and duration of the electric pulse is in range of 10 μ s or longer. However, when extracellular conductivity is reduced to the values typical for a “low conductivity” medium, the induced transmembrane voltage decreases considerably, while the charging time of the membrane increases up to the range of 1 ms. This increases the necessary amplitude and duration of electric pulses used for electroporation. In a “low conductivity” medium, the induced transmembrane voltage is also much more sensitive to variations in cell radius, membrane conductivity, and cytoplasmic conductivity. Such a medium is used in many in vitro studies of the effects of an electric field upon single cells. Our study shows that in these cases, in order to evaluate the induced transmembrane voltage, it is important to consider the values of conductivities and radii of cells used in the experiment, as well as the duration of the electric pulses used. © 1997 Elsevier Science S.A.

Keywords: Electric field stimulation; Electroporation; Transmembrane voltage; Low conductivity medium; Pulse duration

1. Introduction

Most known biological effects of externally applied electric fields are based on a field-induced change of the transmembrane voltage (also called transmembrane potential, or transmembrane potential difference) [1–4]. This can produce a variety of profound biochemical and physiological responses in cells, tissues, and whole body. When the cell is exposed to high-intensity pulses of an electric field, a supraphysiological transmembrane voltage is induced, causing formation of pores in the membrane and leading to increased membrane permeability. This phenomenon, called electroporation, is used for gene transfection [5], preparation of monoclonal antibodies in immunochemistry [6], electrochemotherapy of tumors [7], etc.

All these applications are based on changes in transmembrane voltage which are induced by external electric fields. It is therefore evident that correct evaluation of the induced transmembrane voltage is of great importance in assessing the effects of applied electric fields on cells.

The analytical calculation of the induced transmembrane voltage $\Delta\Phi_m$ caused by a uniform direct electric field across a homogeneous membrane is based on the assumption that the cell is spherical. This postulation is incorrect for many kinds of cells, such as plated cells, cells in tissues, and rod-shaped bacteria; furthermore, the analytical calculations also do not apply in case of a charged membrane surface (in these cases, a numerical calculation is necessary; see also the comment in Section 4). For a spherical cell with no surface charge, $\Delta\Phi_m$ is calculated by solving the Laplace equation. Taking into

^{*} Corresponding author. Fax: +386 61 1264 658.

account the geometric and material properties of the cell and the surrounding medium (Fig. 1), the position-dependent $\Delta\Phi_m$ follows the expression:

$$\Delta\Phi_m(t) = f_s ER \cos \theta \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right] \quad (1)$$

where E is the strength of the electric field, R is the cell radius, θ is the polar angle measured with respect to the direction of the field, f_s is a function reflecting the electric and dimensional properties of the cell and the surrounding medium (for a course of derivation, contact the authors):

$$f_s = \frac{3\lambda_o [3dR^2\lambda_i + (3d^2R - d^3)(\lambda_m - \lambda_i)]}{2R^3(\lambda_m + 2\lambda_o)(\lambda_m + \frac{1}{2}\lambda_i) - 2(R-d)^3(\lambda_o - \lambda_m)(\lambda_i - \lambda_m)} \quad (2)$$

and τ is the time constant of the membrane which reads [8]:

$$\tau = \frac{RC_m}{\frac{2\lambda_o\lambda_i}{2\lambda_o + \lambda_i} + \frac{R}{d}\lambda_m} \quad (3)$$

Symbols in Eqs. (2) and (3) are defined in Fig. 1.

In the treatment of induced transmembrane voltage, two simplifications are usually made. Firstly, the membrane is considered to be absolutely insulating. This causes the function f_s to take the form of a constant:

$$\lambda_m = 0 \Rightarrow f_s = \frac{3}{2} \quad (4)$$

and Eq. (1) reduces to:

$$\Delta\Phi_m(t) = \frac{3}{2} ER \cos \theta \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right] \quad (5)$$

Secondly, it is often assumed that the time constant of the cell membrane is much smaller than duration of the exposure to the field (i.e., pulse duration). In this case, the exponential time dependence approaches the static asymptotic value:

$$t \gg \tau \Rightarrow \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right] \rightarrow 1 \quad (6)$$

which further simplifies Eq. (5) to yield the well known expression for the induced transmembrane voltage [9]:

$$\Delta\Phi_m = \frac{3}{2} ER \cos \theta \quad (7)$$

An experimental evaluation of the induced transmembrane voltage [10] gave significantly lower values of f_s than the theoretical estimation obtained from Eq. (7) (i.e., $f_s = 1.5$). The authors suggested that the derivation should be reexamined without neglecting the membrane conductivity. The same conclusion was also made in at least two other papers [11,12].

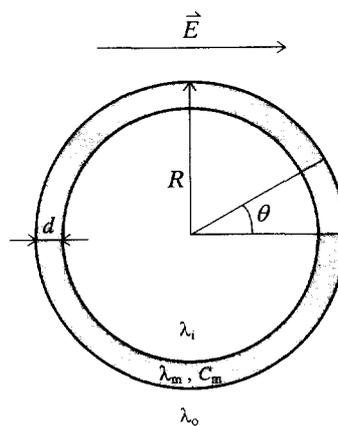


Fig. 1. The model on which the calculations were based. The cell is a sphere with radius of R . It is enclosed by a shell of uniform thickness d (the membrane). The external electric field is homogeneous, and E is the absolute value of the electric field strength vector. Specific conductivities are attributed to spaces occupied by cytoplasm (λ_i), membrane (λ_m) and extracellular medium (λ_o). Membrane capacitance is denoted by C_m .

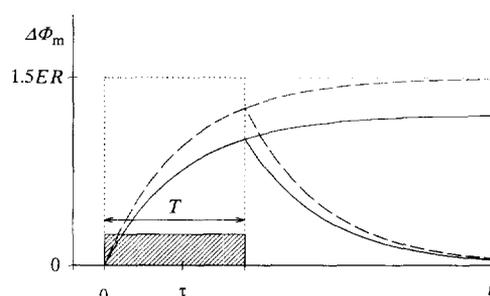


Fig. 2. Time course of the induced transmembrane voltage $\Delta\Phi_m$ at $\theta = 0$. According to the most simplified relation given by Eq. (7), $\Delta\Phi_m$ reaches its peak value immediately after the electric field has been turned on (dotted curve). If the time constant of the membrane is considered (Eq. 5), $\Delta\Phi_m$ keeps gradually approaching the peak value as long as the electric field remains turned on; after the field has been turned off, $\Delta\Phi_m$ gradually decreases (dashed curve, at pulse duration $T = 1.8\tau$). Furthermore, if the membrane is not regarded as absolutely insulating (Eq. 1), f_s is lower than 1.5, thus decreasing the peak value of $\Delta\Phi_m$ (solid curve, at $T = 1.8\tau$ and $f_s = 1.2$).

Eq. (2) shows that f_s is a function of λ_o , λ_m , λ_i , R and d . Also, τ given by Eq. (3) is a function of λ_o , λ_m , λ_i , R , d and C_m . For both f_s and τ , it is obvious that the justification of the described simplifications depends on the actual values of these parameters in a specific experiment (Fig. 2).

This study was designed to theoretically evaluate how strongly the two described simplifications affect the correctness of theoretical prediction of induced transmembrane voltage in different experimental situations.

2. Parameters and calculations

An average physiological value obtained from the literature was attributed to λ_o , λ_m , λ_i , R , d , and C_m (henceforth referred to as standard values of the parameters), as well as its lowest and highest values reported in the literature, defining the range of parameter variation in adequate parametric study (Table 1). In each parametric study, we varied the value of the analyzed parameter within its defined range, while other parameters were set at their standard values. The dependence of f_s and τ on λ_o , λ_m , λ_i , and R was analyzed, while d was kept at its standard value of 5 nm [13], and C_m was set at 0.01 Fm^{-2} [12,14]. *Mathematica*[®] software was used for numerical calculation.

For the physiological environment, the ranges of the values for the conductivity parameters are quite narrow, since the ionic composition of every compartment within the organism is well regulated. Thus, the ranges for λ_i and λ_m only reflect the differences between reported measurements (see Table 1). In the case of in vitro experiments, the choice of the extracellular medium is more arbitrary. For this reason, λ_o varies for several orders of magnitude between different experiments reported. The most extreme deviation from physiological conditions occurs when an extracellular medium with a significantly lower conductivity is used. This is often the case in experiments where cells are manipulated by intense

Table 1
Standard values and ranges used in parametric studies

Parameter	Denotation	Standard value	Lower limit	Upper limit
Extracellular medium conductivity	λ_o	$2.0 \times 10^{-1} \text{ S m}^{-1}$ ^a	$5.0 \times 10^{-4} \text{ S m}^{-1}$ ^b	2.0 S m^{-1} ^c
Membrane conductivity	λ_m	$5.0 \times 10^{-7} \text{ S m}^{-1}$ ^{d,e}	$1.0 \times 10^{-8} \text{ S m}^{-1}$ ^f	$1.2 \times 10^{-6} \text{ S m}^{-1}$ ^e
Cytoplasmic conductivity	λ_i	$2.0 \times 10^{-1} \text{ S m}^{-1}$ ^g	$2.0 \times 10^{-2} \text{ S m}^{-1}$ ^h	1.0 S m^{-1} ⁱ
Cell radius	R	$10 \mu\text{m}$ ^j	$1 \mu\text{m}$ ^j	$100 \mu\text{m}$ ^j
Membrane thickness	d	5 nm ^j	–	–
Membrane capacitance	C_m	$1.0 \times 10^{-2} \text{ F m}^{-2}$ ^{f,i}	–	–

^a Set at equal standard value as λ_i , as proposed by Lojewska et al. [11].

^b Fuhr et al. [15].

^c Set at 10 times the standard value.

^d Gascoyne et al. [25].

^e From Hu et al. [26], using the conversion by Arnold et al. [16].

^f Hölzel and Lamprecht [14].

^g Harris and Kell [27].

^h Set at 1/10 of the standard value.

ⁱ Grosse and Schwan [12].

^j Alberts et al. [13].

electric fields (e.g., electroporation, electrofusion, electrorotation, dielectrophoresis), as the use of a low conductivity medium reduces the electric current and thus the heating of the suspension. In measurements of the electrorotational spectra, the use of an extracellular medium with conductivity as low as $5 \times 10^{-4} \text{ S m}^{-1}$ was reported [15], which is approximately four hundred times lower in comparison to the physiological extracellular solution. In most similar experiments, conductivity of extracellular medium was in range between 10^{-3} and 10^{-2} S m^{-1} [14,16–21].

3. Results and discussion

3.1. Function f_s

In the first part of the study we tested the sensitivity of f_s to variations in conductivity parameters (λ_o , λ_m , λ_i), and the dimension of the cell (R). For this, the electric pulse duration was assumed to have lasted long enough to justify the simplification given by Eq. (6). Since f_s is proportional to the induced transmembrane voltage $\Delta\Phi_m$, deviation of f_s provided by Eq. (2) from the simplified value of $f_s = 1.5$ indicated the error margin in the evaluation of $\Delta\Phi_m$ by using Eq. (7).

We found that in the case of parameter values which correspond to the physiological conditions, Eqs. (1) and (7) yield very similar values of the induced transmembrane voltage, i.e., f_s evaluated by using Eq. (2) is sufficiently close to the simplified value of $f_s = 1.5$ (the deviation never exceeds the 5% limit). However, if the cells are exposed to the field in a low conductivity medium, f_s is significantly reduced, leading to a considerably lower value of $\Delta\Phi_m$ compared to Eq. (7) (Fig. 3a). With respect to these results, the sensitivity of f_s to other parameters (λ_m , λ_i , and R) was studied at a typical physiological value of the extracellular medium conductivity ($\lambda_o = 2 \times 10^{-1} \text{ S m}^{-1}$) and at two values characteristic for a low conductivity medium ($\lambda_o = 5 \times 10^{-3}$ and $1 \times 10^{-3} \text{ S m}^{-1}$).

Fig. 3b to Fig. 3d show the dependence of f_s upon these parameters. The value of f_s generally decreases with increasing membrane conductivity, but the effect is much more distinctive in a low conductivity medium (Fig. 3b). With changes in cytoplasm conductivity within the defined range, f_s practically retains a constant value (under 5% change), however, the use of a low conductivity medium again causes a considerable decrease of f_s (Fig. 3c).

Eqs. (4) and (7) predict that both f_s and $\Delta\Phi_m$ are independent from cytoplasmic conductivity, membrane conductivity and extracellular conductivity, as well as from membrane thickness. This is not the case with the cell radius, as according to

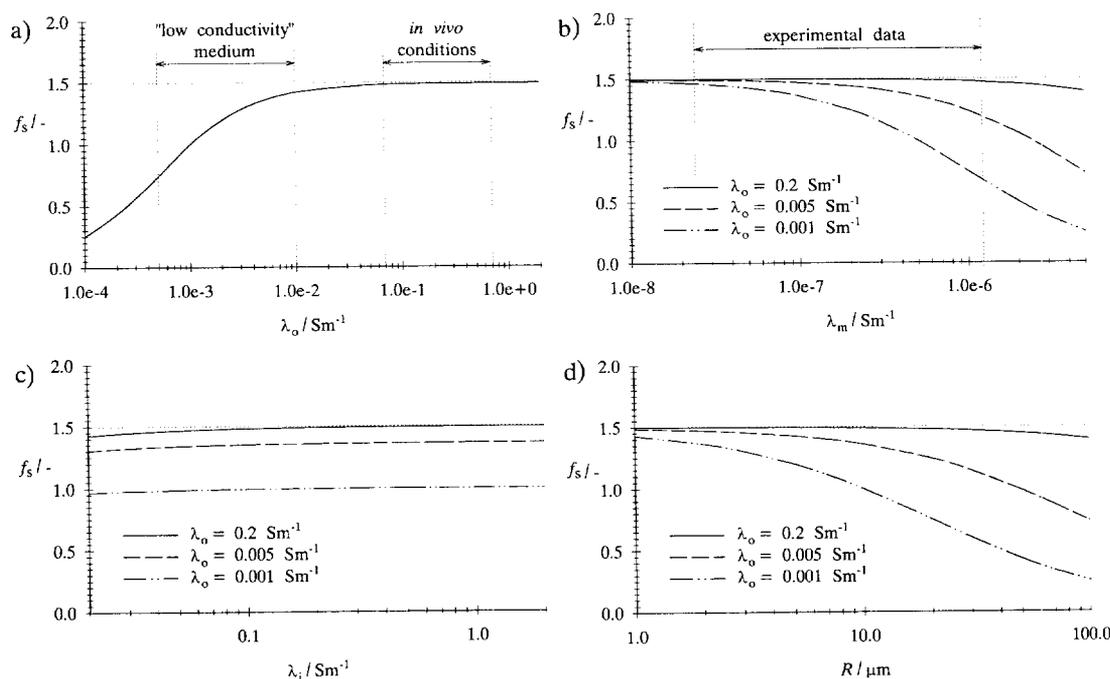


Fig. 3. Dependence of function f_s on electric and dimensional properties of the cell and the surrounding medium. (a) Influence of extracellular medium conductivity upon the value of f_s (at $\lambda_i = 2.0 \times 10^{-1} \text{ S m}^{-1}$; $\lambda_m = 5.0 \times 10^{-7} \text{ S m}^{-1}$; $R = 10 \mu\text{m}$; $d = 5 \text{ nm}$). (b) Influence of membrane conductivity upon f_s (at $\lambda_i = 2.0 \times 10^{-1} \text{ S m}^{-1}$; $R = 10 \mu\text{m}$; $d = 5 \text{ nm}$). (c) Influence of cytoplasmic conductivity upon f_s (at $\lambda_m = 5.0 \times 10^{-7} \text{ S m}^{-1}$; $R = 10 \mu\text{m}$; $d = 5 \text{ nm}$). (d) Influence of cell radius upon f_s (at $\lambda_i = 2.0 \times 10^{-1} \text{ S m}^{-1}$; $\lambda_m = 5.0 \times 10^{-7} \text{ S m}^{-1}$; $d = 5 \text{ nm}$).

these equations $\Delta\Phi_m$ is proportional to R , whereas f_s itself does not depend upon R . Eq. (2) suggests that the latter presumption is incorrect, since R appears in the expression describing f_s (Fig. 3d). Thus, the linear relationship between transmembrane voltage and cell radius also becomes invalid.

3.2. Time constant (τ)

The second part of the study focused on the sensitivity of the time constant τ to the same parameters (λ_o , λ_m , λ_i , and R). Analysis showed that τ decreases with increasing conductivity of the extracellular medium, indicating that the induced transmembrane voltage follows the change of an external electric field faster if the cell is exposed in a physiological medium. At a pulse duration exceeding $T = 3\tau$, $\Delta\Phi_m$ comes within the 5% range from a static asymptotic value, thus practically justifying the assumption made in Eq. (6).

When all parameter values correspond to physiological conditions, τ is in the microsecond range (Fig. 4a). In this case, pulses lasting over 10 μs assure correctness of a static evaluation of $\Delta\Phi_m$. Again, the situation changes when a ‘‘low conductivity’’ medium is used, as the necessary pulse duration comes into the range 0.1 ms to 1 ms (Fig. 4a). Similar to the f_s analysis, the dependence of τ on λ_m , λ_i , and R was studied at a typical value of a physiological medium and at two ‘‘low conductivity’’ values (Fig. 4b to Fig. 4d). The time constant generally decreases with increasing membrane conductivity (Fig. 4b), as well as with increasing cytoplasm conductivity (Fig. 4c), but in both cases, an extracellular medium with low conductivity shifts the range of τ up at least one order of magnitude. Eq. (3) shows that the time constant is not entirely proportional to the cell radius, since R also appears in the denominator of the expression. For a physiological extracellular medium, deviation from the linear relationship is very small. In a low conductivity medium, the non-linearity becomes much more obvious, while the range of τ again shifts upwards significantly (Fig. 4d).

To make results of the analysis applicable for the design of an electrical protocol for cell electroporation, we plotted curves that indicate the electric field intensity needed to induce 250 mV of change in the transmembrane voltage for different pulse durations of the exposure field. The curves were calculated for four cell radii that cover the dimension range of biological cells. The calculations were performed for exposure in physiological (Fig. 5a) and low conductivity medium (Fig. 5b). In a physiological solution, the required field for inducement of a certain transmembrane voltage is substantially lower than in a low conductive medium and, in general, practically independent on the pulse length. The only situation when a field significantly stronger than predicted by the simplified solution should be used is in the attempt to electroporate a very large cell (e.g., 50 μm) with very short electric pulses (e.g., 1 μs duration).

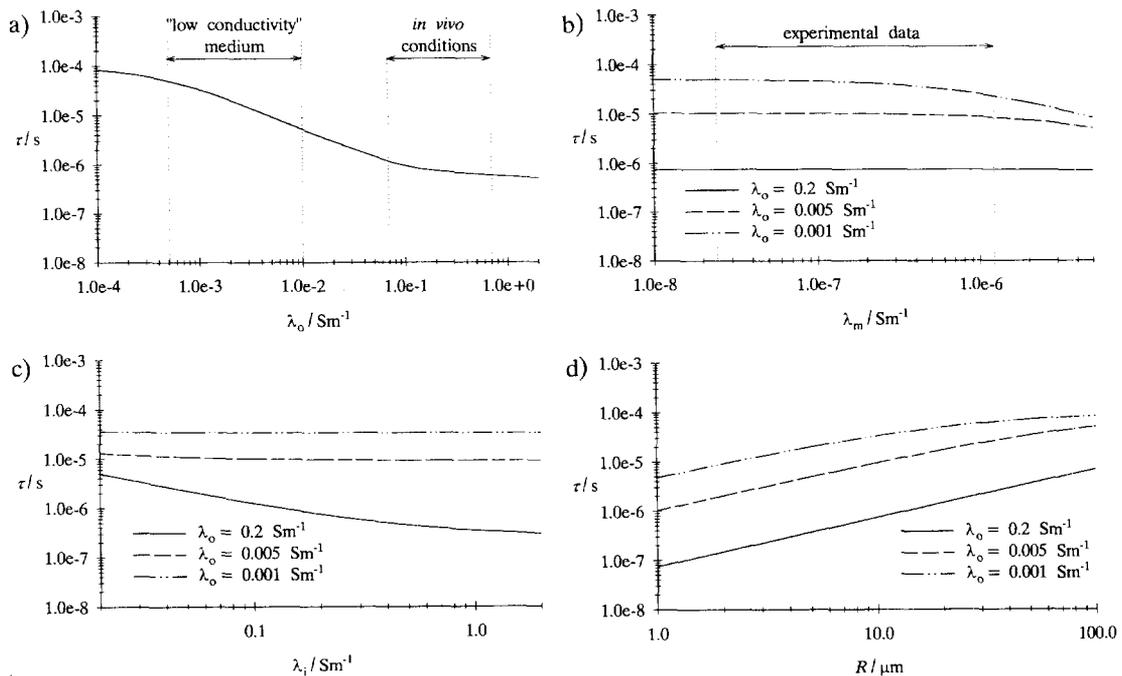


Fig. 4. Dependence of τ on electric and dimensional properties of the cell and the surrounding medium. (a) Influence of extracellular medium conductivity upon the time constant of the cell membrane τ (at $\lambda_i = 2.0 \times 10^{-1} \text{ S m}^{-1}$; $\lambda_m = 5.0 \times 10^{-7} \text{ S m}^{-1}$; $R = 10 \mu\text{m}$; $d = 5 \text{ nm}$; $C_m = 0.01 \text{ F m}^{-2}$). (b) Influence of membrane conductivity upon τ (at $\lambda_i = 2.0 \times 10^{-1} \text{ S m}^{-1}$; $R = 10 \mu\text{m}$; $d = 5 \text{ nm}$; $C_m = 0.01 \text{ F m}^{-2}$). (c) Influence of cytoplasmic conductivity upon τ (at $\lambda_m = 5.0 \times 10^{-7} \text{ S m}^{-1}$; $R = 10 \mu\text{m}$; $d = 5 \text{ nm}$; $C_m = 0.01 \text{ F m}^{-2}$). (d) Influence of cell radius upon τ (at $\lambda_i = 2.0 \times 10^{-1} \text{ S m}^{-1}$; $\lambda_m = 5.0 \times 10^{-7} \text{ S m}^{-1}$; $d = 5 \text{ nm}$; $C_m = 0.01 \text{ F m}^{-2}$).

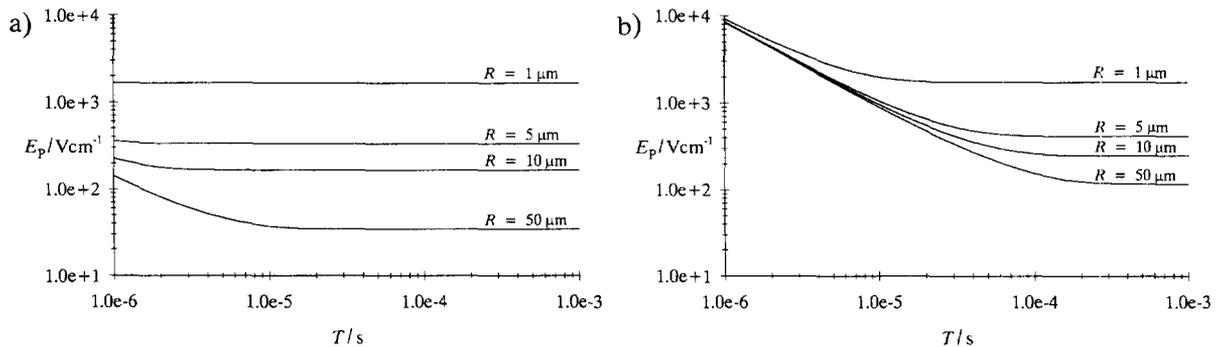


Fig. 5. Minimum electric field strength E_p needed for electroporation as function of pulse duration T (at breakdown transmembrane voltage of 250 mV). (a) In a typical physiological extracellular medium, $\lambda_o = 2.0 \times 10^{-1} \text{ S m}^{-1}$ (at $\lambda_i = 2.0 \times 10^{-1} \text{ S m}^{-1}$; $\lambda_m = 5.0 \times 10^{-7} \text{ S m}^{-1}$; $d = 5 \text{ nm}$). (b) In a low conductivity extracellular medium, $\lambda_o = 1.0 \times 10^{-3} \text{ S m}^{-1}$ (at $\lambda_i = 2.0 \times 10^{-1} \text{ S m}^{-1}$; $\lambda_m = 5.0 \times 10^{-7} \text{ S m}^{-1}$; $d = 5 \text{ nm}$).

In a low conductivity medium, the accurate estimation of the required electrical parameters for electroporation is more complex. Fig. 5b shows that for larger cells electroporated with short pulses or in a high frequency field, the required field intensity could be up to two orders of magnitude higher comparing to the simplified prediction. The results indicate that if pulses shorter than 20 μs are used in a low conductive medium, calculations should be performed without simplification (i.e., calculations should be based on Eq. (1)).

4. Conclusion

The results related to the influence of the extracellular medium conductivity on the induced transmembrane voltage could explain some of the reported differences between the theoretical values referring to Eq. (7) and the experimental results. Thus, in cases where cells are surrounded by a medium of low conductivity ($\lambda_o < 10^{-2} \text{ S m}^{-1}$), the approach to the calculation of the transmembrane voltage should be based on the more complex Eq. (1). Electrorotation and dielectrophoresis are certainly among those cases, because a low conductivity medium is required for the attainment of adequate circumstances in order to use these measuring methods. Reduction of the transmembrane voltage in a low conductivity medium is most apparent when large cells (e.g., oocytes) are used (Fig. 3d).

The calculations also show that the use of a low conductivity medium increases the charging time (i.e., time constant) of the cell membrane (Fig. 4a). Therefore, with a low conductivity medium, in order to induce electroporation with microsecond pulses, an amplitude of $\sim 10 \text{ kV cm}^{-1}$ must be applied (see Fig. 5b). If the pulse duration is in the range of 100 μs –1 ms, a much lower pulse amplitude (e.g., 500 V cm^{-1}) can be used. Besides medium conductivity, cell size is again a relevant factor to be considered in the determination of the necessary pulse duration, as the time constant of the membrane rises almost proportionally to the cell radius (Fig. 4d).

The final part of the study also showed that in a low conductivity medium, the extracellular conductivity, as well as cell the radius, have to be taken into account in order to choose the optimal pulse duration and amplitude for electroporation.

Among other possible reasons for experimentally observed lower values of the induced transmembrane voltage which are not discussed in this paper, the charged cell surface has also been reported to cause major deviations of the transmembrane voltage from values predicted by Eq. (7) [12,22]. It has also been shown that a non-spherical shape of the cell deforms the cosine distribution of the induced transmembrane voltage [23], thus changing the effective area of electroporation [24].

Acknowledgements

This work was supported in part by the Ministry of Science and Technology of the Republic of Slovenia and by the Cellular Engineering Project (PECO Programme, Contract No. ERB-CIPA-CT 93-0235) of the European Community.

References

- [1] K.R. Robinson, *J. Cell Biol.* 101 (1985) 2023.
- [2] P. Marszalek, D.-S. Liu, T.Y. Tsong, *Biophys. J.* 58 (1990) 1053.
- [3] T.Y. Tsong, *Biophys. J.* 60 (1991) 297.

- [4] W. Krassowska, J.C. Neu, *Biophys. J.* 66 (1994) 1768.
- [5] T.-K. Wong, E. Neumann, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107 (2) (1982) 584.
- [6] M.M.S. Lo, T.Y. Tsong, M.K. Conrad, S.M. Strittmatter, L.D. Hester, S. Snyder, *Nature* 310 (1984) 792.
- [7] L.M. Mir, S. Orłowski, J. Belehradek, C. Paoletti, *Eur. J. Cancer* 27 (1991) 68.
- [8] H. Pauly, H.P. Schwan, *Z. Naturforsch.* 14B (1959) 125.
- [9] L.F. Jaffe, R. Nuccitelli, *Ann. Rev. Biophys. Bioenerg.* 6 (1977) 445.
- [10] J. Teissié, M.P. Rols, *Biophys. J.* 65 (1993) 409.
- [11] Z. Lojewska, D.L. Farkas, B. Ehrenberg, L.M. Loew, *Biophys. J.* 56 (1989) 121.
- [12] C. Grosse, H.P. Schwan, *Biophys. J.* 63 (1992) 1632.
- [13] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing, New York, 1994, p. 477.
- [14] R. Hölzel, I. Lamprecht, *Biochim. Biophys. Acta* 1104 (1992) 195.
- [15] G. Fuhr, R. Glaser, R. Hagedorn, *Biophys. J.* 49 (1986) 395.
- [16] W.M. Arnold, R.K. Schmutzler, A.G. Schmutzler, H. van der Ven, S. Al-Hasani, D. Krebs, U. Zimmermann, *Biochim. Biophys. Acta* 905 (1987) 454.
- [17] G. Fuhr, F. Geissler, T. Müller, R. Hagedorn, H. Torner, *Biochim. Biophys. Acta* 930 (1987) 65.
- [18] W.M. Arnold, U. Zimmermann, *J. Electrostat.* 21 (1988) 151.
- [19] W. Mehrle, R. Hampp, U. Zimmermann, H.P. Schwan, *Biochim. Biophys. Acta* 939 (1988) 561.
- [20] K.V.I.S. Kaler, T.B. Jones, *Biophys. J.* 57 (1990) 173.
- [21] J. Gimsa, R. Glaser, G. Fuhr, in: W. Schutt, H. Klinkmann, I. Lamprecht, T. Wilson (Eds.), *Physical Characterization of Biological Cells*, Verlag Gesundheit GmbH, Berlin, 1991, p. 295.
- [22] D. Gross, *Biophys. J.* 54 (1988) 879.
- [23] M. Klee, R. Plonsey, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* BME-23 (4) (1976) 347.
- [24] G. Serša, M. Čemažar, D. Šemrov, D. Miklavčič, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 39 (1996) 61.
- [25] P.R.C. Gascoyne, R. Pethig, J.P.H. Burt, F.F. Becker, *Biochim. Biophys. Acta* 1146 (1993) 119.
- [26] X. Hu, W.M. Arnold, U. Zimmermann, *Biochim. Biophys. Acta* 1021 (1990) 191.
- [27] C.M. Harris, D.B. Kell, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 11 (1983) 15.

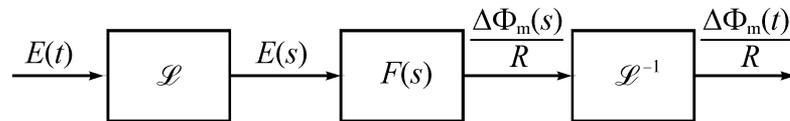
2.2 ARTICLE 2

Time course of transmembrane voltage induced by time-varying electric fields – a method for theoretical analysis and its application

[Méthode d'analyse théorique des variations du voltage transmembranaire induit par des champs électriques qui changent au cours du temps]

Publié dans *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 45: 3-16, 1998

Sommaire: Nous développons une méthode générale pour le calcul des variations du voltage transmembranaire induit par des champs électriques qui changent au cours du temps. Le principe de cette méthode peut être décrit en utilisant le schéma fonctionnel suivant



Pour déterminer une variation du voltage transmembranaire au cours du temps, $\Delta\Phi_m(t)$, induit par une variation du champ électrique externe au cours du temps, $E(t)$, on calcule ainsi d'abord la transformée de Laplace $E(s)$, on la multiplie par la fonction $F(s)$ donnée par

$$F(s) = \frac{3\Lambda_o \left[3dR^2\Lambda_i + (3d^2R - d^3)(\Lambda_m - \Lambda_i) \right]}{2R^3 (\Lambda_m + 2\Lambda_o)(\Lambda_m + \frac{1}{2}\Lambda_i) - 2(R-d)^3 (\Lambda_o - \Lambda_m)(\Lambda_i - \Lambda_m)},$$

où R représente le rayon de cellules, d l'épaisseur de la membrane, tandis que Λ_i , Λ_m et Λ_o sont respectivement les opérateurs d'admittivité électrique du cytoplasme, de la membrane, et du milieu extracellulaire, qui ont chacun la forme suivante

$$\Lambda_k = \lambda_k + \varepsilon_k s,$$

où λ_k représente la conductivité électrique et ε_k la constante diélectrique de la région k , et s la fréquence complexe.

La transformation inverse de Laplace donne alors la variation au cours du temps du voltage transmembranaire à $\varphi = 0$, normalisé par le rayon des cellules. Pour obtenir la distribution du voltage transmembranaire sur la membrane à tout instant, on doit seulement multiplier ce résultat par $R \cos \varphi$.

Cette méthode permet d'étudier la réponse à une grande variété de champs électriques qui changent au cours du temps. On applique cette méthode aux différents champs électriques qui sont utilisés pour l'électroperméabilisation et l'électrofusion: les impulsions rectangulaires, les impulsions trapézoïdales (qui se rapprochent des

impulsions rectangulaires, mais avec des temps non nuls de montée et de descente), les impulsions exponentielles, et les impulsions rectangulaires modulées par des ondes sinusoïdales de quelques dizaines de kHz (radiofréquences). Les études ont été réalisées pour différentes durées d'impulsion, et à chaque durée, pour le milieu normal physiologique et pour le milieu typique de basse conductivité.

Pour toutes les formes d'impulsions étudiées, nous montrons que si la conductivité du milieu extracellulaire est réduite, ceci ralentit le processus d'induction du voltage transmembranaire. Par conséquent, de plus longues impulsions doivent être employées pour atteindre l'amplitude désirée du voltage dans ces conditions, car l'influence des phénomènes rapides et de courte durée sur le voltage induit est diminuée. Pour cette raison, une modulation de radiofréquence dans un tel milieu est inefficace. L'annexe de l'article donne un ensemble complet d'expressions dérivées et une discussion au sujet des simplifications possibles.



ELSEVIER

Time course of transmembrane voltage induced by time-varying electric fields—a method for theoretical analysis and its application

Tadej Kotnik^{*}, Damijan Miklavcic, Tomaz Slivnik

University of Ljubljana, Faculty of Electrical Engineering, Trzaska 25, 1000 Ljubljana, Slovenia

Received 2 July 1997; revised 24 October 1997; accepted 27 October 1997

Abstract

The paper describes a general method for analysis of time courses of transmembrane voltage induced by time-varying electric fields. Using this method, a response to a wide variety of time-varying fields can be studied. We apply it to different field shapes used for electroporation and electrofusion: rectangular pulses, trapezoidal pulses (approximating rectangular pulses with finite rise time), exponential pulses, and sine(RF)-modulated pulses. Using the described method, the course of induced transmembrane voltage is investigated for each selected pulse shape. All the studies are performed at different pulse durations, each for both the normal physiological and the low-conductivity medium. For all the pulse shapes investigated, it is shown that as the conductivity of extracellular medium is reduced, this slows down the process of transmembrane voltage inducement. Thus, longer pulses have to be used to attain the desired voltage amplitude, as the influence of the fast, short-lived phenomena on the induced voltage is diminished. Due to this reason, RF-modulation in such a medium is ineffective. The appendix gives a complete set of derived expressions and a discussion about possible simplifications. © 1998 Elsevier Science S.A.

Keywords: Electric field stimulation; Transmembrane voltage; Pulse shape; Pulse duration; Electroporation; Low-conductivity medium

1. Introduction

Exposure of a biological cell to electric field can produce a variety of profound biochemical and physiological responses. Most of these responses are based on the modification of transmembrane voltage by the applied electric field [1–4]. If the field strength exceeds a certain threshold value, this can lead to pore formation in the membrane (electroporation) or fusion of adjacent cells (electrofusion) [5,6]. Nowadays, these phenomena are widely used in different applications, such as gene transfection [7], preparation of monoclonal antibodies in immunochemistry [8], and electrochemotherapy of tumors [9]. For optimal effects of such applications, one must select the appropriate shape, duration and amplitude of the applied electric field. This is only possible if the dynamics of transmembrane voltage induced by such a field can be evaluated.

If a spherical cell with no surface charge is exposed to a DC field, the steady-state value of transmembrane voltage $\Delta\Phi_m$ is calculated by solving the Laplace partial differential equation, which governs static electric fields and reflects their conservative properties. This approach yields the solution in form of the expression:

$$\Delta\Phi_m = fER \cos \theta \quad (1)$$

where E is the strength of the electric field (which has to be DC for this expression to be valid), R is the cell radius, θ is the polar angle measured with respect to the direction of the field, and f is a function reflecting the electrical and geometrical properties of the cell [10]:

$$f = \frac{3\lambda_o [3dR^2\lambda_i + (3d^2R - d^3)(\lambda_m - \lambda_i)]}{2R^3(\lambda_m + 2\lambda_o) \left(\lambda_m + \frac{1}{2}\lambda_i \right) - 2(R-d)^3(\lambda_o - \lambda_m)(\lambda_i - \lambda_m)} \quad (2)$$

where λ_i , λ_m and λ_o are the conductivities of the cytoplasm, cell membrane, and extracellular medium, respectively, R is

^{*} Corresponding author. Tel.: +386-1-4768-768; fax: +386-1-4264-658; e-mail: tadej.kotnik@fe.uni-lj.si

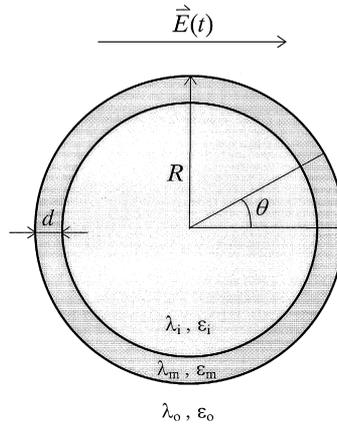


Fig. 1. The model on which the calculations were based. The cell is a sphere with radius of R , enclosed by a membrane of uniform thickness d . External electric field is homogeneous and retains its orientation, though its strength E changes with time. Specific conductivities and permittivities are attributed to regions occupied by cytoplasm (λ_i, ε_i), membrane (λ_m, ε_m) and extracellular medium (λ_o, ε_o).

again the cell radius, and d is the membrane thickness. The meaning of the parameters used in Eq. (2) is also illustrated in Fig. 1.

Often, a further simplification is made by assuming $\lambda_m \ll \lambda_i, \lambda_o$, which reduces function f into a constant, $f = 3/2$.

To analyze $\Delta\Phi_m$ in response to a step turn-on of a DC field, Eq. (1) is sometimes modified, presuming the exponential shape of the $\Delta\Phi_m$ in response to a step change of E :

$$\Delta\Phi_m(t) = fER \cos \theta \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right] \quad (3)$$

where τ is the time constant of the membrane given by Ref. [11]:

$$\tau = \frac{Rc_m}{\frac{2\lambda_o\lambda_i}{2\lambda_o + \lambda_i} + \frac{R}{d}\lambda_m} \quad (4)$$

and $c_m = \varepsilon_m/d$ is the membrane capacitance, with ε_m denoting the membrane permittivity.

The described time constant approach can also be used in the case of rectangular pulses, since the turn-off of the electric field is again a step change. However, electric fields with shapes different from rectangular, such as exponential, or RF-modulated, are often used. In these cases, a different approach to the evaluation is needed.

In this paper, we present a general method for analysis of time courses of transmembrane voltage induced by time-varying fields, and we use this method to study the fields commonly used for electroporation and electrofusion: single rectangular pulses, trapezoidal pulses (modeling rectangular pulses with rise time), exponential pulses, RF-modulated pulses, as well as trains of such pulses.

Two remarks should be made before we proceed with the discussion of the problem. First, since f and τ are actually functions, more rigorous rules of denotation would demand to imply this by writing the terms as $f(\lambda_i, \lambda_m, \lambda_o, R, d)$ and $\tau(\lambda_i, \lambda_m, \lambda_o, \varepsilon_m, R, d)$. For brevity, we avoid such denotation. Secondly, the calculations which lead to the described equations are based on two assumptions: (A) cell shape is presumed to be spherical; for a majority of cell types in a suspension, this is a fair approximation, but it does not hold for disc-shaped (e.g., erythrocytes) and rod-shaped cells (e.g., some types of bacteria); and (B) applied electric field is treated as homogeneous and defined as the ratio between the applied voltage and the distance between the electrodes; this approximation is only valid if two parallel plates are used as electrodes, and the distance between the plates is much smaller than the size of the plates; often, wire electrodes are used instead (e.g., needle electrodes in poration of tissues in vivo), yielding a strongly nonuniform distribution of the field, which can only be evaluated by means of numerical methods [12]. The two assumptions given by (A) and (B) provide the access to the analytical approach and shall therefore be retained in the forthcoming calculations.

2. Calculations

For the cases where electric field strength remains constant once the field is turned on, Eq. (1) can be used to give the steady-state solution. If cytoplasm, membrane and extracellular medium were all purely conductive (having no dielectric permittivity), this equation would also yield transmembrane voltage induced at any given moment in response to the momentary value of electric field strength. Any material, however, demonstrates a certain amount of permittivity.¹ When it is exposed to electric field, voltage induced on the material consists of two components; the first (due to the conductivity of the material) is proportional to the electric field strength, while the other (due to the permittivity of the material) is proportional to the time derivative of electric field strength [13]. In order to account for these permittivities, instead of conductivities of the materials, the more general *admittivity operators* have to be used:

$$\Lambda = \lambda + \varepsilon \frac{d}{dt} \quad (5)$$

where $d/(dt)$ is a differential operator that transforms a differentiable function $y(t)$ into its time derivative $(dy)/(dt)$.

By taking the function f and substituting Λ_i , Λ_m , and Λ_o for λ_i , λ_m , and λ_o , respectively, we obtain the following expression:

$$F = \frac{3\Lambda_o [3dR^2\Lambda_i + (3d^2R - d^3)(\Lambda_m - \Lambda_i)]}{2R^3(\Lambda_m + 2\Lambda_o) \left(\Lambda_m + \frac{1}{2}\Lambda_i \right) - 2(R-d)^3(\Lambda_o - \Lambda_m)(\Lambda_i - \Lambda_m)} \quad (6)$$

F is a function of three differential operators (Λ_i , Λ_m , and Λ_o) and can thus itself be treated as a structured, higher-order differential operator [14]. To avoid dealing with differential operators, we transfer the analysis into complex-frequency space, where time derivatives are replaced by multiplication by the complex frequency (denoted by s). Here, the admittivity operator is formulated as:

$$\Lambda = \lambda + \varepsilon s. \quad (7)$$

If the terms Λ_i , Λ_m , and Λ_o in Eq. (6) are written according to Eq. (7), and the result is then expanded, we get the expression of the following type:

$$F(s) = \frac{a_1 s^2 + a_2 s + a_3}{b_1 s^2 + b_2 s + b_3} \quad (8)$$

where

$$a_1 = 3d\lambda_o(\lambda_i(3R^2 - 3dR + d^2) + \lambda_m(3dR - d^2)), \quad (9a)$$

$$a_2 = 3d((\lambda_i\varepsilon_o + \lambda_o\varepsilon_i)(3R^2 - 3dR + d^2) + (\lambda_m\varepsilon_o + \lambda_o\varepsilon_m)(3dR - d^2)), \quad (9b)$$

$$a_3 = 3d\varepsilon_o(\varepsilon_i(3R^2 - 3dR + d^2) + \varepsilon_m(3dR - d^2)), \quad (9c)$$

$$b_1 = 2R^3(\lambda_m + 2\lambda_o) \left(\lambda_m + \frac{1}{2}\lambda_i \right) + 2(R-d)^3(\lambda_m - \lambda_o)(\lambda_i - \lambda_m), \quad (9d)$$

$$b_2 = 2R^3 \left(\lambda_i \left(\frac{1}{2}\varepsilon_m + \varepsilon_o \right) + \lambda_m \left(\frac{1}{2}\varepsilon_i + 2\varepsilon_m + 2\varepsilon_o \right) + \lambda_o(\varepsilon_i + 2\varepsilon_m) \right) + 2(R-d)^3 \\ \times (\lambda_i(\varepsilon_m - \varepsilon_o) + \lambda_m(\varepsilon_i - 2\varepsilon_m + \varepsilon_o) - \lambda_o(\varepsilon_i - \varepsilon_m)), \quad (9e)$$

$$b_3 = 2R^3(\varepsilon_m + 2\varepsilon_o) \left(\varepsilon_m + \frac{1}{2}\varepsilon_i \right) + 2(R-d)^3(\varepsilon_m - \varepsilon_o)(\varepsilon_i - \varepsilon_m). \quad (9f)$$

In the same manner as function f would be more consistently denoted as $f(\lambda_i, \lambda_m, \lambda_o, R, d)$, function F should be written as $F(\lambda_i, \lambda_m, \lambda_o, \varepsilon_i, \varepsilon_m, \varepsilon_o, R, d, s)$, thus, implying its dependence on all of these parameters. Again, for the brevity, we choose to explicitly indicate only the dependence of F on s (since this is the only dynamic parameter for a single

¹ The term 'permittivity' implies the total permittivity of the material, i.e., the product of the relative permittivity of the material (e.g., $\varepsilon_{\text{water}} = 81$) and the dielectric constant of the vacuum ($\varepsilon_o = 8.854 \times 10^{-12} \text{ A s V}^{-1} \text{ m}^{-1}$).

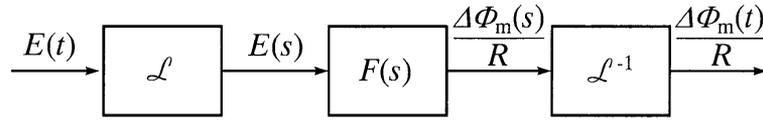


Fig. 2. The general principle used in the calculation of $\Delta\Phi_m(t)$ induced by $E(t)$. \mathcal{L} represents the Laplace transform, and \mathcal{L}^{-1} the inverse Laplace transform. $E(t)$ is first transformed into $E(s)$, which is then multiplied by $F(s)$ to give $\Delta\Phi_m(s)/R$. The normalized time course $\Delta\Phi_m(t)/R$ is then obtained as the inverse transform.

calculation—for other parameters, numerical values are inserted). Based on Eq. (1) and the introduced modifications, the relation between E and $\Delta\Phi_m$ in the complex-frequency space is given by:

$$\Delta\Phi_m(s) = F(s) E(s) R \cos \theta \quad (10)$$

where $\Delta\Phi_m(s)$ and $E(s)$ are Laplace (Heaviside) transforms of the time courses $\Delta\Phi_m(t)$ and $E(t)$, respectively, and $F(s)$ is given by Eq. (7).

The described approach allows the induced transmembrane voltage to be calculated for any time course $E(t)$, provided that it can be transformed into the complex-frequency space (i.e., provided that its Laplace transform $E(s)$ exists). The product $F(s)E(s)$ represents $\Delta\Phi_m(s)$ at $\theta = 0$, normalized to the cell radius, and the inverse Laplace transform yields $\Delta\Phi_m(t)$ at $\theta = 0$, normalized to R . The concept of the method is sketched in Fig. 2. One then multiplies the expression by R to scale the response, and by $(\cos \theta)$ to obtain the spatial distribution of induced transmembrane voltage.

General solutions describing responses to rectangular, triangular, trapezoidal, exponential, and sine(RF)-modulated pulses are given in Appendix A. In Section 3, we focus on specific time courses obtained from these solutions by insertion of numerical values of the parameters.

The cosine distribution of $\Delta\Phi_m$ on the cell membrane is retained in all cases and at any moment. Therefore, the multiplicative term $(\cos \theta)$ will be left out in further analysis (thus, we study $\Delta\Phi_m$ at $\theta = 0$). Also, for the clarity of reasoning, values of the geometrical (R and d) and electrical parameters (λ_i , λ_m , ε_i , ε_m , and ε_o) will be kept constant throughout the analysis. The only exception will be made for the extracellular medium conductivity (λ_o). While the permittivity of the extracellular medium is mostly dictated by its prevalent constituent, i.e., water, the medium conductivity strongly depends on the ionic concentrations in the medium. Since in different reports of experiments in vitro conductivity of the medium varies for at least two orders of magnitude [15–17], we will consider two particular cases—a physiological medium (with $\lambda_o \sim \lambda_i$) and a typical low-conductivity medium ($\lambda_o \ll \lambda_i$). Values of all the parameters are given in Table 1.

Table 1
Values of electric and dimensional parameters used in the calculations

Parameter	Denotation	Value
Cytoplasmic conductivity	λ_i	$3.0 \times 10^{-1} \text{ S m}^{-1}$ ^a
Cytoplasmic permittivity	ε_i	$7.1 \times 10^{-10} \text{ A s V}^{-1} \text{ m}^{-1}$ ^b
Membrane conductivity	λ_m	$3.0 \times 10^{-7} \text{ S m}^{-1}$ ^{c,d}
Membrane permittivity	ε_m	$4.4 \times 10^{-11} \text{ A s V}^{-1} \text{ m}^{-1}$ ^e
Extracellular medium conductivity	λ_o	$3.0 \times 10^{-1} \text{ S m}^{-1}$ (physiological medium) ^f , $1.0 \times 10^{-2} \text{ S m}^{-1}$ (low-conductivity medium) ^g
Extracellular medium permittivity	ε_o	$7.1 \times 10^{-10} \text{ A s V}^{-1} \text{ m}^{-1}$ ^b
Cell radius	R	$10 \mu\text{m}$ ^h
Membrane thickness	d	5 nm ^h

^aReported values range between $2.0 \times 10^{-1} \text{ S m}^{-1}$ and $5.5 \times 10^{-1} \text{ S m}^{-1}$ [18–20].

^bA typical permittivity of an aqueous solution (relative permittivity ≈ 80).

^cGascoyne et al. [21].

^dFrom Hu et al. [22], using conversion method given by Arnold et al. [17].

^eMeasured values of relative membrane permittivity lie between 4.5 and 6.5 [21]; relative membrane permittivity of 5 corresponds to $\varepsilon_m \approx 4.4 \times 10^{-11} \text{ A s V}^{-1} \text{ m}^{-1}$; a similar result is obtained from the data on membrane capacitance—from $c_m \approx 10^{-2} \text{ F m}^{-2}$ [17,23,22,24] we get $\varepsilon_m = c_m d \approx 5.0 \times 10^{-11} \text{ A s V}^{-1} \text{ m}^{-1}$.

^fSet at equal value as λ_i .

^gReported values range from $1.0 \times 10^{-3} \text{ S m}^{-1}$ to $5.0 \times 10^{-2} \text{ S m}^{-1}$ [17,25–27]; many authors do not give the value of λ_o .

^hAlberts et al. [28].

3. Results and discussion

3.1. Rectangular pulses

Rectangular pulses are often used in electroporation and electrofusion [15,29,30]. It is sensible to first focus on $\Delta\Phi_m(t)$ induced by an ideal rectangular pulse, thus, elucidating the effect of electrical properties of the medium on the relation between $E(t)$ and $\Delta\Phi_m(t)$. Then, by accounting for rise time of the pulse produced by a realistic generator, we can also analyze the role of generator features.

The derivation of $\Delta\Phi_m(t)$ in response to an ideal rectangular pulse is given by Eq. (A7) in Appendix A. Fig. 3 shows time courses of $\Delta\Phi_m$ induced by three rectangular pulses with durations of 200 ns, 1 μs , and 5 μs , respectively, each of them plotted for both a physiological and a low conductivity medium.

Fig. 3 shows that the induced transmembrane voltage is formed much slower when the medium conductivity is low. Pulses longer than 10 μs , however, suffice for $\Delta\Phi_m$ to reach the steady-state value even in a low conductivity medium. With such pulses, for a purpose of only evaluating this steady-state value (which still depends on the conductivities and dimensions of the cell), the simpler Eq. (1) can be used.

3.2. Trapezoidal pulses (rectangular pulses with rise time)

Pulses produced by a realistic generator are always characterized by a certain rise time. To account for this, we presumed the trapezoidal shape of the generated pulse (this is certainly a simplification, since the course of $E(t)$ during the rise time is generally nonlinear). The time course of $\Delta\Phi_m$ in response to a trapezoidal pulse is given by Eq. (A11) in Appendix A. Since rise times of modern pulse generators never exceed several tenths of a microsecond, and the induced $\Delta\Phi_m$ only reaches a very small fraction of its final value during such a short time (presuming that the pulse duration is long enough to obtain a substantial response, e.g., case (c) in Fig. 3), the response induced by a trapezoidal pulse with such a short rise time is practically equivalent to the response induced by a rectangular pulse of the same duration. Setting the pulse duration significantly longer than the rise time is the only sensible choice if the pulse is to resemble a rectangular shape, which is generally desired.

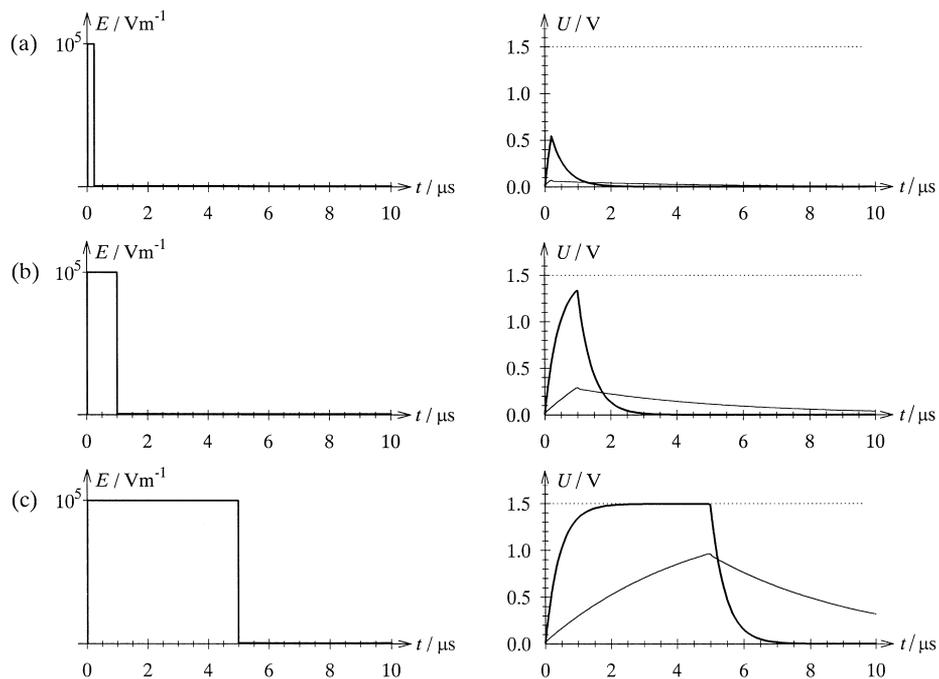


Fig. 3. A rectangular pulse (left) and the induced $\Delta\Phi_m(t)$ (right). (a) $T_1 = 200$ ns; (b) $T_1 = 1$ μs ; (c) $T_1 = 5$ μs . The thicker line corresponds to the response in a physiological medium, and the thinner line to the response in a low-conductivity medium. The dotted line gives the value of $3/2 ER$ (the steady-state value of $\Delta\Phi_m$, at $\theta = 0$, according to the most simplified relation between E and $\Delta\Phi_m$, see Eq. (2) and the subsequent commentary). For parameter values used in the calculations, see Table 1.

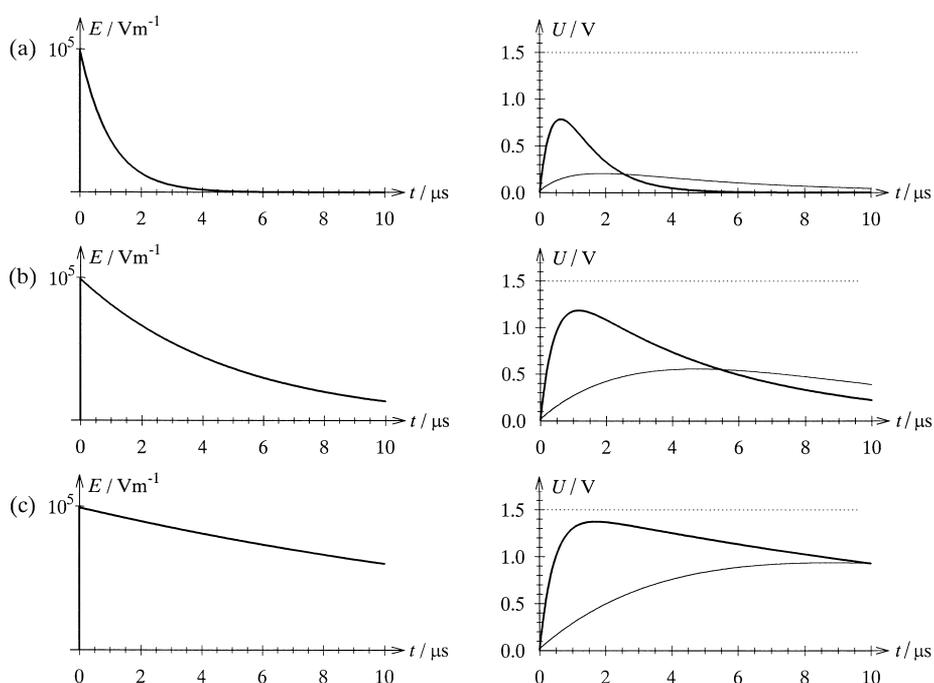


Fig. 4. An exponential pulse (left) and the induced $\Delta\Phi_m(t)$ (right). (a) $\tau_p = 1 \mu\text{s}$; (b) $\tau_p = 5 \mu\text{s}$; (c) $\tau_p = 20 \mu\text{s}$. The thicker line corresponds to the response in a physiological medium, and the thinner line to the response in a low-conductivity medium. The dotted line gives the value of $3/2 ER$.

3.3. Exponential pulses

Exponentially decaying pulses are also widespread in the applications [31–33]. Since the inducement process is not instantaneous, it is obvious that with pulses of this shape, neither the steady-state Eq. (1), nor the first-order response given by Eq. (3) enables the evaluation of the induced voltage. The derivation of $\Delta\Phi_m(t)$ in response to an exponential (exponentially decaying) pulse is given by Eq. (A12d) in Appendix A. Fig. 4 shows time courses of $\Delta\Phi_m$ induced by three such pulses, with time constants of $1 \mu\text{s}$, $5 \mu\text{s}$, and $20 \mu\text{s}$, respectively, each of the responses plotted for both a physiological and a low conductivity medium.

Because the exponential pulses are inherently time-varying, the influence of pulse duration (determined here by the time constant of the pulse) on the shape of $\Delta\Phi_m$ and its maximum value is probably most apparent with this type of pulses. Typical time constants of the pulses used in experiments lie in the range of ms, and focusing on the range of first several μs of such pulse, provided that the physiological medium is used, the pulse resembles a rectangular pulse. Therefore, we can evaluate the peak value of the induced voltage using the Eq. (1) without any crucial inaccuracy. On the other hand, a decrease in medium conductivity slows the inducement process significantly. As Fig. 4 shows, it is generally very hard to

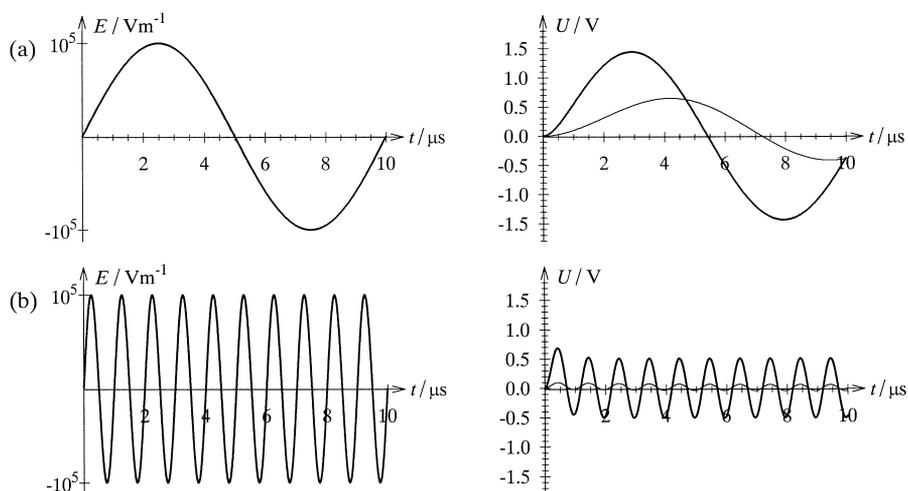


Fig. 5. A sine wave (left) and the induced $\Delta\Phi_m(t)$ (right). (a) $\omega/2\pi = 100 \text{ kHz}$; (b) $\omega/2\pi = 1 \text{ MHz}$. The thicker line corresponds to the response in a physiological medium, and the thinner line to the response in a low-conductivity medium.

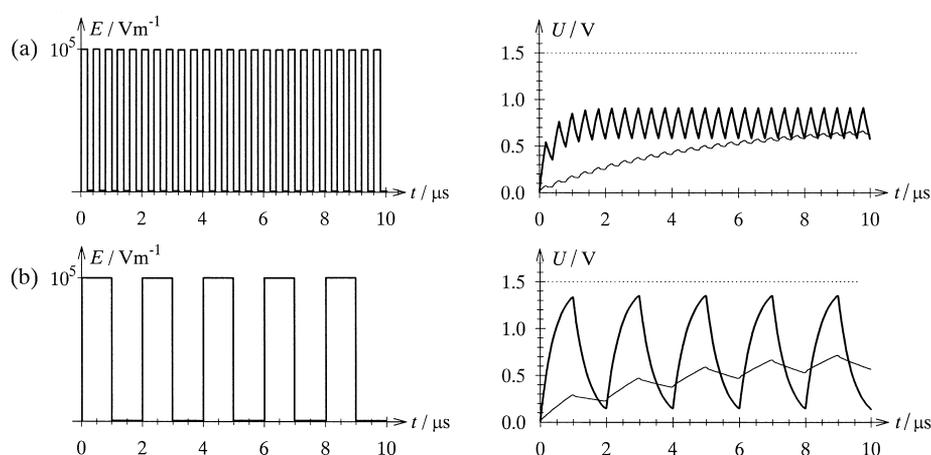


Fig. 6. A train of rectangular pulses (left) and the induced $\Delta\Phi_m(t)$ (right). (a) $T_1 = 200$ ns, $T_2 = 400$ ns; (b) $T_1 = 1$ μ s, $T_2 = 2$ μ s. The thicker line corresponds to the response in a physiological medium, and the thinner line to the response in a low-conductivity medium. The dotted line gives the value of $3/2 ER$.

predict the peak value of the induced voltage, since the shape of the response strongly depends on the medium conductivity (it is influenced by other parameters as well).

3.4. Sine-modulated pulses

In the recent years, several papers have reported an improved efficiency of electroporation and electrofusion obtained by modulation of rectangular pulses with a radio-frequency sinewave [34,35]. Without getting involved in the discussion about the mechanisms of improved efficiency, we present the analysis of the time courses of $\Delta\Phi_m$ induced by a sine-shaped electric field. Since the response induced by a modulated pulse is a combination of responses to a rectangular pulse and to a sine wave, the effect of the latter component is best studied separately. The derivation of $\Delta\Phi_m(t)$ in response to a sine wave is given by Eq. (A14d) in Appendix A, while the response to a sine-modulated rectangular pulse is derived in Eq. (A16). Fig. 5 shows time courses of $\Delta\Phi_m$ induced by two sine waves with frequencies of 100 kHz and 1 MHz, respectively. Each response is plotted for both a physiological and a low conductivity medium.

We see that with increasing frequency, the amplitude of the induced $\Delta\Phi_m$ decreases. Since the low conductivity medium slows down the dynamics of voltage inducement, the attenuation of the oscillations in the induced transmembrane voltage occurs at much lower frequencies. Therefore, the efficacy of modulation in such a medium is questionable.

3.5. Trains of pulses

When trains of pulses are applied, the gap between consecutive pulses is in most cases much larger than the pulse duration. Therefore, the transmembrane voltage induced by a pulse practically disappears before the next pulse occurs. Response to each pulse is dictated by this pulse only and can be treated separately from the responses to other pulses. The gap between pulses can, however, be decreased to such an extent that the next pulse starts before the response to the previous one completely fades away. In this case, the impact of superposition of single responses becomes evident. Fig. 6 shows two examples of responses to such trains of rectangular pulses.

4. Conclusions

Besides providing a tool for general analysis of time courses of transmembrane voltage induced by different time-varying electric fields, the presented method allows to calculate a particular response to a pulse of given shape and duration, time constant, or modulation frequency. In this manner, the method can be used when deciding on the pulse parameters that would provide a specific value of induced transmembrane voltage and (or) retain this value for a specific duration.

There is another important (though at the present time still hypothetical) utilization of the presented method. As the computer capabilities increase, molecular dynamics simulations of lipid bilayers promise to reach time ranges of microseconds within several years [36]. Since the time of pore formation in electroporation is also estimated to lie within the microsecond range [15,37], the opportunity could soon arise to simulate electroporation on a molecular level. For such a simulation to yield realistic results, it is essential to model all the details as authentically as possible, including exact time course of transmembrane voltage induced by a given pulse of electric field strength.

One of the important conclusions of this study is the necessity to determine the conductivity of the medium used in a particular experiment. This conductivity strongly influences the dynamics of induced transmembrane voltage, and hence

Table 2
Critical values of pulse parameters

Pulse type	Parameter	Critical value	Explanation
Rectangular	Pulse duration	$< 1 \mu\text{s}^{\text{a}}$ $< 13 \mu\text{s}^{\text{b}}$	Induced voltage does not reach 90% of the steady-state value predicted by $\Delta\Phi_{\text{m}} = 3/2 ER \cos\theta$
Exponential	Time constant	$< 20 \mu\text{s}^{\text{a}}$ $< 260 \mu\text{s}^{\text{b}}$	Induced voltage does not reach 90% of the steady-state value predicted by $\Delta\Phi_{\text{m}} = 3/2 ER \cos\theta$
Sine-modulated	Sine frequency	$> 170 \text{ kHz}^{\text{a}}$ $> 14 \text{ kHz}^{\text{b}}$	Amplitude ratio between the offset and the sine in $\Delta\Phi_{\text{m}}(t)$ falls below 90% of the same ratio in $E(t)$
		$> 5.5 \text{ MHz}^{\text{a}}$ $> 600 \text{ kHz}^{\text{b}}$	Amplitude ratio between the offset and the sine in $\Delta\Phi_{\text{m}}(t)$ falls below 10% of the same ratio in $E(t)$

^aPhysiological medium ($\lambda_0 = 3.0 \times 10^{-1} \text{ S m}^{-1}$).

^bLow conductivity medium ($\lambda_0 = 1.0 \times 10^{-2} \text{ S m}^{-1}$); other values used in this estimation are given in Table 1.

imposes the range of pulse duration (and, though to less extent, the pulse amplitude; a thorough treatise of this problem is given in Ref. [10]). Fig. 5 gives an illustrative example of this influence, as the use of low conductivity medium practically eliminates the response to a 1 MHz sine wave.

Generally, each pulse shape is characterized by a key parameter (e.g., pulse duration, time constant, or sine frequency). One can define a certain critical value of this parameter, above (or below) which the differences between the steady-state results (given by Eq. (1)) and the dynamic analysis (based on the expressions for the time courses given in Appendix A) become obvious. Table 2 gives the key parameters of investigated pulse shapes and the estimations of pertaining critical values for both physiological and low conductivity medium.

Another very important value to bear in mind when designing the pulses for electroporation or electrofusion is the radius of the cells used in the experiment, since the amplitude of induced transmembrane voltage strongly depends on cell radius, ² as Eqs. (6) and (10) reveal.

Finally, we should also mention that the presented model, though already fairly complex, does not account for the fact that permittivity of any material is also frequency dependent. This dependence becomes apparent when components in the MHz range are present in the harmonic spectrum of $E(t)$ [38]. Some dielectrophoretic and electrorotational measurements imply that even in highly conductive extracellular solutions, very short pulses (or very high field frequencies) consistently induce lower transmembrane voltage than predicted theoretically [39,23]. If the model was expanded further by taking into account the frequency-dependent behavior of ε_{i} , ε_{m} , and ε_{o} , it might offer an explanation for these results.

Acknowledgements

This work was supported in part by the Ministry of Science and Technology of the Republic of Slovenia and by the Cellular Engineering Project (PECO Programme, Contract No. ERB-CIPA-CT 93-0235) of the European Community.

Appendix A

A.1. General principles

As shown in Fig. 2, three steps are necessary to obtain the time course of transmembrane voltage $\Delta\Phi_{\text{m}}(t)$ induced by a given time course of electric field strength $E(t)$. First, the Laplace transform of $E(t)$ is calculated:

$$E(s) = \mathcal{L}[E(t)] \quad (\text{A1})$$

$\Delta\Phi_{\text{m}}(s)$ is then obtained as

$$\Delta\Phi_{\text{m}}(s) = E(s) \cdot F(s) \cdot R \cos\theta \quad (\text{A2})$$

and the inverse Laplace transform of this expression yields the time course $\Delta\Phi_{\text{m}}(t)$:

$$\Delta\Phi_{\text{m}}(t) = \mathcal{L}^{-1}[\Delta\Phi_{\text{m}}(s)]. \quad (\text{A3})$$

This method is useful for simple mathematical functions $E(t)$, for which both the Laplace transform and the inverse

² A first look at Eq. (10) might suggest that the amplitude of $\Delta\Phi_{\text{m}}$ is exactly proportional to R . This is not true, however, since $F(s)$ is also a function of R .

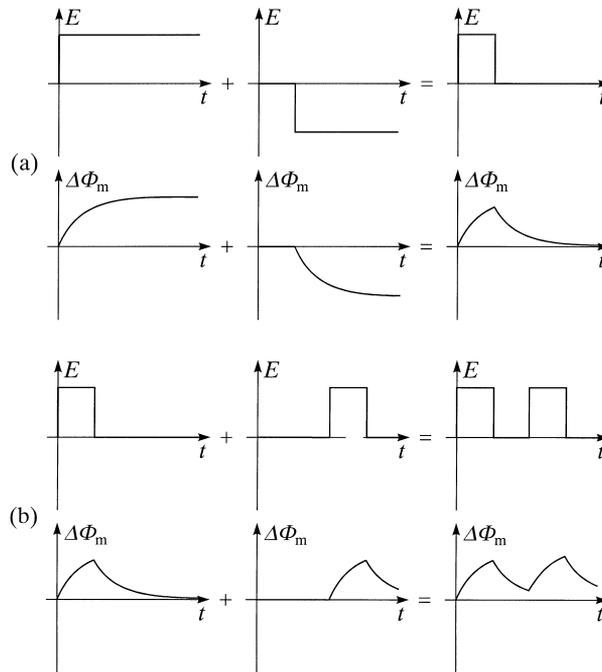


Fig. 7. An example of two consecutive applications of superposition principle. (a) Superposition of two oppositely signed step functions gives a rectangular pulse. Due to the linearity of the transforms, superposition of responses to these step functions yields a response to this rectangular pulse. (b) Superposition of shifted pulses yields a train of pulses, and superposition of responses to single pulses (which were constructed by the first superposition) results in the response to the train.

transform of corresponding $\Delta\Phi_m(t)$ given by Eq. (A2) are easily calculated. As for the more complex functions $E(t)$, many of them can be represented in the form of a linear combination of these simple functions:

$$E(t) = K_1 \cdot E_1(t) + K_2 \cdot E_2(t) + \dots + K_n \cdot E_n(t). \tag{A4}$$

Since both the Laplace transform and the inverse Laplace transform are linear operations, the response $\Delta\Phi_m(t)$ induced by $E(t)$ which conforms to (Eq. (A4)) can be obtained as a sum of partial responses, i.e.,

$$\Delta\Phi_m(t) = K_1 \cdot \Delta\Phi_{m1}(t) + K_2 \cdot \Delta\Phi_{m2}(t) + \dots + K_n \cdot \Delta\Phi_{mn}(t) \tag{A5}$$

where $\Delta\Phi_{mi}(t)$ denotes the response to $E_i(t)$ alone. Based on this property, $\Delta\Phi_m(t)$ induced by a rectangular pulse of amplitude E_0 and duration T can be calculated as a sum of two step responses bearing opposite signs, with amplitudes $+E_0$ and $-E_0$, the second step response delayed for T with respect to the first one. Similarly, a response to trapezoidal pulse of duration T and rise time T_{on} is obtained as a sum of four ramp responses, the last three shifted after the first one by T_{on} , $T - T_{on}$ (presuming thereby $T_{off} = T_{on}$), and T , respectively (the terms signed $+$, $-$, $-$, and $+$, respectively, for a positive pulse). Using the rules of linearity once again, we can take the obtained pulse response and consecutively superimpose an array of shifted pulse responses, thus determining the response to a series (train) of pulses. The described example of multilevel superposition is sketched in Fig. 7.

A.2. Rectangular pulses

We first calculate $\Delta\Phi_m(t)$ induced by the unit step function (we denote the step response by $\Delta\Phi_{m1}$):

$$E(t) = u_0(t) \tag{A6a}$$

$$E(s) = \frac{1}{s} \tag{A6b}$$

$$\frac{\Delta\Phi_{m1}(s)}{R} = F(s) \cdot E(s) = \frac{a_1 + a_2 s + a_3 s^2}{b_1 s + b_2 s^2 + b_3 s^3} \tag{A6c}$$

$$\begin{aligned} \frac{\Delta\Phi_{m1}(t)}{R} = \frac{a_3}{b_3} \cdot u_0(t) + & \left[\frac{a_1}{2b_1} - \frac{a_3}{2b_3} + \frac{\frac{a_1b_2}{2b_1} - a_2 + \frac{a_3b_2}{2b_3}}{\sqrt{b_2^2 - 4b_1b_3}} \right] \cdot \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_1}}\right) \cdot u_0(t) \\ & + \left[\frac{a_1}{2b_1} - \frac{a_3}{2b_3} - \frac{\frac{a_1b_2}{2b_1} - a_2 + \frac{a_3b_2}{2b_3}}{\sqrt{b_2^2 - 4b_1b_3}} \right] \cdot \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_2}}\right) \cdot u_0(t). \end{aligned} \quad (\text{A6d})$$

The constants from a_1 up to b_3 are given by Eqs. (9a), (9b), (9c), (9d), (9e) and (9f) in the main text, and the time constants τ_1 and τ_2 are given by:

$$\tau_1 = \frac{2b_3}{b_2 - \sqrt{b_2^2 - 4b_1b_3}}, \quad (\text{A6e})$$

$$\tau_2 = \frac{2b_3}{b_2 + \sqrt{b_2^2 - 4b_1b_3}}. \quad (\text{A6f})$$

We choose to represent the powers of the exponential parts in Eq. (A6d) in terms of τ_1 and τ_2 , because the time constants given by Eqs. (A6e) and (A6f) characterize the responses to all the treated functions $E(t)$, as we shall see later.

Eq. (A6d) gives the response normalized to both the cell radius (R) and the amplitude of electric field strength (E). To obtain the actual response, the amplitude has to be scaled by both R and E . A closer look at Eq. (A6d) reveals that at $t \rightarrow 0$ the normalized response equals a_3/b_3 , and with $t \rightarrow \infty$ it approaches a_1/b_1 .

To obtain the response to a rectangular pulse, we combine two step responses, as described before and illustrated in Fig. 7:

$$\Delta\Phi_m(t) = \Delta\Phi_{m1}(t) \cdot u_0(t) - \Delta\Phi_{m1}(t - T_1) \cdot u_{T_1}(t) \quad (\text{A7})$$

where T_1 is the pulse duration.

Using the superposition principle once again, we can formulate the response to a train of pulses as:

$$\Delta\Phi_m(t) = \sum_{k=0}^{\infty} \left[\Delta\Phi_{m1}(t - kT_2) \cdot u_{kT_2}(t) - \Delta\Phi_{m1}((t - T_1) - kT_2) \cdot u_{T_1+kT_2}(t) \right] \quad (\text{A8})$$

where T_1 is again the pulse duration, and T_2 is the pulse period (time elapsed between consecutive pulses). To evaluate the response in a finite time range, e.g., up to $t = T_{\text{fin}}$, one only has to evaluate the sum up to $k = T_{\text{fin}}/T_2$.

A.3. Triangular and trapezoidal pulses

To analyze the response to a triangular or a trapezoidal pulse, we first determine the response induced by the unit ramp function, denoting this response by $\Delta\Phi_{m1}(t)$:

$$E(t) = (t) \cdot u_0(t) \quad (\text{A9a})$$

$$E(s) = \frac{1}{s^2} \quad (\text{A9b})$$

$$\frac{\Delta\Phi_{m1}(s)}{R} = F(s) \cdot E(s) = \frac{a_1 + a_2s + a_3s^2}{b_1s^2 + b_2s^3 + b_3s^4} \quad (\text{A9c})$$

$$\begin{aligned} \frac{\Delta\Phi_{m1}(t)}{R} = \frac{a_1}{b_1} \cdot t \cdot u_0(t) + & \left[\frac{a_2}{2b_1} - \frac{a_1b_2}{2b_1^2} + \frac{\frac{a_1b_3}{b_1} + \frac{a_2b_2}{2b_1} - \frac{a_1b_2^2}{2b_1^2} - a_3}{\sqrt{b_2^2 - 4b_1b_3}} \right] \cdot \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_1}}\right) \cdot u_0(t) \\ & + \left[\frac{a_2}{2b_1} - \frac{a_1b_2}{2b_1^2} - \frac{\frac{a_1b_3}{b_1} + \frac{a_2b_2}{2b_1} - \frac{a_1b_2^2}{2b_1^2} - a_3}{\sqrt{b_2^2 - 4b_1b_3}} \right] \cdot \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_2}}\right) \cdot u_0(t) \end{aligned} \quad (\text{A9d})$$

where the constants from a_1 up to b_3 are given by Eqs. (9a), (9b), (9c), (9d), (9e) and (9f) in the main text, while τ_1 and τ_2 are defined by Eqs. (A6e) and (A6f), respectively.

The response to a symmetrical triangular pulse of duration T_1 is then given by:

$$\Delta\Phi_m(t) = \Delta\Phi_{mt}(t) \cdot u_0(t) - 2 \cdot \Delta\Phi_{mt}\left(t - \frac{T_1}{2}\right) \cdot u_{\frac{T_1}{2}}(t) + \Delta\Phi_{mt}(t - T_1) \cdot u_{T_1}(t) \quad (\text{A10})$$

whereas the response to a symmetrical trapezoidal pulse of duration T_1 and rise time T_{on} is expressed as:

$$\Delta\Phi_m(t) = \Delta\Phi_{mt}(t) \cdot u_0(t) - \Delta\Phi_{mt}(t - T_{on}) \cdot u_{T_{on}}(t) - \Delta\Phi_{mt}(t - (T_1 - T_{on}))u_{T_1 - T_{on}}(t) + \Delta\Phi_{mt}(t)(t - T_1)u_{T_1}(t). \quad (\text{A11})$$

To obtain the response to a train of pulses, we gather a series of shifted pulse responses into a sum on the analogy of the principle presented by Eq. (A8).

A.4. Exponential pulses

For an exponentially decaying pulse with time constant τ_p , we denote the induced transmembrane voltage by $\Delta\Phi_{mexp}(t)$ and compute:

$$E(t) = e^{-\frac{t}{\tau_p}} \cdot u_0(t) \quad (\text{A12a})$$

$$E(s) = \frac{1}{s + \frac{1}{\tau_p}} \quad (\text{A12b})$$

$$\frac{\Delta\Phi_{mexp}(s)}{R} = F(s) \cdot E(s) = \frac{a_1 + a_2 s + a_3 s^2}{(b_1 + b_2 s + b_3 s^2)(s + \tau_p^{-1})} \quad (\text{A12c})$$

$$\begin{aligned} \frac{\Delta\Phi_{mexp}(t)}{R} &= \left[\frac{a_1 \tau_p^2 - a_2 \tau_p + a_3}{b_1 \tau_p^2 - b_2 \tau_p + b_3} \right] \cdot e^{-\frac{t}{\tau_p}} \cdot u_0(t) \\ &+ \left[\frac{\left(\frac{a_3 b_1}{b_3} - a_1 \right) \cdot \tau_p + a_2 - \frac{a_3 b_2}{b_3}}{2 \cdot (b_1 \tau_p^2 - b_2 \tau_p + b_3)} + \frac{\left(a_2 b_1 - \frac{a_1 b_2}{2} - \frac{a_3 b_1 b_2}{2 b_3} \right) \cdot \tau_p + a_1 b_3 - a_3 b_1 - \frac{a_2 b_2}{2} + \frac{a_3 b_2^2}{2 b_3}}{(b_1 \tau_p^2 - b_2 \tau_p + b_3) \sqrt{b_2^2 - 4 b_1 b_3}} \right] \\ &\cdot \tau_p \cdot e^{-\frac{t}{\tau_1}} \cdot u_0(t) \\ &+ \left[\frac{\left(\frac{a_3 b_1}{b_3} - a_1 \right) \cdot \tau_p + a_2 - \frac{a_3 b_2}{b_3}}{2 \cdot (b_1 \tau_p^2 - b_2 \tau_p + b_3)} - \frac{\left(a_2 b_1 - \frac{a_1 b_2}{2} - \frac{a_3 b_1 b_2}{2 b_3} \right) \cdot \tau_p + a_1 b_3 - a_3 b_1 - \frac{a_2 b_2}{2} + \frac{a_3 b_2^2}{2 b_3}}{(b_1 \tau_p^2 - b_2 \tau_p + b_3) \sqrt{b_2^2 - 4 b_1 b_3}} \right] \\ &\cdot \tau_p \cdot e^{-\frac{t}{\tau_2}} \cdot u_0(t). \end{aligned} \quad (\text{A12d})$$

This solution already gives a response to an exponential pulse. To obtain a response to a train of exponential pulses, we again follow the logic presented by Eq. (A8), only this time the expression is even simpler. For a pulse period T_2 , it reads:

$$\Delta\Phi_m(t) = \sum_{k=0}^{\infty} \Delta\Phi_{mexp}(t - kT_2) u_{kT_2}(t) \quad (\text{A13})$$

A.5. Sine(RF)-modulated pulses

First, we calculate the transmembrane voltage $\Delta\Phi_{msin}$ induced by a sine-shaped $E(t)$:

$$E(t) = \sin \omega t \cdot u_0(t) \quad (\text{A14a})$$

$$E(s) = \frac{\omega}{s^2 + \omega^2} \quad (\text{A14b})$$

$$\frac{\Delta\Phi_{msin}(s)}{R} = \frac{\omega(a_1 + a_2 s + a_3 s^2)}{(b_1 + b_2 s + b_3 s^2)(s^2 + \omega^2)} \quad (\text{A14c})$$

$$\begin{aligned}
\frac{\Delta\Phi_{\text{msin}}(t)}{R} = & \frac{a_1 b_1 + (a_2 b_2 - a_1 b_3 - a_3 b_1) \omega^2 + a_3 b_3 \omega^4}{b_1^2 + (b_2^2 - 2b_1 b_3) \omega^2 + b_3^2 \omega^4} \cdot \sin \omega t \cdot u_0(t) \\
& + \frac{(a_2 b_1 - a_1 b_2) \omega + (a_3 b_2 - a_2 b_3) \omega^3}{b_1^2 + (b_2^2 - 2b_1 b_3) \omega^2 + b_3^2 \omega^4} \cdot \cos \omega t \cdot u_0(t) \\
& + \left[\frac{\frac{a_1 b_2}{2} - \frac{a_2 b_1}{2} + \frac{a_3 b_1^2 - a_1 b_1 b_3 - \frac{a_2 b_1 b_2}{2} + \frac{a_1 b_2^2}{2}}{\sqrt{b_2^2 - 4b_1 b_3}}}{b_1^2 + (b_2^2 - 2b_1 b_3) \omega^2 + b_3^2 \omega^4} \right. \\
& \left. + \frac{\frac{a_2 b_3}{2} - \frac{a_3 b_2}{2} + \frac{a_1 b_3^2 - a_3 b_1 b_3 - \frac{a_2 b_2 b_3}{2} + \frac{a_3 b_2^2}{2}}{\sqrt{b_2^2 - 4b_1 b_3}}}{b_1^2 + (b_2^2 - 2b_1 b_3) \omega^2 + b_3^2 \omega^4} \omega^2 \right] \cdot \omega \cdot e^{-\frac{t}{\tau_1}} \cdot u_0(t) \\
& + \left[\frac{\frac{a_1 b_2}{2} - \frac{a_2 b_1}{2} - \frac{a_3 b_1^2 - a_1 b_1 b_3 - \frac{a_2 b_1 b_2}{2} + \frac{a_1 b_2^2}{2}}{\sqrt{b_2^2 - 4b_1 b_3}}}{b_1^2 + (b_2^2 - 2b_1 b_3) \omega^2 + b_3^2 \omega^4} \right. \\
& \left. + \frac{\frac{a_2 b_3}{2} - \frac{a_3 b_2}{2} - \frac{a_1 b_3^2 - a_3 b_1 b_3 - \frac{a_2 b_2 b_3}{2} + \frac{a_3 b_2^2}{2}}{\sqrt{b_2^2 - 4b_1 b_3}}}{b_1^2 + (b_2^2 - 2b_1 b_3) \omega^2 + b_3^2 \omega^4} \omega^2 \right] \cdot \omega \cdot e^{-\frac{t}{\tau_2}} \cdot u_0(t). \tag{A14d}
\end{aligned}$$

To obtain a response to a sine-modulated step function, we add the step response to the calculated response:

$$\Delta\Phi_{\text{msmp}} = \Delta\Phi_{\text{msin}} + \Delta\Phi_{\text{m1}} \tag{A15}$$

where it is presumed that both responses have already been scaled: $\Delta\Phi_{\text{msin}}$ by R and the amplitude of sine-shaped $E(t)$, and $\Delta\Phi_{\text{m1}}$ by R and the amplitude of step-shaped $E(t)$. To get a response to a sine-modulated pulse with duration T_1 , we simply have to take the response given by Eq. (A15), and subtract an equivalent response at $t = T_1$:

$$\Delta\Phi_{\text{m}}(t) = \Delta\Phi_{\text{msmp}}(t) \cdot u_0(t) - \Delta\Phi_{\text{msmp}}(t - T_1) \cdot u_{T_1}(t). \tag{A16}$$

The response to a train of sine-modulated pulses is then calculated using the principle from Eq. (A8).

A.6. Possible simplifications of the calculated expressions

Using a computer, one can easily evaluate the expressions given in the preceding subsections. Nevertheless, when realistic values of the parameters are considered, these suggest several possibilities for simplifications. Firstly, membrane conductivity is by several orders of magnitude smaller compared to the conductivities of the cytoplasm and the extracellular medium (see Table 1):

$$\lambda_{\text{m}} \ll \lambda_1, \lambda_o. \tag{A17}$$

Secondly, membrane thickness is about a thousand-fold smaller than cell radius:

$$d \ll R \quad (\text{A18})$$

One generally justifiable simplification emerges from a thorough analysis of expressions in Eqs. (A6d), (A9d), (A12d) and (A14d). Using realistic values of the parameters (see Table 1), it shows that the amplitude of the exponential term involving τ_2 is always much smaller (at least four orders of magnitude) than the amplitude of the term involving τ_1 . Thus, the partial response pertaining to τ_2 can be neglected without serious consequences, giving the system an apparent first-order nature.

Based on Eqs. (A17) and (A18), some terms in the expressions describing a_1 , a_2 , a_3 , b_1 , b_2 , and b_3 , given by Eqs. (9a), (9b), (9c), (9d), (9e) and (9f), appear negligible in comparison to the others. One should, however, be very careful when deciding to eliminate these terms. Since the apparently largest terms often cancel out after a full expansion of the expression, the seemingly negligible terms that include d , or λ_m , sometimes play a major role in determination of the response. An example of an invalid simplification can be illustrated using expression for τ_1 , given by Eq. (A6e); if expressions describing b_1 , b_2 and b_3 are primarily modified by eliminating the terms involving λ_m , and then inserted into Eq. (A6e), the computation yields $\tau_1 = 0$, which is obviously wrong. If, however, all the terms are retained until the expression is fully expanded, and the approximations are applied to this expression, one obtains a solution which yields a more plausible estimation of τ_1 (due to the size of the expanded expression, we avoid its explicit formulation here). Commonly, an additional postulation is used that both the extracellular medium and the cytoplasm are purely conductive:

$$\varepsilon_i = \varepsilon_o = 0. \quad (\text{A19})$$

As all the terms involving ε_i and ε_o are left out, the size of the expression is vastly reduced. Though in case of a general system, the appropriateness of this procedure may be questioned, when used with the parameter values representative for a cell suspension, the resulting expression

$$\tau_1 = \frac{R\varepsilon_m(\lambda_i + 2\lambda_o)}{R\lambda_m(\lambda_i + 2\lambda_o) + 2d\lambda_i\lambda_o} \quad (\text{A20})$$

can be shown to never deviate more than 2% from the complete expression given by Eq. (A6e).

Expressing ε_m/d as membrane capacitance (c_m) yields the well-known expression for the time constant of the membrane as given by Pauly and Schwan [11]:

$$\tau_1 = \frac{Rc_m}{\frac{2\lambda_i\lambda_o}{\lambda_i + 2\lambda_o} + \frac{R}{d}\lambda_m}. \quad (\text{A21})$$

References

- [1] K.R. Robinson, The responses of cells to electrical fields, *J. Cell Biol.* 101 (1985) 2023–2027.
- [2] P. Marszalek, D.S. Liu, T.Y. Tsong, Schwan equation and transmembrane potential induced by alternating electric field, *Biophys. J.* 58 (1990) 1053–1058.
- [3] T.Y. Tsong, Electroporation of cell membranes, *Biophys. J.* 60 (1991) 297–306.
- [4] W. Krassowska, J.C. Neu, Response of a single cell to an external electric field, *Biophys. J.* 66 (1994) 1768–1776.
- [5] E. Neumann, A.E. Sowers, C.A. Jordan (Eds.), *Electroporation and Electrofusion in Cell Biology*, Plenum, New York, 1989.
- [6] D.C. Chang, B.M. Chassy, J.A. Saunders, A.E. Sowers (Eds.), *Guide to Electroporation and Electrofusion*, Academic Press, San Diego, 1992.
- [7] T.K. Wong, E. Neumann, Electric field mediated gene transfer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107 (2) (1982) 584–587.
- [8] M.M.S. Lo, T.Y. Tsong, M.K. Conrad, S.M. Strittmatter, L.D. Hester, S. Snyder, Monoclonal antibody production by receptor-mediated electrically induced cell fusion, *Nature* 310 (1984) 792–794.
- [9] M. Okino, H. Mohri, Effects of a high-voltage electrical impulse and an anticancer drug on in vivo growing tumors, *Jpn. J. Cancer Res.* 78 (1987) 1319–1321.
- [10] T. Kotnik, F. Bobanovič, D. Miklavcic, Sensitivity of transmembrane voltage induced by applied electric fields – a theoretical analysis, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 43 (1997) 285–291.
- [11] H. Pauly, H.P. Schwan, Über die Impedanz einer Suspension von kugelförmigen Teilchen mit einer Schale, *Z. Naturforsch., B: Anorg. Chem., Org. Chem.* 14 (1959) 125–131.
- [12] D. Semrov, D. Miklavcic, Calculation of the electrical parameters in electrochemotherapy of solid tumors in mice, *Comput. Biol. Med.* (in press).
- [13] R.M. Fano, L.J. Chu, R.B. Adler, *Electromagnetic Fields, Energy, and Forces*, Wiley, New York, 1960.
- [14] R.V. Churchill, *Operational Mathematics*, McGraw-Hill, New York, 1972.
- [15] M. Hibino, H. Itoh, K. Kinoshita Jr., Time courses of electroporation as revealed by submicrosecond imaging of transmembrane potential, *Biophys. J.* 64 (1993) 1789–1800.
- [16] G. Fuhr, F. Geissler, T. Müller, R. Hagedorn, H. Torner, Differences in the rotation spectra of mouse oocytes and zygotes, *Biochim. Biophys. Acta* 930 (1987) 65–71.

- [17] W.M. Arnold, R.K. Schmutzler, A.G. Schmutzler, H. van der Ven, S. Al-Hasani, D. Krebs, U. Zimmermann, Electrorotation of mouse oocytes: single-cell measurements of zona-intact and zona-free cells and of the isolated zona pellucida, *Biochim. Biophys. Acta* 905 (1987) 454–464.
- [18] K. Asami, T. Hanai, N. Koizumi, Dielectric properties of yeast cells, *J. Membr. Biol.* 28 (1976) 169–180.
- [19] C.M. Harris, D.B. Kell, The radio-frequency dielectric properties of yeast cells measured with a rapid, automated, frequency-domain dielectric spectrometer, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 11 (1983) 15–28.
- [20] R. Hölzel, I. Lamprecht, Dielectric properties of yeast cells as determined by electrorotation, *Biochim. Biophys. Acta* 1104 (1992) 195–200.
- [21] P.R.C. Gascoyne, R. Pethig, J.P.H. Burt, F.F. Becker, Membrane changes accompanying the induced differentiation of Friend murine erythroleukemia cells studied by dielectrophoresis, *Biochim. Biophys. Acta* 1146 (1993) 119–126.
- [22] X. Hu, W.M. Arnold, U. Zimmermann, Alterations in the electrical properties of T and B lymphocyte membranes induced by mitogenic stimulation: activation monitored by electrorotation of single cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1021 (1990) 191–200.
- [23] D. Wicher, J. Gundel, Electrorotation of multi- and oligolamellar liposomes, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 21 (1989) 279–288.
- [24] C. Grosse, H.P. Schwan, Cellular membrane potentials induced by alternating fields, *Biophys. J.* 63 (1992) 1632–1642.
- [25] G. Fuhr, R. Glaser, R. Hagedorn, Rotation of dielectrics in a rotating electric high-frequency field, *Biophys. J.* 49 (1986) 395–402.
- [26] K.V.I.S. Kaler, T.B. Jones, Dielectrophoretic spectra of single cells determined by feedback-controlled levitation, *Biophys. J.* 57 (1990) 173–182.
- [27] J. Gimsa, R. Glaser, G. Fuhr, in: W. Schutt, H. Klinkmann, I. Lamprecht, T. Wilson (Eds.), *Physical Characterization of Biological Cells*, Verlag Gesundheit, Berlin, 1991, pp. 295–323.
- [28] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing, New York, 1994.
- [29] E. Tekle, R.D. Astumian, P.B. Chock, Selective and asymmetric molecular transport across electroporated cell membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (1994) 11512–11516.
- [30] S. Kakorin, S.P. Stoylov, E. Neumann, Electro-optics of membrane electroporation in diphenylhexatriene-doped lipid bilayer vesicles, *Biophys. Chem.* 58 (1996) 109–116.
- [31] A.E. Sowers, in: E. Neumann, A.E. Sowers, C.A. Jordan (Eds.), *Electroporation and Electrofusion of Cell Membranes*, Plenum, New York, 1989, pp. 229–256.
- [32] T.C. Tomov, Quantitative dependence of electroporation on the pulse parameters, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 37 (1995) 101–107.
- [33] U. Pliquett, E.A. Gift, J.C. Weaver, Determination of the electric field and anomalous heating caused by exponential pulses with aluminum electrodes in electroporation experiments, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 39 (1996) 39–53.
- [34] D.C. Chang, Cell poration and cell fusion using an oscillating electric field, *Biophys. J.* 56 (1989) 641–652.
- [35] D.C. Chang, P.Q. Gao, B.L. Maxwell, High efficiency gene transfection by electroporation using a radio-frequency electric field, *Biochim. Biophys. Acta* 1092 (1991) 153–160.
- [36] K.M. Merz Jr., B. Roux, in: K.M. Merz Jr., B. Roux (Eds.), *Biological Membranes: A Molecular Perspective from Computation and Experiment*, Birkhäuser, Boston, 1996, p. viii.
- [37] J.C. Weaver, Y.A. Chizmadzhev, Theory of electroporation: a review, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 41 (1996) 135–160.
- [38] H. Fröhlich, *Theory of Dielectrics*, Clarendon Press, Oxford, 1986.
- [39] P.R.C. Gascoyne, F.F. Becker, X.B. Wang, Numerical analysis of the influence of experimental conditions on the accuracy of dielectric parameters derived from electrorotation measurements, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 36 (1995) 115–125.

2.3 ARTICLE 3

Second-order model of membrane electric field induced by alternating electric fields

[Modèle de deuxième ordre du champ électrique membranaire induit par des champs électriques alternatifs]

Publié dans *IEEE Transactions on Biomedical Engineering* 47: 1074-1081, 2000

Sommaire: Si des cellules sont exposées aux champs électriques alternatifs ayant une fréquence inférieure à 100 kHz, le champ externe est amplifié dans la membrane de cellules d'un facteur de plusieurs milliers de fois (plateau à basse fréquence), alors qu'au-dessus de 100 kHz, cette amplification diminue graduellement avec l'augmentation de fréquence. Pour des fréquences inférieures à 10 MHz, cette situation est bien décrite par la théorie de premier ordre qui traite le cytoplasme et le milieu externe comme des conducteurs purs. À des fréquences plus élevées, les propriétés capacitives du cytoplasme et du milieu externe deviennent de plus en plus importantes et doivent être prises en considération. Ceci mène à un modèle plus général – le modèle de deuxième ordre – qui est présenté en détail dans cet article. À la différence du modèle de premier ordre, le modèle de deuxième ordre montre qu'à des fréquences au-dessus de 10 MHz, le champ électrique membranaire cesse de diminuer et se stabilise, avec une amplification de quelques dizaines de fois par rapport au champ externe (plateau à haute fréquence). L'existence du plateau à haute fréquence pourrait avoir des conséquences importantes sur les théories actuelles concernant les effets des champs électriques à haute fréquence sur les cellules et leurs membranes.

Second-Order Model of Membrane Electric Field Induced by Alternating External Electric Fields

Tadej Kotnik* and Damijan Miklavčič

Abstract—With biological cells exposed to ac electric fields below 100 kHz, external field is amplified in the cell membrane by a factor of several thousands (low-frequency plateau), while above 100 kHz, this amplification gradually decreases with frequency. Below 10 MHz, this situation is well described by the established first-order theory which treats the cytoplasm and the external medium as pure conductors. At higher frequencies, capacitive properties of the cytoplasm and the external medium become increasingly important and thus must be accounted for. This leads to a broader, second-order model, which is treated in detail in this paper. Unlike the first-order model, this model shows that above 10 MHz, the membrane field amplification stops decreasing and levels off again in the range of tens (high-frequency plateau). Existence of the high-frequency plateau could have an important impact on present theories of high-frequency electric fields effects on cells and their membranes.

Index Terms—AC electric fields, electric field stimulation, membrane electric field, membrane electrodynamics, transmembrane voltage.

I. INTRODUCTION

EXPOSURE of biological cells to electric fields can lead to a variety of biophysical and biochemical responses. Applications based on these responses can roughly be divided into two groups. The first group uses electric fields as a tool to modify various properties of the cells. Herein are the applications that utilize the increase in membrane permeability caused by electric fields for introduction of various molecules into cells [1]–[3], insertion of molecules into cell membranes [4], [5], and fusion of cells [6], [7]. The second group of applications uses electric fields and currents as tools to characterize various properties of biological cells or their constituents, both in suspensions and in tissues. Among the most important approaches in such characterization is the evaluation of cell's response to electric fields at different frequencies. By varying the frequency of the field, values of the measured parameters form spectra: frequency dependence of bulk dielectric permittivity of a suspension or tissue constitutes its dielectric relaxation spectrum [8], frequency dependence of the cellular angular velocity in rotating electric fields forms the electrorotational spectrum [9], and frequency

dependence of the cellular translational velocity in nonuniform alternating fields is the dielectrophoretic spectrum [10]. With these methods, various physical quantities can be determined that are difficult to assess by direct measurement (e.g., conductivity and capacitance of the membrane and the cytoplasm).

The basic mechanism underlying majority of these methods is the inducement of potential difference across the membrane by the external electric field, which results in the transmembrane voltage (TMV) and membrane electric field. When induced by ac fields, these quantities depend on frequency, and the knowledge of this dependence is of significant importance for the understanding of more complex phenomena, such as the spectra mentioned above.

The classical theory of transmembrane voltage inducement has been developed in the 1950's by H. P. Schwan and co-workers [11], [12]. In this theory, both the cytoplasm and the extracellular medium are described as purely conductive (i.e., having nonzero conductivity, but zero dielectric permittivity), while the membrane is treated as a lossy dielectric (i.e., having both nonzero conductivity and permittivity). This leads to the description of the inducement as a first-order process characterized by a time constant [12]

$$\tau_m = \frac{Rc_m}{\lambda_i + 2\lambda_e + \frac{R}{d}\lambda_m} \quad (1)$$

where λ_i , λ_m , and λ_e are the conductivities of the cytoplasm, cell membrane, and extracellular medium, respectively, R is the cell radius, d is the membrane thickness, and $c_m = \varepsilon_m/d$ is the membrane capacitance, with ε_m denoting the dielectric permittivity of the membrane.¹

This description also allows for the derivation of the TMV induced by an external ac electric field. Written in the frequency plane, it reads [13]

$$U_m(\omega, \theta) = \frac{3}{2}E_e R \cos \theta \frac{1}{1 + j\omega\tau_m} \quad (2)$$

where E_e is the amplitude of the external electric field, θ is the polar angle measured with respect to the direction of the field, and $\omega = 2\pi f$, with f denoting the frequency of the field. In (2), U_m is complex; its absolute value gives the amplitude of the TMV, while its argument is the directed angle corresponding to the phase shift between U_m and E_e (a negative value implies a lag of U_m behind E_e).

¹We use the term "permittivity" for the total permittivity of the material, i.e., the product of the relative permittivity of the material (e.g., $\varepsilon_{r, \text{water}, 20^\circ\text{C}} \approx 80.3$), and the dielectric constant of the vacuum ($\varepsilon_0 = 8.854 \times 10^{-12}$ As/Vm).

Manuscript received October 11, 1999; revised March 29, 2000. This work was supported by the Ministry of Science and Technology of the Republic of Slovenia. Asterisk indicates corresponding author.

*T. Kotnik is with the Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana, Tržaška 25, SI-1000 Ljubljana, Slovenia. He is also with PPMB/UMR 8532 CNRS, Institut Gustave-Roussy, 39 rue C. Desmoulins, F-94805 Villejuif, France (e-mail: tadej.kotnik@fe.uni-lj.si).

D. Miklavčič is with the Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana, SI-1000 Ljubljana, Slovenia.

Publisher Item Identifier S 0018-9294(00)06398-9.

TABLE I
VALUES USED IN THE CALCULATIONS

Parameter	Symbol	Value	Reference
Cell radius	R	10 μm	
Membrane thickness	d	5 nm	[29]
Conductivity of the cytoplasm	λ_i	0.3 S/m	[30], [31]
Conductivity of the membrane	λ_m	3×10^{-7} S/m	[32]
Conductivity of the extracell. medium	λ_e	1.2 S/m	[33] (blood serum at 35°C)
Permittivity of the cytoplasm	ϵ_i	6.4×10^{-10} As/Vm	set at the same value as ϵ_e
Permittivity of the membrane	ϵ_m	4.4×10^{-11} As/Vm	[32]
Permittivity of the extracell. medium	ϵ_e	6.4×10^{-10} As/Vm	[17], [34] (physiological saline at 35°C)

We choose for the sake of clarity to henceforth treat the conditions at $\theta = 0$, where U_m has a peak value. We denote $U_m(\omega) \equiv U_m(\omega, 0)$ and (2) becomes

$$U_m(\omega) = \frac{3}{2} E_e R \frac{1}{1 + j\omega\tau_m} \quad (3)$$

while the spatial dependence on θ is restored by simply multiplying the result by $\cos\theta$ (this also applies to E_m and G_E , which will be introduced in the following paragraphs).

Throughout the derivation of the TMV, cell membrane is assumed to be homogeneous. Retaining this assumption, the induced membrane electric field can be calculated as

$$E_m(\omega) = \frac{U_m(\omega)}{d} \quad (4)$$

and the amplification of the external electric field in the membrane is then given by

$$G_E(\omega) = \frac{E_m(\omega)}{E_e} = \frac{3R}{2d} \frac{1}{1 + j\omega\tau_m}. \quad (5)$$

If typical values are assigned to the parameters contained in (1) and (5) (Table I), the magnitude of the amplification $|G_E(\omega)|$ (i.e., the ratio of the amplitudes of E_m and E_e) and the phase $\angle G_E(\omega)$ (i.e., the phase shift between E_m and E_e) can be plotted as functions of frequency in form of a Bode plot (Fig. 1).

According to (5), far below the *breakpoint frequency* $f = 1/(2\pi\tau_m)$, which is approximately 100 kHz in physiological conditions (Table I), the amplification is practically constant (the *low-frequency plateau*). Above the breakpoint frequency, $|G_E(\omega)|$ is decreasing, asymptotically approaching a negative unit slope. The limiting values at $\omega \rightarrow 0$ and $\omega \rightarrow \infty$ are easily determined

$$|G_E(0)| = \frac{3R}{2d}, \quad \angle G_E(0) = 0^\circ \quad (6)$$

$$|G_E(\infty)| = 0, \quad \angle G_E(\infty) = -90^\circ. \quad (7)$$

While the situation at low frequencies is not significantly affected by the assumption of purely conductive properties of the cytoplasm and extracellular medium, it becomes progressively

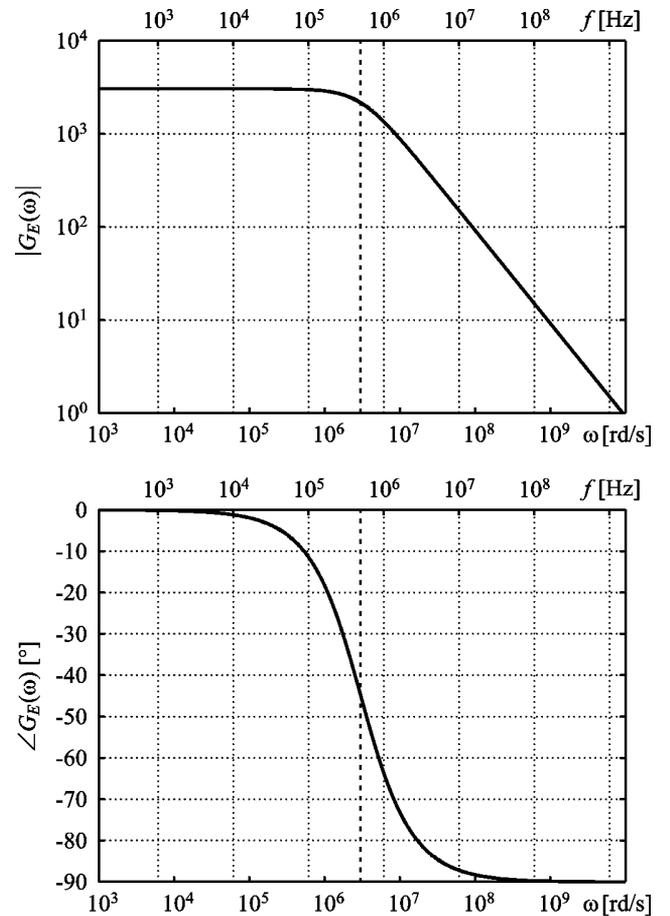


Fig. 1. Bode plot of the amplification of an external ac electric field in the membrane according to the established first-order treatment given by (5). Top: magnitude of the amplification; bottom: phase of the amplification (negative phase corresponds to a lag of the membrane field behind the external field). In each graph, the bottom abscissa gives the angular frequency $\omega = 2\pi f$, and the top abscissa the corresponding frequency $f = 1/2\pi\tau_m$. The bold dotted vertical corresponds to the breakpoint frequency $f = 1/2\pi\tau_m$. Parameter values used in the calculation are given in Table I.

more questionable with increase in frequency, as the capacitive properties of both the cytoplasm and the extracellular medium gain importance. In this paper, we reevaluate the process of TMV and membrane field inducement in ac electric fields, with

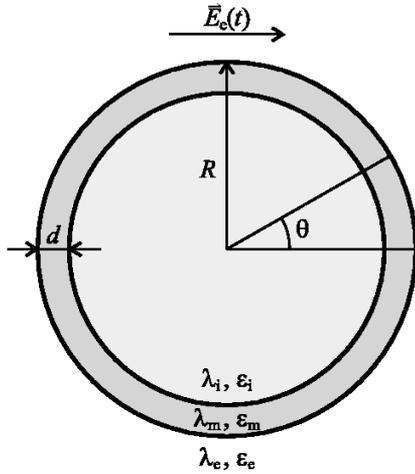


Fig. 2. In the model on which our calculations are based, the cell is a sphere with radius of R , enclosed by a membrane of uniform thickness d . External electric field is homogeneous and retains its orientation, but its strength E_e varies with time. Conductivities and permittivities are attributed to regions occupied by cytoplasm (λ_i, ϵ_i), membrane (λ_m, ϵ_m) and extracellular medium (λ_e, ϵ_e).

each of the regions assigned both a nonzero electric conductivity and dielectric permittivity. We show that in the submegahertz range, predictions of the derived model are very close to (5), but then start to diverge, quickly leading to significant differences between the two models.²

II. METHOD OF ANALYSIS

A spherical cell surrounded by a medium represents a system characterized by two geometrical parameters, namely cell radius (R) and membrane thickness (d), and three sets of material parameters, each describing the properties of an individual material within the system (the cytoplasm, cell membrane, and extracellular medium). If the system is exposed to electric fields, the set of parameters describing a material consists of two quantities—its electric conductivity (λ) and dielectric permittivity (ϵ). This model is depicted in Fig. 2.

Though treatment of materials as pure conductors is under some circumstances justified, in reality every material demonstrates some dielectric permittivity, which affects the electric field propagation and, more importantly, subsequent electric field redistribution due to polarization effects. To enable a treatment similar to that of pure conductors, conductivity and

²Equation (5) is also invalid when cells are suspended in an artificial medium with a conductivity several orders of magnitude lower than physiological [12]. While this paper focuses on the physiological environment, the process of inducement in general media is treated in detail in [15].

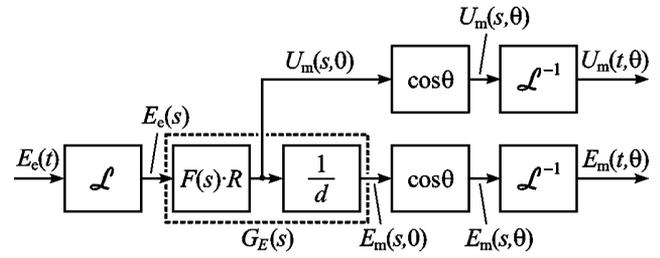


Fig. 3. To determine the time courses of transmembrane voltage and membrane electric field induced by a time-varying external electric field, the time course of the external field must first be described in terms of a function $E_e(t)$. The Laplace transform then gives the corresponding $E_e(s)$. The product of $E_e(s)$, $F(s)$, R and $\cos \theta$ represents the induced transmembrane voltage in complex-frequency space, $U_m(s)$, while an additional division by d gives the induced membrane field, $E_m(s)$. The inverse Laplace transform casts both results into the time domain. Due to the linearity of the system, the blocks of the system can be distributed in several equivalent ways, with this particular arrangement showing $G_E(s)$ as a compact subsystem.

permittivity of the material are combined into the *admittivity operator* [14]

$$\{\lambda, \epsilon\} \rightarrow \Lambda = \lambda + \epsilon \frac{\partial}{\partial t} \quad (8)$$

To avoid the use of differential operators, the analysis is transferred from the time domain into the complex-frequency domain, where Λ becomes

$$\Lambda = \lambda + \epsilon s \quad (9)$$

with s denoting the complex frequency.

Replacement of the differential terms with pure algebraic expressions considerably simplifies the analysis and thus allows for treatment of structured systems consisting of several materials, such as the system in Fig. 2. Pursuing this approach, the induced transmembrane voltage is given by [14]

$$U_m(s, \theta) = F(s)E_e(s)R \cos \theta \quad (10a)$$

where $E_e(s)$ is the Laplace (Heaviside) transform of the time course of the electric field strength $E_e(t)$, and $F(s)$ is given by (10b), shown at the bottom of the page, with Λ_i , Λ_m , and Λ_e denoting the admittivity operators of the cytoplasm, cell membrane, and extracellular medium, respectively.

Amplification of the external field in the membrane at $\theta = 0$ is then

$$G_E(s) = \frac{E_m(s)}{E_e(s)} = \frac{R}{d} F(s). \quad (11)$$

The basic principle of the method can be illustrated by a block diagram shown in Fig. 3. The external electric field represents the “input” or the “excitation” of the system, $G_E(s)$ plays the role of a transfer function, while the induced transmembrane voltage and membrane field are the “outputs” or the

$$F(s) = \frac{3\Lambda_e[3dR^2\Lambda_i + (3d^2R - d^3)(\Lambda_m - \Lambda_i)]}{2R^3(\Lambda_m + 2\Lambda_e)(\Lambda_m + \frac{1}{2}\Lambda_i) - 2(R-d)^3(\Lambda_e - \Lambda_m)(\Lambda_i - \Lambda_m)} \quad (10b)$$

“responses.” For any given time course of the external electric field, this method gives the time course of the TMV, as well as of the membrane field.

While the use of this approach in the analysis of transients is described elsewhere [14], this paper focuses on the analysis of membrane fields induced by ac (sinusoidal) fields at different frequencies. With a sinusoidal time course of the external field with frequency $f = \omega/2\pi$, the complex frequency becomes purely imaginary, and the admittivity operators Λ are replaced by the *admittivities*,

$$\lambda^* = \lambda + j\omega\varepsilon \quad (12)$$

whereby $G_E(s)$ is transformed into $G_E(\omega)$.

III. RESULTS

By inserting (10b) into (11) and replacing Λ_i , Λ_m , and Λ_e by λ_i^* , λ_m^* , and λ_e^* , respectively, one gets (13), shown at the bottom of the page. The limiting values of $G_E(\omega)$ at $\omega \rightarrow 0$ and $\omega \rightarrow \infty$ are derived in the Appendix, and under physiological conditions they can be approximated by

$$|G_E(0)| \approx \frac{3R}{2d}, \quad \angle G_E(0) = 0^\circ \quad (14)$$

$$|G_E(\infty)| \approx \frac{3\varepsilon_i\varepsilon_e}{\varepsilon_m(\varepsilon_i + 2\varepsilon_e)}, \quad \angle G_E(\infty) = 0^\circ. \quad (15)$$

With typical parameter values (see Table I), one gets $|G_E(0)| \approx 3000$ and $|G_E(\infty)| \approx 15$. Thus, the membrane field strength induced at very high frequencies still exceeds the external field strength by more than one order of magnitude.

A stable amplification at high frequencies is not anticipated by the first-order model, as (7) testifies. Also, the first-order model predicts the phase lag to asymptotically approach -90° , while according to (15), $E(t)$ and $E_m(t)$ are again close to synchronization at very high frequencies. Absence of the high-frequency plateau in the classical treatment originates from the assumption of purely conductive cytoplasm and extracellular medium; namely, if ε_i and ε_e are set to zero, the amplification given by (15) is easily shown to become zero—the value predicted by (7).

Using the same numerical values as in Fig. 1, Bode plot of $G_E(\omega)$ given by (13) is depicted in Fig. 4 by a solid line, while the one predicted by (5) is drawn in dashed line. The two models agree at low frequencies, but while (5) prognosticates a continuing decrease of magnitude and phase stabilized at -90° , (13) exhibits a second breakpoint frequency, where the magnitude stabilizes at the *high-frequency plateau*. Also

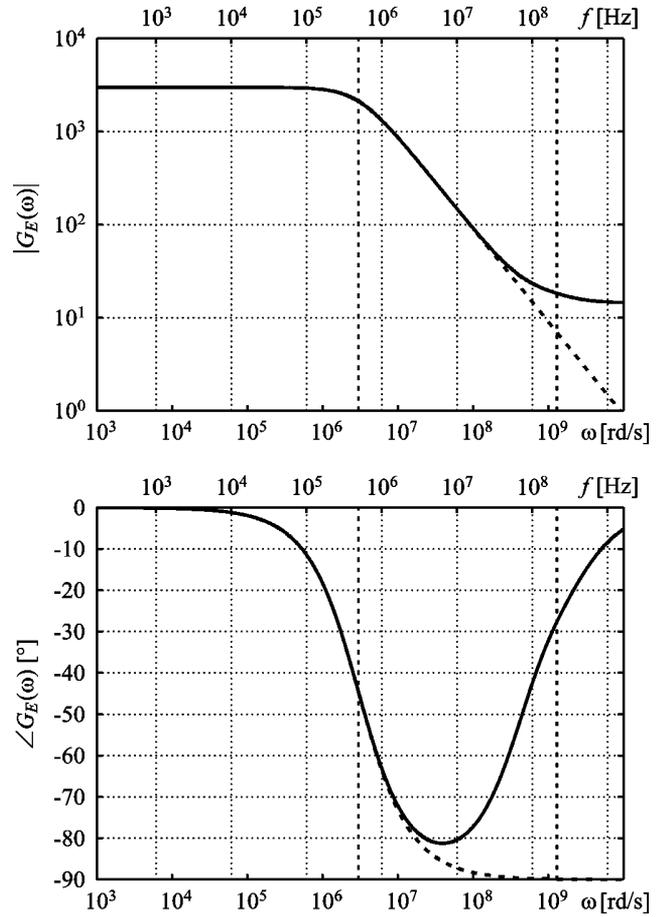


Fig. 4. Bode plot of the amplification of an external ac electric field in the membrane according to the second-order treatment given by (13) (solid line), and the predictions of the first-order model (dashed). The two bold dotted verticals correspond to the first (left) and the second (right) breakpoint frequency: $f_1 = 1/(2\pi\tau_{m1})$ and $f_2 = 1/(2\pi\tau_{m2})$. Parameter values used in the calculation are given in Table I.

due to the second breakpoint frequency, the phase does not approach -90° , but reaches a peak level, and then gradually falls back toward zero.

Though (13) allows for analytical derivation of the limiting values, as well as numerical calculation of the whole frequency dependence of G_E , it does not in itself clearly reveal the behavior of $G_E(\omega)$ demonstrated in Fig. 4. Though both the numerator and the denominator of (13) are of second order, making membrane field inducement a *second-order process*, Fig. 4 clearly implies that this process can be approximated as first-order. This is to say that both the numerator and denominator of (13) act approximately as if they were of first order (unlike this, the classical model given by (5) has a first-order denominator, but the numerator is frequency-independent, i.e.,

$$G_E(\omega) = \frac{3\lambda_e^*[3R^3\lambda_i^* + (3dR^2 - d^2R)(\lambda_m^* - \lambda_i^*)]}{2R^3(\lambda_m^* + 2\lambda_e^*)(\lambda_m^* + \frac{1}{2}\lambda_i^*) - 2(R-d)^3(\lambda_e^* - \lambda_m^*)(\lambda_i^* - \lambda_m^*)} \quad (13)$$

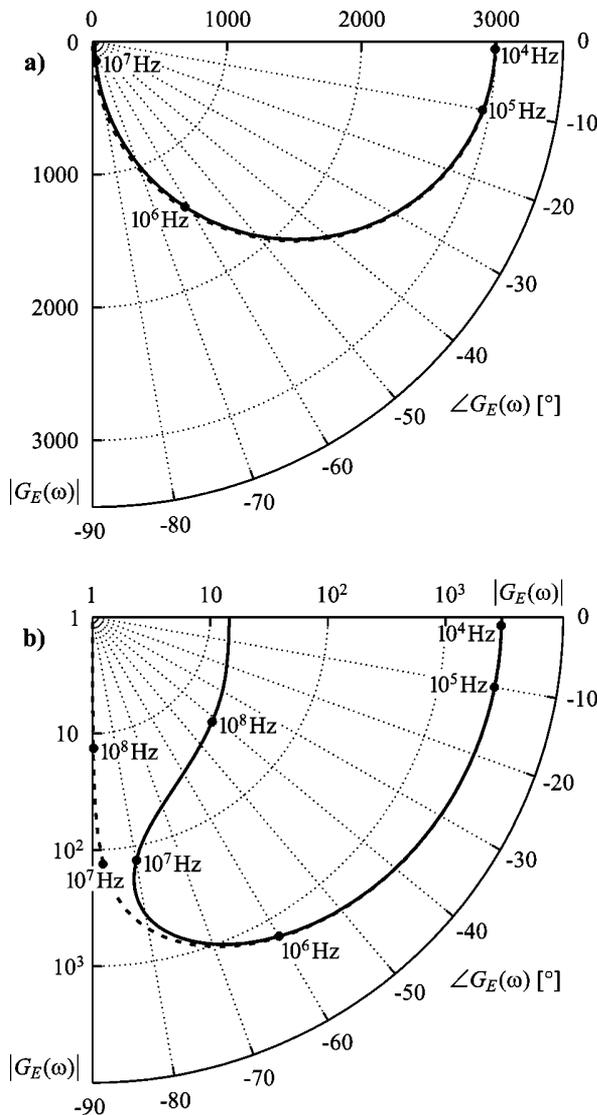


Fig. 5. Nyquist (Cole-Cole) plot of the amplification of an external electric field in the membrane according to the second-order (solid line) and the first-order model (dashed). (a) Linear magnitude scale. (b) Logarithmic magnitude scale. For used parameter values, see Table I and caption of Fig. 4.

of zeroth order). Sections A and B of the Appendix are dedicated to an in-depth analysis and elucidation of this behavior demonstrated by $G_E(\omega)$.

Another customary representation of the frequency dependence is a Nyquist (Cole-Cole) plot, which shows the trajectory of the amplification in the complex plane. Fig. 5 compares the Nyquist plots of $G_E(\omega)$ given by (13) and (5). When a linear magnitude scale is used, the distinctions are hardly visible, thus confirming a good agreement between the two equations [Fig. 5(a)]. With a logarithmic magnitude scale, the differences at higher frequencies are emphasized [Fig. 5(b)].

IV. DISCUSSION

Two principal aims of this section are 1) to discuss the limitations of the presented model and 2) to contemplate on possible

implications of the high-frequency plateau, which is overlooked by the classical first-order model.

A. Limitations of the Model

It has been shown that with intercellular distance several times larger than cell radius, the effect of neighboring cells on induced transmembrane voltage is negligible [16]. All the expressions presented in this paper are therefore valid for a single cell and also for dilute cell suspensions, but they fail to provide a reliable quantitative analysis for tissues, where cells are densely packed. Nevertheless, the qualitative predictions of the second-order model—the second plateau of the membrane field and its synchronization with the external field at high frequencies—also apply to tissues.

While (5) accurately describes membrane field amplification up to ca. 10 MHz, with (13) the upper frequency limit of validity is increased by at least an order of magnitude. As the frequency exceeds several hundreds of megahertz, the finite mobility of molecular dipoles starts to weaken the polarization processes. This shows as a decrease in the permittivities of the materials and a coupled increase in their conductivity, known as dielectric relaxation. For frequencies above 100 MHz, (12) must thus be reformulated to give an *effective admittivity*

$$\lambda^* = \lambda(\omega) + j\omega\varepsilon(\omega) \quad (16)$$

which has a more intricate dependence upon frequency than (12). By implementing effective admittivities into (13), the description of the field amplification is extended to the frequencies where the dielectric relaxation occurs.

For estimative calculations, dielectric properties of the extracellular medium can be well approximated by those of the physiological NaCl solution at 35°C, for which precise data on dielectric relaxation are available [17]. On the other hand, the established techniques are very difficult to implement on anisotropic materials, and data on relaxation of lipids remain very scarce. Results have been published on dielectric spectroscopy of colloidal suspensions of phospholipid vesicles [18], and more recently of multilamellar bilayers [19]. To our knowledge, no measurements have yet been reported directly on unilamellar lipid bilayers, or cell membranes. An alternative approach is offered by the measurements of lipid headgroup rotation obtained by P-NMR and ²H-NMR [20], [21]. In general, dielectric relaxation of water and aqueous ionic solutions becomes pronounced at GHz frequencies, while the relaxation of bilayer lipids occurs at hundreds of megahertz, thereby setting the upper limit for validity of the presented second-order treatment at approximately 100 MHz.

B. Effects of the High-Frequency Plateau

In the two paragraphs that follow, we shortly discuss possible effects of the high-frequency plateau on two well-known phenomena caused by the exposure to ac electric fields: 1) electric power dissipation, which occurs in every material and is greatly enhanced at high frequencies, and 2) electropermeabilization (electroporation), a field-induced increase of cell membrane permeability and conductivity. Both electric power dissipation and electropermeabilization lead to alterations in the

structure and properties of cellular molecules, thus affecting the cellular functions. The effects of both phenomena can be reversible, with exposed cells recovering from the damage, or irreversible (in general, at larger perturbations), leading to cell death. In the next paragraphs, we consider the relevance of each of the two phenomena at high frequencies.

1) *High-Frequency Power Dissipation*: Power dissipation P per unit volume of a material is given by [22]

$$P(\omega) = \lambda(\omega) \cdot |E|^2 \quad (17)$$

where E is the strength of the ac electric field with the angular frequency ω , and $\lambda(\omega)$ is the effective conductivity of the material at this angular frequency. Above the relaxation frequency, the effective conductivity of a given material increases significantly, which according to (17) leads to a proportional increase of power dissipation (the effect widely exploited in the microwave ovens). The dielectric relaxation of the lipid bilayer occurs in the 100-MHz range, while in the aqueous media it only becomes expressed above 1 GHz (hence, the use of 2.45 GHz in the microwave ovens). Due to the high-frequency plateau, the membrane field is stable in this frequency range, and this implies that between 100 MHz and 1 GHz, power dissipation in the membrane increases significantly. Due to the small membrane thickness, the elevated power dissipation probably cannot lead to significant temperature increase within the membrane, but it might result in nonthermal effects. The distributed power dissipation at high frequencies is explored in detail in [23].

2) *High-Frequency Electroporabilization*: According to the established theory, electro-permeabilization is a nonthermal phenomenon [24], [25]. It only occurs if the transmembrane voltage (and hence the membrane electric field) exceeds a certain threshold value, which according to different authors ranges between 0.250 V and 1 V [26]–[28]. For a cell with $R = 10 \mu\text{m}$, transmembrane voltage of 1 V is induced by an external field of $E \approx 670 \text{ V/cm}$, provided that the reciprocal of the pulse duration lies within the low-frequency plateau (which is true for the typical pulses used for electroporabilization, ranging from tens of microseconds to tens of milliseconds). Such a field is generated by applying approximately 67 V to a 1 mm poration cuvette, or by a voltage of 268 V with a 4-mm cuvette. As $G_E(\infty)$ is two orders of magnitude lower than $G_E(0)$, electroporabilization by nanosecond pulses would demand voltages hundred times larger, and is thus practically unachievable with current technology. Possibility of electroporabilization occurring accidentally due to the exposure to high-frequency sources such as cellular phones or radio-frequency emitting antennas can thus also be excluded beyond any reasonable doubt.

APPENDIX

A. Exact Formulations of $G_E(\omega)$

By expanding both the numerator and denominator of (13), a rational function is obtained

$$G_E(\omega) = \frac{a_1(j\omega)^2 + a_2j\omega + a_3}{b_1(j\omega)^2 + b_2j\omega + b_3} \quad (A1)$$

where

$$a_1 = 3\varepsilon_i\varepsilon_e(3R^3 - 3dR^2 + d^2R) + 3\varepsilon_m\varepsilon_e(3dR^2 - d^2R), \quad (A2a)$$

$$a_2 = 3(\lambda_i\varepsilon_e + \lambda_e\varepsilon_i)(3R^3 - 3dR^2 + d^2R) + 3(\lambda_m\varepsilon_e + \lambda_e\varepsilon_m)(3dR^2 - d^2R) \quad (A2b)$$

$$a_3 = 3\lambda_i\lambda_e(3R^3 - 3dR^2 + d^2R) + 3\lambda_m\lambda_e(3dR^2 - d^2R) \quad (A2c)$$

$$b_1 = 2R^3(\varepsilon_m + 2\varepsilon_e) \left(\varepsilon_m + \frac{1}{2}\varepsilon_i \right) + 2(R - d)^3(\varepsilon_m - \varepsilon_e)(\varepsilon_i - \varepsilon_m) \quad (A2d)$$

$$b_2 = 2R^3 \left(\lambda_i \left(\frac{1}{2}\varepsilon_m + \varepsilon_e \right) + \lambda_m \left(\frac{1}{2}\varepsilon_i + 2\varepsilon_m + 2\varepsilon_e \right) + \lambda_e(\varepsilon_i + 2\varepsilon_m) \right) + 2(R - d)^3(\lambda_i(\varepsilon_m - \varepsilon_e) + \lambda_m(\varepsilon_i - 2\varepsilon_m + \varepsilon_e) - \lambda_e(\varepsilon_i - \varepsilon_m)) \quad (A2e)$$

and

$$b_3 = 2R^3(\lambda_m + 2\lambda_e) \left(\lambda_m + \frac{1}{2}\lambda_i \right) + 2(R - d)^3(\lambda_m - \lambda_e)(\lambda_i - \lambda_m). \quad (A2f)$$

Both the polynomial in the numerator and the polynomial in the denominator of (A1) are of second order, giving the process of membrane field induction the second-order nature.

Equation (A1) can be rewritten as

$$G_E(\omega) = K \frac{(1 + j\omega\tau_{m3})(1 + j\omega\tau_{m4})}{(1 + j\omega\tau_{m1})(1 + j\omega\tau_{m2})} \quad (A3)$$

where the constants are given by

$$K = \frac{a_3}{b_3} \quad (A4a)$$

$$\tau_{m1} = \frac{b_2 + \sqrt{b_2^2 - 4b_1b_3}}{2b_3} \quad (A4b)$$

$$\tau_{m2} = \frac{b_2 - \sqrt{b_2^2 - 4b_1b_3}}{2b_3} \quad (A4c)$$

$$\tau_{m3} = \frac{a_2 + \sqrt{a_2^2 - 4a_1a_3}}{2a_3} \quad (A4d)$$

$$\tau_{m4} = \frac{a_2 - \sqrt{a_2^2 - 4a_1a_3}}{2a_3}. \quad (A4e)$$

Alternatively, (A1) can also be reformulated as a sum of partial fractions

$$G_E(\omega) = K_0 + \frac{K_1}{1 + j\omega\tau_{m1}} + \frac{K_2}{1 + j\omega\tau_{m2}} \quad (A5)$$

where

$$K_0 = \frac{a_1}{b_1} \quad (A6a)$$

$$K_1 = \frac{3}{\sqrt{b_2^2 - 4b_1b_3}} \left[\frac{a_3b_1 - a_1b_3}{b_2 - \sqrt{b_2^2 - 4b_1b_3}} - \frac{a_2b_1 - a_1b_2}{2b_1} \right] \quad (A6b)$$

$$K_2 = \frac{3}{\sqrt{b_2^2 - 4b_1b_3}} \left[\frac{a_2b_1 - a_1b_2}{2b_1} - \frac{a_3b_1 - a_1b_3}{b_2 + \sqrt{b_2^2 - 4b_1b_3}} \right] \quad (A6c)$$

and τ_{m1} and τ_{m2} are given by (A4b) and (A4c), respectively.

The first summand in (A5) represents the synchronous (in-phase) part of the response, while the other two are lagging responses, each characterized by a time constant.

B. Simplifications

To elucidate the properties of $G_E(\omega)$ shown in Fig. 4, one has to consider the realistic physiological conditions, where two relations build a basis for simplifications:

- membrane conductivity, λ_m , is more than five orders of magnitude smaller than the conductivities of the cytoplasm, λ_i , and the extracellular medium, λ_e (see Table I); therefore, by disregarding λ_m where it appears in sum with λ_e or λ_i , the obtained result differs from the exact value by several parts in a million.
- membrane thickness, d , is at least three orders of magnitude smaller than cell radius, R ; by approximating $(R - d) \approx R$, one commits an error in the range of at most several parts in a thousand.

It should be stressed that with terms that include both conductive and dimensional parameters, the first of the above mentioned relations has to be considered before the second one, as the error committed by the first approximation is far smaller than the one introduced by the second. Furthermore, disregarding of the membrane conductivity often leads to cancellation of additional terms, including the ones that contain parameters R and d , as becomes apparent in the calculation of $G_E(0)$ and $G_E(\infty)$ presented later.

Applying the rules set above to the terms (A2a)–(A2f), one gets

$$a_1 \approx 9R^3 \varepsilon_i \varepsilon_e \quad (\text{A7a})$$

$$a_2 \approx 9R^3 (\lambda_i \varepsilon_e + \lambda_e \varepsilon_i) \quad (\text{A7b})$$

$$a_3 \approx 9R^3 \lambda_i \lambda_e \quad (\text{A7c})$$

$$b_1 \approx 3R^3 \varepsilon_m (\varepsilon_i + 2\varepsilon_e) + 6R^2 d \varepsilon_i \varepsilon_e \quad (\text{A7d})$$

$$b_2 \approx 3R^3 \varepsilon_m (\lambda_i + 2\lambda_e) + 6R^2 d (\lambda_i \varepsilon_e + \lambda_e \varepsilon_i) \quad (\text{A7e})$$

and

$$b_3 \approx 3R^3 \lambda_m (\lambda_i + 2\lambda_e) + 6R^2 d \lambda_i \lambda_e. \quad (\text{A7f})$$

As these expressions are inserted into (A4a)–(A4e), the resulting constants read

$$K \approx \frac{3R}{2d} \quad (\text{A8a})$$

$$\tau_{m1} \approx \frac{\varepsilon_m}{\frac{d}{R} \frac{2\lambda_i \lambda_e}{\lambda_i + 2\lambda_e} + \lambda_m} \quad (\text{A8b})$$

and

$$\tau_{m2} \approx \tau_{m3} \approx \tau_{m4} \approx \frac{\varepsilon_i + 2\varepsilon_e}{\lambda_i + 2\lambda_e}. \quad (\text{A8c})$$

This sheds some light on the behavior of $G_E(\omega)$ shown in Fig. 4. As the three time constants τ_{m2} , τ_{m3} , and τ_{m4} are very close together (with realistic parameter values, the difference between them never exceeds one part in a thousand), they can be approximated as equal. This cancels out two of the multiplicands in (A3), leading to the first-order expression

$$G_E(\omega) \approx \frac{3R}{2d} \left[\frac{1 + j\omega\tau_{m2}}{1 + j\omega\tau_{m1}} \right] \quad (\text{A9})$$

with time constants given by (A8b) and (A8c). Expression (A8b) equals the first-order time constant given by (1), i.e., $\tau_{m1} = \tau_m$, thus confirming once again the validity of the established predictions of low-frequency behavior. The reciprocals of the two time constants of (A9), $(\tau_{m1})^{-1}$ and $(\tau_{m2})^{-1}$, correspond to the two breakpoint frequencies in the Bode plot in Fig. 4.

Equations (A7a)–(A7f) also allow (A6a)–(A6c) to be approximated as

$$K_0 \approx \frac{3\varepsilon_e \varepsilon_i}{\varepsilon_m (\varepsilon_i + 2\varepsilon_e)} \quad (\text{A10a})$$

$$K_1 \approx \frac{3R}{2d} - \frac{3\varepsilon_i \varepsilon_e}{\varepsilon_m (\varepsilon_i + 2\varepsilon_e)} \quad (\text{A10b})$$

and

$$K_2 \approx 0. \quad (\text{A10c})$$

Equation (A10c) reflects the fact that with physiological parameter values, K_2 is more than nine orders of magnitude smaller than both K_0 and K_1 , making the second lagging response negligible in any practical context, and validating the approximation of membrane field inducement by

$$G_E(\omega) \approx K_0 + \frac{K_1}{1 + j\omega\tau_{m1}} \quad (\text{A11})$$

with K_0 and K_1 given by (A10a) and (A10b), respectively.

C. Limits $G_E(0)$ and $G_E(\infty)$

The low-frequency limit of $G_E(\omega)$ is obtained by inserting $\omega = 0$ into (13). This leads to (A12), shown at the bottom of the page. Since $\lambda_m \ll \lambda_i, \lambda_e$, we approximate $\lambda_m = 0$. We then obtain an expression which depends only on the geometric parameters of the cell

$$|G_E(0)| \approx \frac{3R}{2d}. \quad (\text{A13})$$

In a similar manner, the limit at $\omega \rightarrow \infty$ reads as (A14), shown at the top of the next page. Since no conductivities appear in this expression, simplification is based on the relation $d \ll R$, which we approximate with $d = 0$. This leads to an expression which depends only on the material parameters of the cell

$$|G(\infty)| \approx \frac{3\varepsilon_e \varepsilon_i}{\varepsilon_m (\varepsilon_i + 2\varepsilon_e)} \quad (\text{A15})$$

$$|G_E(0)| = \frac{3\lambda_e [3R^3 \lambda_i + (3dR^2 - d^2R)(\lambda_m - \lambda_i)]}{2R^3 (\lambda_m + 2\lambda_e) (\lambda_m + \frac{1}{2}\lambda_i) - 1(R - d)^3 (\lambda_e - \lambda_m)(\lambda_i - \lambda_m)}, \quad \angle G_E(0) = 0^\circ \quad (\text{A12})$$

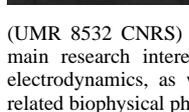
$$|G(\infty)| = \frac{3\varepsilon_e[3R^3\varepsilon_i + (3dR^3 - d^2R)(\varepsilon_m - \varepsilon_i)]}{2R^3(\varepsilon_m + 2\varepsilon_e)(\varepsilon_m + \frac{1}{2}\varepsilon_i) - 2(R-d)^3(\varepsilon_e - \varepsilon_m)(\varepsilon_i - \varepsilon_m)}, \quad \angle G_E(\infty) = 0^\circ \quad (\text{A14})$$

REFERENCES

- [1] E. Neumann, M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, and P. H. Hofschneider, "Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields," *EMBO J.*, vol. 1, pp. 841–845, 1982.
- [2] L. M. Mir, S. Orlowski, J. Belehradek Jr., J. Teissié, M. P. Rols, G. Serša, D. Miklavčič, R. Gilbert, and R. Heller, "Biomedical applications of electric pulses with special emphasis on antitumor electrochemotherapy," *Bioelectrochem. Bioenerg.*, vol. 38, pp. 203–207, 1995.
- [3] G. Serša, M. Čemažar, and D. Miklavčič, "Antitumor effectiveness of electrochemotherapy with cis-diamminedichloroplatinum(II) in mice," *Cancer Res.*, vol. 55, pp. 3450–3455, 1995.
- [4] Y. Mounéimne, P. F. Tosi, R. Barhoumi, and C. Nicolau, "Electroinsertion of full length recombinant CD4 into red blood cell membrane," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1027, pp. 53–58, 1990.
- [5] S. Raffy and J. Teissié, "Insertion of glycoporphin A, a transmembrane protein, in lipid bilayers can be mediated by electroporation," *Eur. J. Biochem.*, vol. 230, pp. 722–732, 1995.
- [6] U. Zimmermann, "Electric field mediated fusion and related electrical phenomena," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 694, pp. 227–277, 1982.
- [7] A. E. Sowers, *Cell Fusion*. New York: Plenum, 1987.
- [8] K. R. Foster and H. P. Schwan, "Dielectric properties of tissues and biological materials: A critical review," *Crit. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 17, pp. 25–104, 1989.
- [9] G. Führ, R. Glaser, and R. Hagedorn, "Rotation of dielectrics in a rotating electric high-frequency field: Model experiments and theoretical explanation of the rotation effect of living cells," *Biophys. J.*, vol. 49, pp. 395–402, 1985.
- [10] H. A. Pohl, *Dielectrophoresis*, London, U.K.: Cambridge Univ. Press, 1978.
- [11] H. P. Schwan, "Electrical properties in tissue and cell suspensions," *Adv. Biol. Med. Phys.*, vol. 5, pp. 147–209, 1957.
- [12] H. Pauly and H. P. Schwan, "Über die Impedanz einer Suspension von kugelförmigen Teilchen mit einer Schale," *Z. Naturforsch.*, vol. 14B, pp. 125–131, 1959.
- [13] C. Grosse and H. P. Schwan, "Cellular membrane potentials induced by alternating fields," *Biophys. J.*, vol. 63, pp. 1632–1642, 1992.
- [14] T. Kotnik, D. Miklavčič, and T. Slivnik, "Time course of transmembrane voltage induced by time-varying electric fields—A method for theoretical analysis and its application," *Bioelectrochem. Bioenerg.*, vol. 45, pp. 3–16, 1998.
- [15] T. Kotnik, F. Bobanović, and D. Miklavčič, "Sensitivity of transmembrane voltage induced by applied electric fields—A theoretical analysis," *Bioelectrochem. Bioenerg.*, vol. 43, pp. 285–291, 1997.
- [16] R. Susil, D. Šemrov, and D. Miklavčič, "Electric field-induced transmembrane potential depends on cell density and organization," *Electro. Magnetobiol.*, vol. 17, pp. 391–399, 1998.
- [17] R. Büchner, G. T. Hefter, and P. M. May, "Dielectric relaxation of aqueous NaCl solutions," *J. Phys. Chem. A*, vol. 103, pp. 1–9, 1999.
- [18] R. Pottel, K. D. Göpel, R. Henze, U. Kaatze, and V. Uhlendorf, "The dielectric permittivity spectrum of aqueous colloidal phospholipid solutions between 1 kHz and 60 GHz," *Biophys. Chem.*, vol. 19, pp. 233–244, 1984.
- [19] B. Klösigen, C. Reichle, S. Kohlsmann, and K. D. Kramer, "Dielectric spectroscopy as a sensor of membrane headgroup mobility and hydration," *Biophys. J.*, vol. 71, pp. 3251–3260, 1996.
- [20] E. J. Dufourc, C. Mayer, J. Stohrer, G. Althoff, and G. Kothe, "Dynamics of phosphate head groups in biomembranes," *Biophys. J.*, vol. 61, pp. 42–57, 1992.
- [21] A. S. Ulrich and A. Watts, "Molecular response of the lipid headgroup to bilayer hydration monitored by 2H-NMR," *Biophys. J.*, vol. 66, pp. 1441–1449, 1994.
- [22] C. Gabriel, S. Gabriel, E. H. Grant, B. S. J. Halstead, and D. M. P. Mingos, "Dielectric parameters relevant to microwave dielectric heating," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 27, pp. 213–223, 1998.
- [23] T. Kotnik and D. Miklavčič, "Theoretical evaluation of the distributed power dissipation in biological cells exposed to electric fields," *Bioelectromagnetics*, vol. 21, pp. 385–394, 2000.
- [24] T. Y. Tsong, "Electroporation of cell membranes," *Biophys. J.*, vol. 60, pp. 297–306, 1991.
- [25] J. C. Weaver and Y. A. Chizmadzhev, "Theory of electroporation: A review," *Bioelectrochem. Bioenerg.*, vol. 41, pp. 135–160, 1996.
- [26] R. Benz, F. Beckers, and U. Zimmermann, "Reversible electrical breakdown of lipid bilayer membranes: A charge-pulse relaxation study," *J. Membr. Biol.*, vol. 48, pp. 181–204, 1979.
- [27] J. Teissié and M. P. Rols, "An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electroporation," *Biophys. J.*, vol. 65, pp. 409–413, 1993.
- [28] D. Miklavčič, K. Beravs, D. Šemrov, M. Čemažar, F. Demšar, and G. Serša, "The importance of electric field distribution for effective in vivo electroporation of tissues," *Biophys. J.*, vol. 74, pp. 2152–2158, 1998.
- [29] R. B. Gennis, *Biomembranes: Molecular Structure and Function*. New York: Springer, 1989.
- [30] C. M. Harris and D. B. Kell, "The radio-frequency dielectric properties of yeast cells measured with a rapid, automated, frequency-domain dielectric spectrometer," *Bioelectrochem. Bioenerg.*, vol. 11, pp. 15–28, 1983.
- [31] R. Hölzel and I. Lamprecht, "Dielectric properties of yeast cells as determined by electrorotation," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1104, pp. 195–200, 1992.
- [32] P. R. C. Gascoyne, R. Pethig, J. P. H. Burt, and F. F. Becker, "Membrane changes accompanying the induced differentiation of Friend murine erythroleukemia cells studied by dielectrophoresis," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1146, pp. 119–126, 1993.
- [33] F. W. Sunderman, "Measurement of serum total base," *Amer. J. Clin. Pathol.*, vol. 15, pp. 219–222, 1945.
- [34] K. Nörtemann, J. Hilland, and U. Kaatze, "Dielectric properties of aqueous NaCl solutions at microwave frequencies," *J. Phys. Chem. A*, vol. 101, pp. 6864–6869, 1997.



Tadej Kotnik was born in 1972 in Ljubljana, Slovenia. He received the B.S.El.Eng. and the M.S.El.Eng. degrees from the University of Ljubljana, in 1995 and 1998, respectively, and is now preparing his Ph.D. thesis at the University of Paris XI, Paris, France.



He is currently a Researcher at the Laboratory of Biocybernetics at the Faculty of Electrical Engineering of the University of Ljubljana, and part-time at the Laboratory of Physical Chemistry and Pharmacology of Biological Macromolecules (UMR 8532 CNRS) of the Institute Gustave-Roussy, Villejuif, France. His main research interests lie in the fields of membrane electrostatics and electrodynamic, as well as in both theoretical and experimental study of related biophysical phenomena, especially membrane electroporation.



Damijan Miklavčič was born in 1963 in Ljubljana, Slovenia. He received the B.S.El.Eng., the M.S.El.Eng., and the Ph.D. degrees from the University of Ljubljana, in 1987, 1991, and 1993, respectively.

He is currently an Associate Professor and the Head of the Laboratory of Biocybernetics at the Faculty of Electrical Engineering of the University of Ljubljana. His research areas of interest are biomedical engineering and study of the interaction of electromagnetic fields with biological systems. In the last years he has focused on engineering aspects of electroporation as the basis of drug delivery into cells in tumor models *in vitro* and *in vivo*. His research includes biological experimentation, numerical modeling, and hardware development for electrochemotherapy.

2.4 ARTICLE 4

Analytical description of transmembrane voltage induced by electric fields on spheroidal cells

[Description analytique du voltage transmembranaire induit par des champs électriques sur des cellules sphéroïdales]

Publié dans *Biophysical Journal* 79: 670-679, 2000

Sommaire: La description analytique du voltage transmembranaire induit sur des cellules sphériques a été déterminée dans les années 1950, et les outils pour l'évaluation numérique du voltage transmembranaire induit sur des cellules sphéroïdales ont été développés dans les années 1970. Par contre, certains chercheurs ont postulé qu'une description analytique était inaccessible pour des cellules sphéroïdales, et d'autres ont affirmé que même si elle existait, elle n'était pas réaliste à cause de l'épaisseur non uniforme de la membrane, qui est inévitable dans la géométrie sphéroïdale.

Dans cet article, nous prouvons que pour toutes les cellules sphéroïdales, l'épaisseur de la membrane n'a aucune importance pour le voltage transmembranaire induit si on considère que la membrane est non conductive, ce qui est une condition qui a également été appliquée dans la dérivation de l'équation de Schwan. Nous dérivons ensuite la description analytique du voltage transmembranaire induit sur des cellules sphéroïdales allongées et aplaties. Nous transformons cette description des coordonnées sphéroïdales aux coordonnées sphériques plus familières. Le résultat final, qui représente une généralisation de l'équation de Schwan à toutes les cellules sphéroïdales (entre lesquelles les cellules sphériques ne sont qu'un cas particulier), est donné par

$$\Delta\Phi = \begin{cases} E \frac{R_2^2 - R_1^2}{\frac{R_2^2}{\sqrt{R_2^2 - R_1^2}} \operatorname{arccot} \frac{R_1}{\sqrt{R_2^2 - R_1^2}} - R_1} \frac{R_2 \cos \varphi}{\sqrt{R_1^2 \sin^2 \varphi + R_2^2 \cos^2 \varphi}}; & R_1 < R_2 \\ \frac{3}{2} ER_1 \cos \varphi = \frac{3}{2} ER_2 \cos \varphi; & R_1 = R_2 \\ E \frac{R_1^2 - R_2^2}{R_1 - \frac{R_2^2}{\sqrt{R_1^2 - R_2^2}} \log \frac{R_1 + \sqrt{R_1^2 - R_2^2}}{R_2}} \frac{R_2 \cos \varphi}{\sqrt{R_1^2 \sin^2 \varphi + R_2^2 \cos^2 \varphi}}; & R_1 > R_2 \end{cases}$$

où E représente le champ électrique, R_1 le rayon de la cellule le long de l'axe de la symétrie rotative (le rayon polaire), R_2 le rayon perpendiculaire à ce axe (le rayon équatorial), et φ l'angle polaire mesuré à partir du centre de la cellule par rapport à la direction du champ.

Il est facile d'appliquer l'expression présentée ci-dessus, et dans l'article nous donnons un exemple simple d'une telle application. Cette expression fournit une description

analytique du voltage transmembranaire induit pour toutes les cellules dont la forme peut être rapprochée de celle d'un sphéroïde.

Nous concluons cette étude avec une analyse de la variation du voltage transmembranaire induit lorsqu'une cellule sphéroïdale est allongée par le champ, exécutant une étude à aire constante de la membrane, et une autre étude à volume constant de cellules.

Analytical Description of Transmembrane Voltage Induced by Electric Fields on Spheroidal Cells

Tadej Kotnik and Damijan Miklavčič

Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

ABSTRACT An analytical description of transmembrane voltage induced on spherical cells was determined in the 1950s, and the tools for numerical assessment of transmembrane voltage induced on spheroidal cells were developed in the 1970s. However, it has often been claimed that an analytical description is unattainable for spheroidal cells, while others have asserted that even if attainable, it does not befit the reality due to the nonuniform membrane thickness, which is unrealistic but inevitable in spheroidal geometry. In this paper we show that for all spheroidal cells, membrane thickness is irrelevant to the induced transmembrane voltage under the assumption of a nonconductive membrane, which was also applied in the derivation of Schwan's equation. We then derive the analytical description of transmembrane voltage induced on prolate and oblate spheroidal cells. The final result, which we cast from spheroidal into more familiar spherical coordinates, represents a generalization of Schwan's equation to all spheroidal cells (of which spherical cells are a special case). The obtained expression is easy to apply, and we give a simple example of such application. We conclude the study by analyzing the variation of induced transmembrane voltage as a spheroidal cell is stretched by the field, performing one study at a constant membrane surface area, and another at a constant cell volume.

INTRODUCTION

Placement of a biological cell into an electric field leads to a local distortion of the field in the cell and in its vicinity. As the conductivity of the cell membrane is several orders of magnitude lower than those of the cytoplasm and the physiological extracellular medium, most of the electric field within the cell is concentrated on the membrane. In a DC field, the induced transmembrane voltage reaches the steady state within microseconds after the start of the exposure. For the treatment of the transients, the reader is referred to Kotnik et al. (1998), while in this work we henceforth deal only with the steady-state situation.

Analytical description of steady-state transmembrane voltage induced on spherical cells was derived more than four decades ago by H. P. Schwan (Schwan, 1957). To simplify the derivation, Schwan assumed the membrane to be nonconductive, which led to the well-known relation, often referred to as the (steady-state) Schwan's equation

$$\Delta\Phi = \frac{3}{2}ER \cos \varphi, \quad (1)$$

where $\Delta\Phi$ is the induced transmembrane voltage, E is the external electric field, R is the cell radius, and φ is the polar angle measured from the center of the cell with respect to the direction of the field. With physiological values of the conductivities, $\Delta\Phi$ as given by Eq. 1 differs at most by several parts per thousand from the exact result given by

Kotnik et al. (1997):

$$\Delta\Phi = \frac{3}{2} \frac{\sigma_e [3dR^2\sigma_i + (3d^2R - d^3)(\sigma_m - \sigma_i)]}{\left[R^3(\sigma_m + 2\sigma_e)(\sigma_m + \frac{1}{2}\sigma_i) - (R - d)^3(\sigma_e - \sigma_m)(\sigma_i - \sigma_m) \right]} ER \cos \varphi \quad (2)$$

where σ_i , σ_m , and σ_e are electric conductivities of the cytoplasm, cell membrane, and external medium, respectively, and d is the membrane thickness (note that this equation applies only in the case of a membrane of constant thickness and conductivity). It is easy to check that setting $\sigma_m = 0$ leads to cancellation of d , σ_i , and σ_e from Eq. 2, which thereby simplifies into Eq. 1.

In the 1970s, this knowledge was extended by the development of methods for numerical calculation of transmembrane voltage induced on spheroidal cells (Klee and Plonsey, 1972, 1976). Despite that, an analytical description of the transmembrane voltage induced on spheroidal cells, if attainable, would give a deeper insight than numerical calculations can provide.

The search for an analytical solution in spheroidal geometry has often been claimed futile (Bernhardt and Pauly, 1973; Klee and Plonsey, 1976; Gimsa and Wachner, 1999): as we show in this paper, rather unfoundedly. This claim was motivated by the fact that for analytical determination of the induced transmembrane voltage, cell boundaries must coincide with coordinate surfaces of some coordinate system. In spheroidal coordinate systems, this necessarily renders a membrane of nonuniform thickness, which is unrealistic. Still, two recent papers treated an analytical solution for prolate spheroids. The first paper gave an expression for the electric potential inside and outside a prolate spheroid with a nonconductive membrane (Bryant and Wolfe, 1987), and the second paper generalized the result to the case of a

Received for publication 22 February 2000 and in final form 24 April 2000.

Address reprint requests to Tadej Kotnik, Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana, Trzaska 25, SI-1000 Ljubljana, Slovenia. Tel.: +38-614-768-768; Fax: +38-614-264-658; E-mail: tadej@svarun.fe.uni-lj.si

© 2000 by the Biophysical Society

0006-3495/00/08/670/10 \$2.00

conductive membrane (Jerry et al., 1996). Nevertheless, in both studies the results are formulated in prolate spheroidal coordinates, thus lacking the insight that is available in the more familiar spherical coordinates. To our knowledge, no similar work has been published on oblate spheroids, although these represent a suitable model for some types of cells, such as erythrocytes. In summary, an analog of Schwan's equation (1) for spheroidal cells has not yet been given.

In this work we first show that under the assumption of a nonconductive membrane, the induced transmembrane voltage is unaffected by membrane thickness as long as the cell is symmetrical with respect to a plane to which the field is perpendicular. Analytical calculation of the induced transmembrane voltage is therefore justified and valid, and in the Appendices we derive the transmembrane voltage induced on both prolate and oblate spheroidal cells. To allow for comparison with Schwan's equation, we present the results in spherical coordinates, where a spheroid is described by its two radii, and the location on the membrane is given—as for a sphere—by the polar angle measured from the center of the spheroid with respect to the direction of the field.

METHODS

Derivation of the steady-state induced transmembrane voltage

Let the presence of the cell distort a homogeneous electric field \mathbf{E}_0 into an electric field \mathbf{E} . To determine the steady-state induced transmembrane voltage, we express \mathbf{E} in terms of the electric potential Φ

$$\mathbf{E} = -\nabla\Phi, \quad (3)$$

where Φ satisfies Laplace's equation

$$\nabla^2\Phi = 0 \quad (4)$$

with the following conditions:

1. homogeneity of the field far from the cell,

$$\lim_{r \rightarrow \infty} (-\nabla\Phi) = \mathbf{E}_0; \quad (5a)$$

2. finiteness of the potential inside the cell,

$$\lim_{r \rightarrow 0} \Phi < \infty; \quad (5b)$$

3. continuity of the potential and the current density at the boundary surfaces between the cytoplasm and the membrane and between the membrane and the exterior,

$$\begin{aligned} (\Phi_i - \Phi_m)|_{\mathcal{S}_i} &= 0, \\ \mathbf{n} \cdot (\sigma_i \nabla \Phi_i - \sigma_m \nabla \Phi_m)|_{\mathcal{S}_i} &= 0, \\ (\Phi_m - \Phi_e)|_{\mathcal{S}_e} &= 0, \\ \mathbf{n} \cdot (\sigma_m \nabla \Phi_m - \sigma_e \nabla \Phi_e)|_{\mathcal{S}_e} &= 0, \end{aligned} \quad (5c)$$

where \mathcal{S}_i and \mathcal{S}_e are the inner and the outer membrane surface; Φ_i , Φ_m , and Φ_e denote the function Φ in the cell interior, the membrane, and the cell

exterior; σ_i , σ_m , and σ_e are the conductivities of these three regions; and \mathbf{n} is the unit normal vector to the treated boundary surface.

The transmembrane voltage $\Delta\Phi$ induced by the external electric field on the cell membrane is the difference between the values of electric potential at the two boundary surfaces,

$$\Delta\Phi = \Phi|_{\mathcal{S}_i} - \Phi|_{\mathcal{S}_e}. \quad (6)$$

We note that in Eq. 6 and hereafter in this paper, Δ always represents the difference operator and should not be confused with another established notation, $\Delta \equiv \nabla^2$ for the Laplacian operator.

Simplifications for a nonconductive membrane

Due to the shielding effect caused by the low conductivity of the membrane, most of the electric potential variation within the cell occurs in its membrane. In the hypothetical case of a nonconductive membrane, the shielding is complete; there is no electric field in the cytoplasm, and the electric potential variation within the cell occurs only in its membrane.

At this point we introduce the following principle of invariance, which is crucial for further derivations:

For an object with a nonconductive membrane which is placed into a homogeneous electric field,

- (i) the electric potential outside the object is determined only by the shape of the object;
- (ii) if the object is symmetrical with respect to a plane to which the external field is perpendicular, then also the induced transmembrane voltage is determined only by the shape of the object.

The proof of this principle is given in Appendix A, while Fig. 1 illustrates it by an example. In a given field, the potential outside A , B , C , and D is the same. For objects B , C , and D that are symmetrical with respect to a plane to which the field is perpendicular (*dotted vertical*), the electric potential in the interior, and thus the transmembrane voltage, is also the same (for D , which consists entirely of a nonconductive material, we define the transmembrane voltage as the difference between the values of the electric potential in its center and on its surface).

For a spherical cell, part (ii) of the principle of invariance stated above is clearly demonstrated by Eq. 1, which involves the cell radius, but not the membrane thickness. For spheroidal cells, validity of (ii) is similarly confirmed by Eq. 7, introduced in the next subsection.

For cells with planar symmetry and with a nonconductive membrane, the thickness of the membrane is therefore irrelevant to the induced transmembrane voltage, which can be determined by solving Laplace's equation for any object with planar symmetry and the same external shape. In Fig. 1, all objects have the same, prolate spheroidal external shape. With a uniform membrane thickness, object B is a realistic model of a cell, but its internal membrane surface is not a prolate spheroid, and Laplace's equation cannot be solved analytically. Unlike that, the two surfaces of C and the surface of D are all prolate spheroids, and for these two objects Laplace's equation is solvable in prolate spheroidal coordinates by separation of variables. By assigning the potential $\Phi = 0$ to the plane of symmetry, the transmembrane voltage induced on B then equals the opposite of the electric potential calculated at the external surface of either C or D .

In summary, for a cell with planar symmetry and a nonconductive membrane, the induced transmembrane voltage can be determined analytically given that 1) the cell shape can be modeled as a coordinate surface in some coordinate system, and 2) Laplace's equation is separable in this coordinate system. These two requirements are both necessary and sufficient, and 2) provides a restriction to 14 different coordinate systems (Eisenhart, 1934; Morse and Feshbach, 1953). The spherical, the prolate spheroidal, and the oblate spheroidal coordinate systems are among these, and we now proceed to the derivation and analysis of the transmembrane voltage induced on spheroidal cells.

RESULTS AND DISCUSSION

Transmembrane voltage induced on spheroidal cells

Because of its extent, the detailed derivation of the transmembrane voltage induced on a spherical, a prolate spheroidal, and an oblate spheroidal cell with the axis of rotational symmetry parallel to the field is given in Appendices B–D. Written in spherical coordinates, the final result reads

$$\Delta\Phi(\varphi) = \begin{cases} E \frac{R_2^2 - R_1^2}{R_2^2} \operatorname{arccot} \frac{R_1}{\sqrt{R_2^2 - R_1^2}} - R_1 & R_1 < R_2 \\ \times \frac{R_2 \cos \varphi}{\sqrt{R_1^2 \sin^2 \varphi + R_2^2 \cos^2 \varphi}}; \\ \frac{3}{2} ER_1 \cos \varphi = \frac{3}{2} ER_2 \cos \varphi; & R_1 = R_2 \\ E \frac{R_1^2 - R_2^2}{R_1 - \frac{R_2^2}{\sqrt{R_1^2 - R_2^2}} \log \frac{R_1 + \sqrt{R_1^2 - R_2^2}}{R_2}} & R_1 > R_2 \\ \times \frac{R_2 \cos \varphi}{\sqrt{R_1^2 \sin^2 \varphi + R_2^2 \cos^2 \varphi}}; \end{cases} \quad (7)$$

where E is the external electric field, R_1 is the radius along the axis of rotational symmetry (the polar radius), R_2 is the radius perpendicular to this axis (the equatorial radius), and φ is the polar angle measured from the center of the cell with respect to the direction of the field.

As an example of the application of Eq. 7, in Fig. 2 we plot the function $\Delta\Phi(\varphi)$ for three spheroids with different equatorial radii, but with the same polar radius.

Unlike with a sphere, the arc length on the membrane of a general spheroid is not proportional to the angle φ . The normalized arc length $p(\varphi)$ is defined as

$$p(\varphi) = \frac{\int_0^{\arctan(R_2/R_1 \tan \varphi)} \sqrt{R_1^2 \sin^2 \phi + R_2^2 \cos^2 \phi} d\phi}{\int_0^{2\pi} \sqrt{R_1^2 \sin^2 \phi + R_2^2 \cos^2 \phi} d\phi}. \quad (8)$$

This does not allow for an explicit expression of $\varphi(p)$ —and thus also of $\Delta\Phi(p)$ —but they can be calculated by means of numerical mapping of p onto φ . The graph shown in Fig. 3 is analogous to the one in Fig. 2, showing $\Delta\Phi(p)$ instead of $\Delta\Phi(\varphi)$.

Figs. 2 and 3 imply that the shape of a spheroid determines not only the maximum value of $\Delta\Phi$, but also the fraction of the membrane which is exposed to high values of $\Delta\Phi$. The induced transmembrane voltage close to the maximum value occupies only a small region of the membrane in very prolate, “cigar-shaped” cells, and the majority of the membrane in very oblate, “disk-shaped” cells.

A generalization of these examples is given in Fig. 4, which shows, for a given R_1 , the maximum value of $\Delta\Phi$ as a function of R_2 . With decrease of R_2 this function approaches an infimum of ER_1 , but it has no upper bound, and with increase of R_2 it can reach an arbitrarily large value. Still, $\max(\Delta\Phi)$ increases less than proportionally with R_2 , and for any $R_2 > 2.32R_1$, $\max(\Delta\Phi) < ER_2$.

Variation of the induced transmembrane voltage with electromechanical deformation

Besides their general applicability, the formulae of Eq. 7 enable an evaluation of the variation of the induced transmembrane voltage that accompanies the electromechanical deformation of the cell in the electric field. The polarization of the cell membrane produces an electric force that acts on the membrane, and as a result the cell is elongated in the direction of the field (Bryant and Wolfe, 1987). Spherical cells are deformed into prolate spheroids, and for most realistic situations we could start from a sphere and analyze the variation of the induced transmembrane voltage as the cell is elongated. However, a generalization of this study to include oblate spheroids provides several interesting results, and we will thus treat the whole range of spheroids, with a sphere representing a transitional point (obviously, this generalization does not in any way affect the results obtained for prolate spheroids). Two distinct conditions can be imposed to hold during the deformation:

1. a constant membrane surface area, S , where

$$S = \begin{cases} 2\pi R_2 \left(R_2 + \frac{R_1^2}{\sqrt{R_2^2 - R_1^2}} \operatorname{arcsinh} \frac{\sqrt{R_2^2 - R_1^2}}{R_1} \right); & R_1 < R_2 \\ 4\pi R_1 R_2; & R_1 = R_2 \\ 2\pi R_2 \left(R_2 + \frac{R_1^2}{\sqrt{R_1^2 - R_2^2}} \operatorname{arcsin} \frac{\sqrt{R_1^2 - R_2^2}}{R_1} \right); & R_1 > R_2 \end{cases} \quad (9)$$

2. or a constant cell volume, V , where

$$V = \frac{4}{3} \pi R_1 R_2^2. \quad (10)$$

The first requirement is valid for a noncompressible/nonexpansible membrane, and the second one for a nonpermeable membrane (the cytoplasm is largely an aqueous solution, and therefore noncompressible/nonexpansible). The two together cannot hold, since this would render the cell undeformable, while cell elongation in electric fields has been observed repeatedly (Winterhalter and Helfrich, 1988; Neumann and Kakorin, 1996). In reality, neither of the two restrictions holds completely, and since the experimental data are too scarce to either favor or reject any of them, each of them is a possible approximation to the realistic situation. For both, Fig. 5 shows the induced transmembrane voltage as a function of R_1/R_2 .

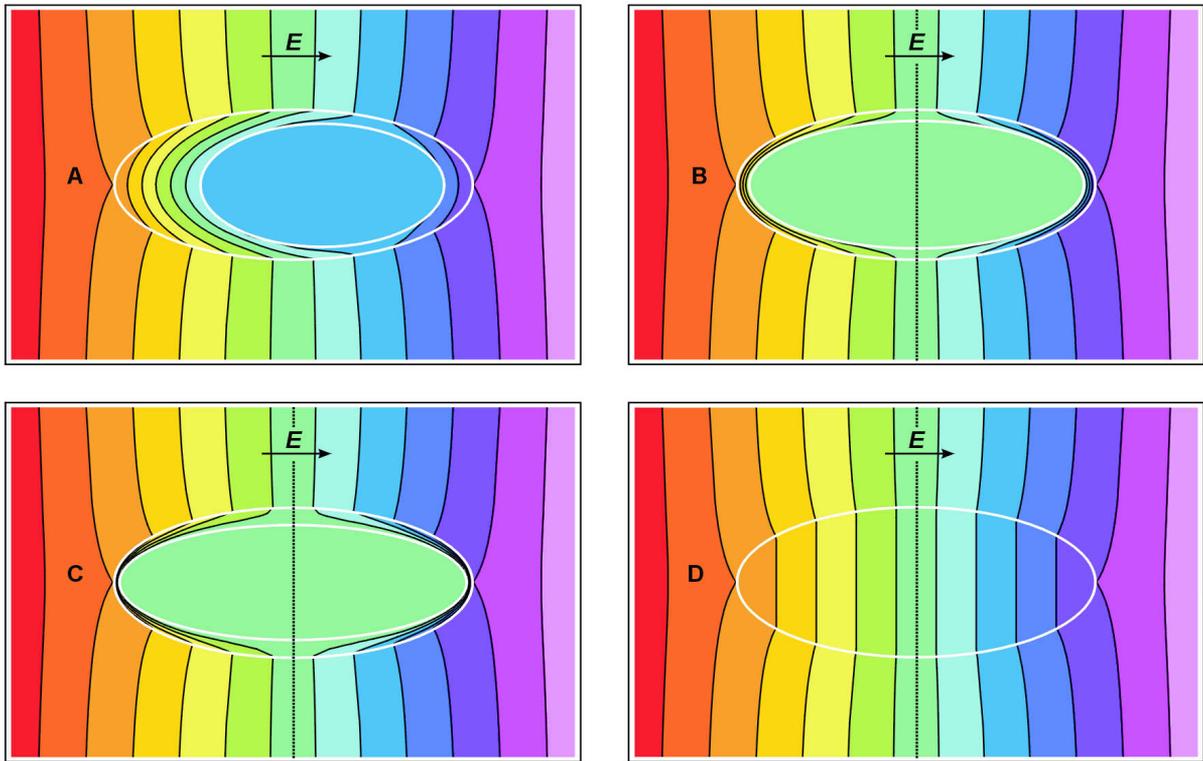


FIGURE 1 Color map of the electric potential outside and inside four objects with different nonconductive membranes, but with identical external shape (in D, the membrane fills the object entirely). The potential outside the object is the same for A, B, C, and D, while the induced transmembrane voltage is the same for B, C, and D.

Fig. 5 shows that the results under the two restrictions diverge increasingly with cell eccentricity. Nevertheless, deformations into highly eccentric shapes have never been

observed on biological cells, as this is preceded by the membrane rupture (Rand, 1964; Wolfe et al., 1986). Thus, with the exception of naturally highly eccentric cells (e.g.,

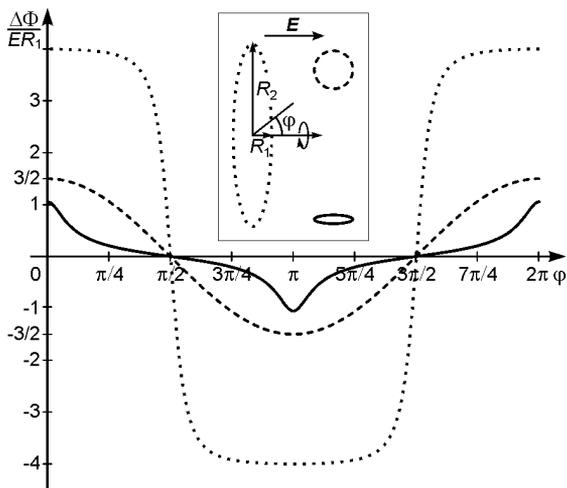


FIGURE 2 The induced transmembrane voltage ($\Delta\Phi$) in units of ER_1 as a function of the polar angle φ for three spheroidal cells with equal R_1 and $R_2 = 1/5 R_1$ (solid line), $R_2 = R_1$ (dashed line), and $R_2 = 5 R_1$ (dotted line). *Inset*: the three cells and the field orientation.

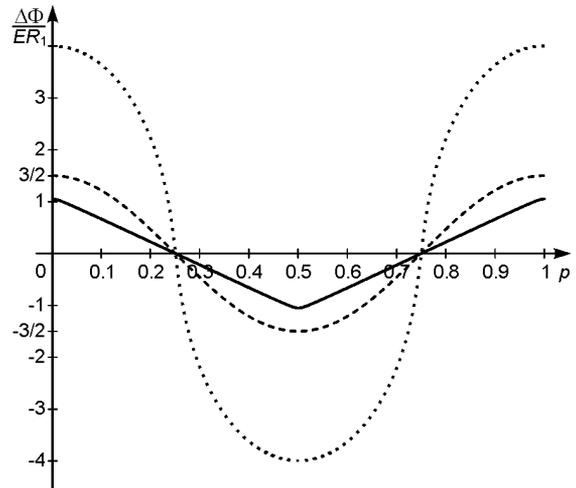


FIGURE 3 The induced transmembrane voltage ($\Delta\Phi$) in units of ER_1 as a function of the normalized arc length p for three spheroidal cells with equal R_1 and $R_2 = 1/5 R_1$ (solid line), $R_2 = R_1$ (dashed line), and $R_2 = 5 R_1$ (dotted line).

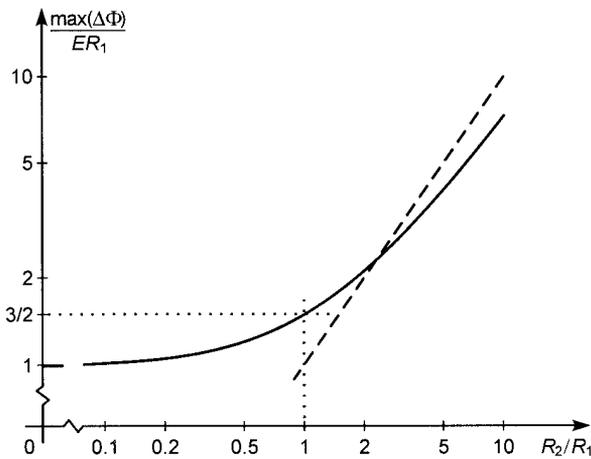


FIGURE 4 The maximum value of the induced transmembrane voltage in units of ER_1 as a function of the ratio R_2/R_1 at a constant R_1 (solid line). At $R_2/R_1 = 1$, the cell is a sphere, and the maximum value of the induced transmembrane voltage equals $3/2ER_1$, which is the well-known result also obtained from Schwan's equation. The dashed line shows the value of a hypothetical function $\max(\Delta\Phi) = ER_2$.

bacilli), realistic deformations are in the region where the two radii are of the same order of magnitude. We must also bear in mind that the electric force always tends to elongate the cell in the field direction, and thus for cells that are initially spherical, only the part of Fig. 5 with $R_1/R_2 > 1$ is of practical interest.

CONCLUSIONS

The main result presented in this paper is the analytical description of the transmembrane voltage induced on spheroidal cells, which is given by Eq. 7. Both Schwan's equation and Eq. 7 are derived under the assumption of a nonconductive membrane, and in conditions very far from physiological ones, their validity becomes questionable. In particular, they cannot be applied when cells are suspended in a medium with a conductivity several orders of magnitude below the physiological value, or when the membrane conductivity has been increased by several orders of magnitude, e.g., by electroporation (Grosse and Schwan, 1992; Kotnik et al., 1997). Nevertheless, with the parameter values close to physiological, a variation of membrane thickness by an order of magnitude results in a variation of the induced transmembrane voltage by at most several parts in a thousand, which can be easily checked by means of Eq. 2. Within the range of eccentricities analyzed in this paper, a realistic non-zero conductivity of the cell membrane would therefore have a negligible effect on the induced transmembrane voltage.

It should also be noted that since the presented theory (as well as Schwan's) treats the membrane as a passive conductor, and therefore has a very limited use in excitable cells, such as neurons and muscle fibers, in which the membrane conductivity is in general voltage-dependent. By itself, Eq. 7 gives a more precise evaluation of the transmembrane voltage induced on various nonspherical cells (erythrocytes, bacteria), but because suspended cells are randomly oriented, analytical results should be accompanied by numerical calculations for various angles between the cell's axis and the field. Nevertheless, the electric field was shown to align prolate cells with their longer axis parallel to the field, and to further elongate these cells, as well as spherical ones (Bryant and Wolfe, 1987; Winterhalter and Helfrich, 1988). Equation 7 is thus valid in the studies of electromechanical cell deformation. In a given field, it determines the electric force, which in equilibrium with the opposing elastic force also defines the shape of the electromechanically deformed cell. By accounting for membrane viscosity as well, one could in principle also evaluate the dynamics of deformation. In addition, since membrane electroporation depends on both the field strength and the membrane curvature (Neumann et al., 1999), a theoretical description of the dynamics of deformation could provide a deeper insight into the mechanisms that accompany (or even facilitate) electroporation.

It should also be noted that since the presented theory (as well as Schwan's) treats the membrane as a passive conductor, and therefore has a very limited use in excitable cells, such as neurons and muscle fibers, in which the membrane conductivity is in general voltage-dependent.

By itself, Eq. 7 gives a more precise evaluation of the transmembrane voltage induced on various nonspherical cells (erythrocytes, bacteria), but because suspended cells are randomly oriented, analytical results should be accompanied by numerical calculations for various angles between the cell's axis and the field. Nevertheless, the electric field was shown to align prolate cells with their longer axis parallel to the field, and to further elongate these cells, as well as spherical ones (Bryant and Wolfe, 1987; Winterhalter and Helfrich, 1988). Equation 7 is thus valid in the studies of electromechanical cell deformation. In a given field, it determines the electric force, which in equilibrium with the opposing elastic force also defines the shape of the electromechanically deformed cell. By accounting for membrane viscosity as well, one could in principle also evaluate the dynamics of deformation. In addition, since membrane electroporation depends on both the field strength and the membrane curvature (Neumann et al., 1999), a theoretical description of the dynamics of deformation could provide a deeper insight into the mechanisms that accompany (or even facilitate) electroporation.

APPENDIX A

Invariance of Φ and $\Delta\Phi$ for cells with a nonconductive membrane

We treat a general curvilinear coordinate system in \mathbb{R}^3 , with coordinates ξ_1, ξ_2, ξ_3 , in which Laplace's equation is separable. There are 14 such systems (Eisenhart, 1934; Morse and Feshbach, 1953), and in each of these, the physically realistic solution of Laplace's equation can be written in the form

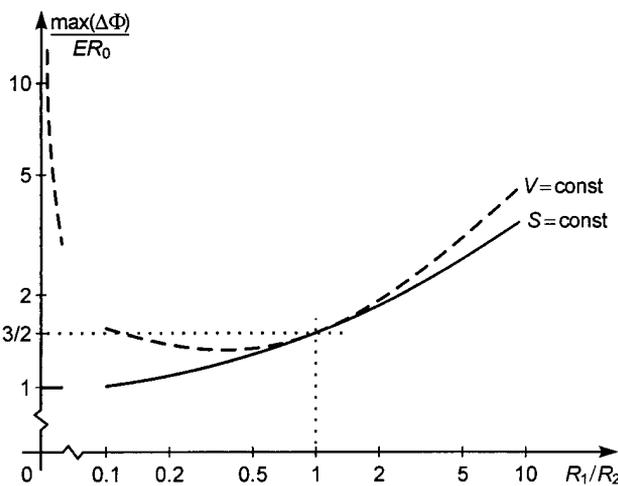


FIGURE 5 The maximum value of the induced transmembrane voltage as a function of the ratio R_1/R_2 with deformation at constant membrane surface area (solid line), and at constant cell volume (dashed line). Both R_1 and R_2 vary in this study, and we express $\max(\Delta\Phi)$ in units of ER_0 , where R_0 is the cell radius at $R_1/R_2 = 1$ (i.e., when the cell is spherical, $R_1 = R_2 = R_0$).

$$\Phi(\xi_1, \xi_2, \xi_3) = Af_1(\xi_1)f_2(\xi_2)f_3(\xi_3) + Bg_1(\xi_1)g_2(\xi_2)g_3(\xi_3), \quad (\text{A.1})$$

where A and B are the constants determined by the boundary conditions, while $f_1, f_2, f_3, g_1, g_2,$ and g_3 are continuous functions of their variables, bounded everywhere except perhaps at the origin and at infinity. In addition, if a limited number of objects distorts the homogeneity of the field, and the curvilinear coordinates are expressed in terms of spherical coordinates $r, \varphi,$ and ϑ (see Appendix B), then $f_1(\xi_1(r, \varphi, \vartheta))f_2(\xi_2(r, \varphi, \vartheta))f_3(\xi_3(r, \varphi, \vartheta))$ is a linear function of r .

Let a homogeneous static electric field E_0 permeate the space, and let a single cell, consisting of the cytoplasm and the membrane, be placed into this space. Then, the spatial distribution of the electric potential is given by

$$\Phi(\xi_1, \xi_2, \xi_3) = \begin{cases} \Phi_i(\xi_1, \xi_2, \xi_3) & \text{in the cytoplasm} \\ = A_i f_1(\xi_1) f_2(\xi_2) f_3(\xi_3); \\ \Phi_m(\xi_1, \xi_2, \xi_3) & \text{in the membrane} \\ = A_m f_1(\xi_1) f_2(\xi_2) f_3(\xi_3) + B_m g_1(\xi_1) g_2(\xi_2) g_3(\xi_3); \\ \Phi_e(\xi_1, \xi_2, \xi_3) & \text{outside the cell} \\ = -E_0 f_1(\xi_1) f_2(\xi_2) f_3(\xi_3) + B_e g_1(\xi_1) g_2(\xi_2) g_3(\xi_3); \end{cases} \quad (\text{A.2})$$

This solution satisfies the conditions of electric potential finiteness and electric field homogeneity far from the object, while the conditions of continuity have to be applied to determine the values of the remaining constants. The value of B_e is determined by the continuity of the current density at the external membrane surface (\mathcal{S}_e),

$$\mathbf{n} \cdot \sigma_m \nabla \Phi_m|_{\mathcal{S}_e} = \mathbf{n} \cdot \sigma_e \nabla \Phi_e|_{\mathcal{S}_e}, \quad (\text{A.3})$$

where \mathbf{n} is the unit normal vector to the surface \mathcal{S}_e , while σ_m and σ_e are the conductivities of the membrane and the external space.

We now assume $\sigma_m = 0$, and Eq. A.3 becomes

$$\mathbf{n} \cdot \nabla \Phi_e|_{\mathcal{S}_e} = 0, \quad (\text{A.4})$$

and inserting the expression for Φ_e from Eq. A.2 we obtain

$$B_e = E_0 \frac{\mathbf{n} \cdot \nabla (f_1(\xi_1) f_2(\xi_2) f_3(\xi_3))}{\mathbf{n} \cdot \nabla (g_1(\xi_1) g_2(\xi_2) g_3(\xi_3))} \Big|_{\mathcal{S}_e}. \quad (\text{A.5})$$

Thus, for a cell with a nonconductive membrane, the value of B_e —and thereby the whole function Φ_e as given by Eq. A.2—is determined solely by the value of E_0 and the shape of the surface \mathcal{S}_e .

If the cell is symmetrical with respect to a plane to which the external field far from the cell is perpendicular, the plane of symmetry is an equipotential surface. As Eq. 4 only determines the electric potential up to an additive constant, we assign to this surface—and thereby to the whole cytoplasm—the value of $\Phi = 0$. Eq. 6 then becomes

$$\Delta \Phi = -\Phi|_{\mathcal{S}_e}. \quad (\text{A.6})$$

Since Eq. A.5 shows that Φ everywhere at the surface \mathcal{S}_e depends only on the electric field and the shape of \mathcal{S}_e , Eq. A.6 proves that the induced transmembrane voltage is also determined only by the value of E_0 and the shape of the surface \mathcal{S}_e .

APPENDICES B–D

Calculation of $\Delta\Phi$ induced on a spheroidal cell

B. A spherical cell

With a sphere placed into a homogeneous electric field, we derive the spatial distribution of the electric potential in the spherical coordinate system $\{(r, \varphi, \vartheta) \in \mathbb{R}^3 : r \geq 0, 0 \leq \varphi \leq \pi, 0 \leq \vartheta < 2\pi\}$ with the coordinates defined by

$$x = r \cos \varphi, \quad y = r \sin \varphi \cos \vartheta, \quad z = r \sin \varphi \sin \vartheta. \quad (\text{B.1})$$

We note that there are several legitimate alternatives in defining the spherical coordinate system, and we choose the one given by Eq. B.1 as it is compatible with the standard notation of r and φ in the circular cylindrical coordinate system $\{(r, \varphi, z) \in \mathbb{R}^3 : r \geq 0, 0 \leq \varphi \leq 2\pi, -\infty < z < \infty\}$. Frequently, notation of φ and ϑ is reversed, or replaced by ϕ and θ , while the Cartesian system is often reoriented with respect to the definitions given above as $(x, y, z) \rightarrow (z, x, y)$.

For geometries with x -axial symmetry, the electric potential is independent of ϑ . We can then write $\Phi(r, \varphi)$ instead of $\Phi(r, \varphi, \vartheta)$, and Laplace's equation reads

$$\frac{\partial^2 \Phi}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial \Phi}{\partial r} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 \Phi}{\partial \varphi^2} + \frac{\cot \varphi}{r^2} \frac{\partial \Phi}{\partial \varphi} = 0. \quad (\text{B.2})$$

The first such case is the electric potential distribution in uniform space. This distribution, which we denote by Φ_0 , is linear, and for a field parallel to the x -axis it can be written in spherical coordinates as

$$\Phi_0(r, \varphi) = -Er \cos \varphi. \quad (\text{B.3})$$

We now place a sphere into this field so that its center coincides with the origin of the coordinate system. Again, we have x -axial symmetry, and by solving for Φ in a separable form

$$\Phi(r, \varphi) = G(r)H(\varphi), \quad (\text{B.4})$$

Eq. B.2 becomes

$$\frac{r^2 G''(r) + 2rG'(r)}{G(r)} = -\frac{H''(\varphi) + \cot \varphi H'(\varphi)}{H(\varphi)}. \quad (\text{B.5})$$

The left-hand side of Eq. B.5 is at any value of r equal to the right-hand side at any value of φ , which is only possible if they equal the same constant, which we denote by K . This splits Eq. B.5 into two ordinary differential equations

$$\begin{cases} r^2 G''(r) + 2rG'(r) - KG(r) = 0 \\ H''(\varphi) + \cot \varphi H'(\varphi) + KH(\varphi) = 0 \end{cases} \quad (\text{B.6})$$

For $r > 0$, the general solution of the first equation in B.6 is given by

$$G(r) = \begin{cases} C_1 r^{-1/2} \sin\left(\frac{\sqrt{-1-4K}}{2} \log r\right) \\ \quad + C_2 r^{-1/2} \cos\left(\frac{\sqrt{-1-4K}}{2} \log r\right); & K < -\frac{1}{4} \\ C_1 r^{-1} + C_2; & K = -\frac{1}{4} \\ C_1 r^{-1/2(1-\sqrt{1+4K})} + C_2 r^{-1/2(1+\sqrt{1+4K})}; & K > -\frac{1}{4} \end{cases} \quad (\text{B.7})$$

with C_1, C_2 constants.

Far from the sphere the field is homogeneous, and Eq. B.3 implies that $G(r) \propto r$. Such $G(r)$ is obtained from Eq. B.7 only if $K = 2$, and in that case

$$G(r) = C_1 r + \frac{C_2}{r^2}. \tag{B.8}$$

For $K = 2$, the equation for $H(\varphi)$ in Eq. B.6 has a solution

$$H(\varphi) = C_3 \cos \varphi + C_4 \left(1 - \cos \varphi \log \sqrt{\frac{1 + \cos \varphi}{1 - \cos \varphi}} \right). \tag{B.9}$$

with C_3, C_4 constants, of which C_4 must be zero, since $H(\varphi)$ is continuous and bounded on $[0, \pi]$, and therefore

$$H(\varphi) = C_3 \cos \varphi. \tag{B.10}$$

We now join the functions given by Eqs. B.8 and B.10 according to Eq. B.4 and get

$$\Phi(r, \varphi) = Ar \cos \varphi + \frac{B}{r^2} \cos \varphi \tag{B.11}$$

with A, B constants.

Since we treat the membrane as nonconductive, we proceed as described in the Methods section, looking for the electric potential distribution inside and outside a homogeneous nonconductive sphere. Let $r = R$ describe the surface of the sphere. Both inside and outside the sphere, the electric potential distribution is given by a function of the general form of Eq. B.11, but with different values of A and B . We therefore write

$$\Phi(r, \varphi) = \begin{cases} \Phi_i(r, \varphi) = A_i r \cos \varphi + \frac{B_i}{r^2} \cos \varphi; & 0 \leq r \leq R \\ \Phi_e(r, \varphi) = A_e r \cos \varphi + \frac{B_e}{r^2} \cos \varphi; & R \leq r \end{cases} \tag{B.12}$$

Applying the conditions of continuity and an additional assumption that $\sigma_m = 0$, we get the constants in Eq. B.12,

$$\begin{aligned} A_i &= -\frac{3E}{2}, \\ B_i &= 0, \\ A_e &= -E, \\ B_e &= -\frac{ER^3}{2}. \end{aligned} \tag{B.13}$$

With a nonconductive membrane surrounding a sphere, the induced transmembrane voltage is the opposite of the electric potential at the external surface of a homogeneous nonconductive sphere of equal size and orientation. Thus

$$\Delta\Phi(\varphi) = -\Phi(R, \varphi) = \frac{3}{2} ER \cos \varphi. \tag{B.14}$$

C. A prolate spheroidal cell

With a prolate spheroid placed into a homogeneous electric field with the polar radius parallel to the electric field vector, we derive the spatial

distribution of the electric potential in the prolate spheroidal coordinate system $\{(u, \nu, \vartheta) \in \mathbb{R}^3 : u \geq 0, 0 \leq \nu \leq \pi, 0 \leq \vartheta < 2\pi\}$ with the coordinates defined by

$$\begin{aligned} x &= a \cosh u \cos \nu, & y &= a \sinh u \sin \nu \cos \vartheta, \\ z &= a \sinh u \sin \nu \sin \vartheta, \end{aligned} \tag{C.1}$$

where $2a$ is the distance between the foci.

For geometries with x -axial symmetry, the electric potential is independent of ϑ . We can then write $\Phi(u, \nu)$ instead of $\Phi(u, \nu, \vartheta)$, and Laplace's equation reads

$$\frac{\partial^2 \Phi}{\partial u^2} + \coth u \frac{\partial \Phi}{\partial u} + \frac{\partial^2 \Phi}{\partial \nu^2} + \cot \nu \frac{\partial \Phi}{\partial \nu} = 0. \tag{C.2}$$

The first such case is the electric potential distribution in uniform space. This distribution, which we denote by Φ_0 , is linear, and for a field parallel to the x -axis it can be written in prolate spheroidal coordinates as

$$\Phi_0(u, \nu) = -Ea \cosh u \cos \nu. \tag{C.3}$$

While a sphere is described solely by its radius, two parameters are needed to characterize a prolate spheroid, and there are two equivalent ways to accomplish this. In the first one, we define the distance a between the foci and the value U that describes the surface of the prolate spheroid for the chosen a as $u = U$. An alternative approach is to define the polar radius R_1 and the equatorial radius R_2 of the prolate spheroid. While the first characterization is better suited to the coordinate system, the second is more intuitive, as it resembles the characterization of a sphere. The two are bijectively related:

$$R_1 = a \cosh U; \quad R_2 = a \sinh U; \tag{C.4}$$

$$a = \sqrt{R_1^2 - R_2^2}; \quad U = \operatorname{arctanh} \frac{R_2}{R_1} = \log \sqrt{\frac{R_1 + R_2}{R_1 - R_2}}. \tag{C.5}$$

We now place a prolate spheroid into the field so that its polar (i.e., larger) radius lies on the x -axis, and its center coincides with the origin of the coordinate system. Again, we have x -axial symmetry, and by solving for Φ in a separable form

$$\Phi(u, \nu) = G(u)H(\nu), \tag{C.6}$$

Eq. C.2 becomes

$$\frac{G''(u) + \coth u G'(u)}{G(u)} = -\frac{H''(\nu) + \cot \nu H'(\nu)}{H(\nu)}. \tag{C.7}$$

The left-hand side of Eq. C.7 is at any value of u equal to the right-hand side at any value of ν , which is only possible if they equal the same constant, which we denote by K . This splits Eq. C.7 into two ordinary differential equations

$$\begin{cases} G''(u) + \coth u G'(u) - KG(u) = 0 \\ H''(\nu) + \cot \nu H'(\nu) + KH(\nu) = 0 \end{cases} \tag{C.8}$$

Far from the spheroid, the field is homogeneous and thus it follows from Eq. C.3 that $G(u) \propto \cosh u$. Such $G(u)$ is obtained from Eq. C.8 only if $K = 2$, and in that case

$$G(u) = C_1 \cosh u + C_2 \left(1 - \cosh u \log \sqrt{\frac{\cosh u + 1}{\cosh u - 1}} \right). \tag{C.9}$$

$$H(\nu) = C_3 \cos \nu + C_4 \left(1 - \cos \nu \log \sqrt{\frac{1 + \cos \nu}{1 - \cos \nu}} \right). \quad (\text{C.10})$$

with C_1, C_2, C_3, C_4 constants, of which C_4 must be zero, since $H(\nu)$ is continuous and bounded on $[0, \pi]$, and therefore

$$H(\nu) = C_3 \cos \nu. \quad (\text{C.11})$$

We now join the functions given by Eqs. C.9 and C.11 according to Eq. C.6 and get

$$\begin{aligned} \Phi(u, \nu) &= A \cosh u \cos \nu \\ &+ B \left(1 - \cosh u \log \sqrt{\frac{\cosh u + 1}{\cosh u - 1}} \right) \cos \nu. \end{aligned} \quad (\text{C.12})$$

with A, B constants.

Since we treat the membrane as nonconductive, we proceed as described in the Methods section, looking for the electric potential distribution inside and outside a homogeneous nonconductive prolate spheroid. Let $u = U$ describe the surface of the prolate spheroid. Both inside and outside the spheroid, the electric potential distribution is given by a function of the general form of Eq. C.12, but with different values of A and B . We therefore write

$$\begin{aligned} \Phi(u, \nu) &= \begin{cases} \Phi_i(u, \nu) = A_i \cosh u \cos \nu \\ + B_i \left(1 - \cosh u \log \sqrt{\frac{\cosh u + 1}{\cosh u - 1}} \right) \cos \nu; & 0 \leq u \leq U \\ \Phi_e(u, \nu) = A_e \cosh u \cos \nu \\ + B_e \left(1 - \cosh u \log \sqrt{\frac{\cosh u + 1}{\cosh u - 1}} \right) \cos \nu; & U \leq u \end{cases} \\ &= \end{aligned} \quad (\text{C.13})$$

Applying the conditions of continuity and an additional assumption that $\sigma_m = 0$, we get the constants in Eq. C.13,

$$A_i = - \frac{Ea \operatorname{sech} U}{\cosh U - \log(\coth(U/2)) \sinh^2 U}, \quad (\text{C.14})$$

$$B_i = 0,$$

$$A_e = -Ea,$$

$$B_e = - \frac{Ea}{\log(\coth(U/2)) - \coth U \operatorname{csch} U}.$$

With a nonconductive membrane surrounding a prolate spheroid, the induced transmembrane voltage is the opposite of the electric potential at the external surface of a homogeneous nonconductive spheroid of equal shape and orientation. This gives

$$\begin{aligned} \Delta\Phi(\nu) &= -\Phi(U, \nu) \\ &= \frac{Ea}{\cosh U - \log(\coth(U/2)) \sinh^2 U} \cos \nu. \end{aligned} \quad (\text{C.15})$$

To compare Eq. C.15 to its analog for a sphere given by Eq. 1, we must express the remaining variable, the coordinate ν , as a function of φ . There

is a bijective relation between the prolate spheroidal coordinates used in this section and spherical coordinates $(r, \varphi, \vartheta) \in \mathbb{R}^3$ used in Appendix B:

$$u(r, \varphi) = \Re \left(\operatorname{arccosh} \frac{re^{i\varphi}}{a} \right); \quad (\text{C.16})$$

$$\nu(r, \varphi) = \Im \left(\operatorname{arccosh} \frac{re^{i\varphi}}{a} \right);$$

$$r(u, \nu) = a \sqrt{\frac{\cosh 2u + \cos 2\nu}{2}}; \quad (\text{C.17})$$

$$\varphi(u, \nu) = \arctan(\cosh u \cos \nu, \sinh u \sin \nu).$$

Let \mathcal{U} denote the surface of the prolate spheroid. There, r is related to φ as

$$r(\varphi)|_{\mathcal{U}} = \frac{R_1 R_2}{\sqrt{R_1^2 \sin^2 \varphi + R_2^2 \cos^2 \varphi}}, \quad (\text{C.18})$$

where R_1 is the polar, and R_2 the equatorial radius of the spheroid. Inserting this relation into Eq. C.16 and applying Eq. C.5, we can write the value of ν at the surface of \mathcal{U} as

$$\nu(\varphi)|_{\mathcal{U}} = \Im \left(\operatorname{arccosh} \frac{R_1 R_2 e^{i\varphi}}{\sqrt{(R_1^2 - R_2^2)(R_1^2 \sin^2 \varphi + R_2^2 \cos^2 \varphi)}} \right). \quad (\text{C.19})$$

After a trigonometric expansion of the complex term in Eq. C.19 and some calculation, we obtain

$$\nu(\varphi)|_{\mathcal{U}} = \arccos \frac{R_2 \cos \varphi}{\sqrt{R_1^2 \sin^2 \varphi + R_2^2 \cos^2 \varphi}}. \quad (\text{C.20})$$

It also follows from Eq. C.5 that

$$\begin{aligned} &\frac{a}{\cosh U - \log(\coth(U/2)) \sinh^2 U} \\ &= \frac{R_1^2 - R_2^2}{R_1 - \frac{R_2^2}{\sqrt{R_1^2 - R_2^2}} \log \frac{R_1 + \sqrt{R_1^2 - R_2^2}}{R_2}}. \end{aligned} \quad (\text{C.21})$$

Introducing Eqs. C.20 and C.21 into Eq. C.15, we can now formulate in spherical coordinates the transmembrane voltage induced on a prolate spheroid

$$\Delta\Phi(\varphi) = E \frac{R_1^2 - R_2^2}{R_1 - \frac{R_2^2}{\sqrt{R_1^2 - R_2^2}} \log \frac{R_1 + \sqrt{R_1^2 - R_2^2}}{R_2}} \frac{R_2 \cos \varphi}{\sqrt{R_1^2 \sin^2 \varphi + R_2^2 \cos^2 \varphi}}. \quad (\text{C.22})$$

D. An oblate spheroidal cell

With an oblate spheroid placed into a homogeneous electric field with the polar radius parallel to the electric field vector, we derive the spatial distribution of the electric potential in the oblate spheroidal coordinate system $\{(u, \nu, \vartheta) \in \mathbb{R}^3 : w \geq 0, 0 \leq \eta \leq \pi, 0 \leq \vartheta < 2\pi\}$ with the

coordinates defined by

$$\begin{aligned} x &= a \sinh w \cos \eta, \\ y &= a \cosh w \sin \eta \cos \vartheta, \\ z &= a \cosh w \sin \eta \sin \vartheta, \end{aligned} \tag{D.1}$$

where $2a$ is the distance between the foci.

For geometries with x -axial symmetry, the electric potential is independent of ϑ . We can then write $\Phi(w, \eta)$ instead of $\Phi(w, \eta, \vartheta)$, and the Laplace's equation reads

$$\frac{\partial^2 \Phi}{\partial w^2} + \tanh w \frac{\partial \Phi}{\partial w} + \frac{\partial^2 \Phi}{\partial \eta^2} + \cot \eta \frac{\partial \Phi}{\partial \eta} = 0. \tag{D.2}$$

The first such case is the electric potential distribution in uniform space. This distribution, which we denote by Φ_0 , is linear, and for a field parallel to the x -axis it can be written in oblate spheroidal coordinates as

$$\Phi_0(w, \eta) = -Ea \sinh w \cos \eta \tag{D.3}$$

As with a prolate spheroid, two parameters are needed to characterize an oblate spheroid, and this can be accomplished either by defining the distance a between the foci and the surface of the oblate spheroid (for the chosen a) as $w = W$, or by the polar radius R_1 and the equatorial radius R_2 of the oblate spheroid. The two characterizations are bijectively related:

$$R_1 = a \sinh W; \quad R_2 = a \cosh W; \tag{D.4}$$

$$a = \sqrt{R_2^2 - R_1^2}; \quad W = \operatorname{arctanh} \frac{R_1}{R_2} = \log \sqrt{\frac{R_1 + R_2}{R_2 - R_1}}. \tag{D.5}$$

We now place an oblate spheroid into the field so that its polar (i.e., smaller) radius lies on the x -axis, and its center coincides with the origin of the coordinate system. Again, we have x -axial symmetry, and by solving for Φ in a separable form

$$\Phi(w, \eta) = G(w)H(\eta), \tag{D.6}$$

Eq. D.2 becomes

$$\frac{G''(w) + \tanh w G'(w)}{G(w)} = - \frac{H''(\eta) + \cot \eta H'(\eta)}{H(\eta)}. \tag{D.7}$$

The left-hand side of Eq. D.7 is at any value of w equal to the right-hand side at any value of η , which is only possible if they equal the same constant, which we denote by K . This splits Eq. D.7 into two ordinary differential equations

$$\begin{cases} G''(w) + \tanh w G'(w) - KG(w) = 0 \\ H''(\eta) + \cot \eta H'(\eta) + KH(\eta) = 0 \end{cases} \tag{D.8}$$

Far from the spheroid, the field is homogeneous and thus it follows from D.3 that $G(w) \propto \sinh w$. Such $G(w)$ is obtained from Eq. D.8 only if $K = 2$, and in that case

$$G(w) = C_1 \sinh w + C_2(\sinh w \operatorname{arccot}(\sinh w) - 1). \tag{D.9}$$

$$H(\eta) = C_3 \cos \eta + C_4 \left(1 - \cos \eta \log \sqrt{\frac{1 + \cos \eta}{1 - \cos \eta}} \right). \tag{D.10}$$

with C_1, C_2, C_3, C_4 constants, of which C_4 must be zero, since $H(\eta)$ is continuous and bounded on $[0, \pi]$, and therefore

$$H(\eta) = C_3 \cos \eta. \tag{D.11}$$

We now join the functions given by Eqs. D.9 and D.11 according to Eq. D.6 and get

$$\begin{aligned} \Phi(w, \eta) &= A \sinh w \cos \eta \\ &+ B(\sinh w \operatorname{arccot}(\sinh w) - 1)\cos \eta. \end{aligned} \tag{D.12}$$

with A, B constants.

Since we treat the membrane as nonconductive, we proceed as described in the Methods section, looking for the electric potential distribution inside and outside a homogeneous nonconductive oblate spheroid. Let $w = W$ describe the surface of the oblate spheroid. Both inside and outside the spheroid, the electric potential distribution is given by a function of the general form (D.12), but with different values of A and B . We therefore write

$$\Phi(w, \eta) = \begin{cases} \Phi_i(w, \eta) = A_i \sinh w \cos \eta + B_i(\sinh w \operatorname{arccot}(\sinh w) - 1)\cos \eta; & 0 \leq w \leq W \\ \Phi_e(w, \eta) = A_e \sinh w \cos \eta + B_e(\sinh w \operatorname{arccot}(\sinh w) - 1)\cos \eta; & W \leq w \end{cases} \tag{D.13}$$

Applying the conditions of continuity and an additional assumption that $\sigma_m = 0$, we get the constants in Eq.D.13,

$$\begin{aligned} A_i &= - \frac{Ea \operatorname{csch} W}{\operatorname{arccot}(\sinh W)\cosh^2 W - \sinh W}, \\ B_i &= 0, \\ A_e &= -Ea, \end{aligned} \tag{D.14}$$

$$B_e = - \frac{Ea}{\tanh W \operatorname{sech} W - \operatorname{arccot}(\sinh W)}.$$

With a nonconductive membrane surrounding an oblate spheroid, the induced transmembrane voltage is the opposite of the electric potential at the external surface of a homogeneous nonconductive spheroid of equal shape and orientation. This gives

$$\begin{aligned} \Delta\Phi(\eta) &= -\Phi(W, \eta) \\ &= \frac{Ea}{\operatorname{arccot}(\sinh W)\cosh^2 W - \sinh W} \cos \eta. \end{aligned} \tag{D.15}$$

To compare Eq. D.15 to its analog for a sphere given by Eq. 1, we must express the remaining variable, the coordinate η , as a function of φ . There is a bijective relation between the oblate spheroidal coordinates used in this section and spherical coordinates $(r, \varphi, \vartheta) \in \mathbb{R}^3$ used in Appendix B:

$$\begin{aligned} w(r, \varphi) &= \Re \left(\operatorname{arccosh} \frac{ire^{i\varphi}}{a} \right); \\ \eta(r, \varphi) &= \frac{\pi}{2} - \Im \left(\operatorname{arccosh} \frac{ire^{i\varphi}}{a} \right); \end{aligned} \tag{D.16}$$

$$r(w, \eta) = a \sqrt{\frac{\cosh 2w - \cos 2\eta}{2}}; \quad (\text{D.17})$$

$$\varphi(w, \eta) = \arctan(\sinh w \cos \eta, -\cosh w \sin \eta).$$

Let \mathcal{W} denote the surface of the oblate spheroid. There, r is related to φ as

$$r(\varphi)|_{\mathcal{W}} = \frac{R_1 R_2}{\sqrt{R_1^2 \sin^2 \varphi + R_2^2 \cos^2 \varphi}}, \quad (\text{D.18})$$

where R_1 is the larger, and R_2 the smaller radius of the spheroid. Inserting this relation into Eq. D.16 and applying Eq. D.5, we can write the value of η at the surface \mathcal{W} as

$$\eta(\varphi)|_{\mathcal{W}} = \frac{\pi}{2} - \Im \left(\operatorname{arccosh} \frac{iR_1 R_2 e^{i\varphi}}{\sqrt{(R_2^2 - R_1^2)(R_1^2 \sin^2 \varphi + R_2^2 \cos^2 \varphi)}} \right). \quad (\text{D.19})$$

After a trigonometric expansion of the complex term in Eq. D.19 and some calculation, we obtain

$$\begin{aligned} \eta(\varphi)|_{\mathcal{W}} &= \frac{\pi}{2} - \arcsin \frac{R_2 \cos \varphi}{\sqrt{R_1^2 \sin^2 \varphi + R_2^2 \cos^2 \varphi}} \\ &= \arccos \frac{R_2 \cos \varphi}{\sqrt{R_1^2 \sin^2 \varphi + R_2^2 \cos^2 \varphi}}. \end{aligned} \quad (\text{D.20})$$

It also follows from Eq. D.5 that

$$\begin{aligned} &\frac{a}{\operatorname{arccot}(\sinh W) \cosh^2 W - \sinh W} \\ &= \frac{R_2^2 - R_1^2}{\frac{R_2^2}{\sqrt{R_2^2 - R_1^2}} \operatorname{arccot} \frac{R_1}{\sqrt{R_2^2 - R_1^2}} - R_1}. \end{aligned} \quad (\text{D.21})$$

Introducing Eqs. D.20 and D.21 into Eq. D.15, we can now formulate in spherical coordinates the transmembrane voltage induced on an oblate spheroid

$$\begin{aligned} &\Delta\Phi(\varphi) \\ &= E \frac{R_2^2 - R_1^2}{\frac{R_2^2}{\sqrt{R_2^2 - R_1^2}} \operatorname{arccot} \frac{R_1}{\sqrt{R_2^2 - R_1^2}} - R_1} \frac{R_2 \cos \varphi}{\sqrt{R_1^2 \sin^2 \varphi + R_2^2 \cos^2 \varphi}}. \end{aligned} \quad (\text{D.22})$$

The authors thank dr. Tomaž Klinc, dr. Tomaž Slivnik, and Mojca Pavlin for many valuable remarks and suggestions regarding the manuscript.

This work was supported by the Ministry of Science and Technology of the Republic of Slovenia.

REFERENCES

- Bernhardt, J., and H. Pauly. 1973. On the generation of potential differences across the membranes of ellipsoidal cells in an alternating electrical field. *Biophysik*. 10:89–98.
- Bryant, G., and J. Wolfe. 1987. Electromechanical stresses produced in the plasma membranes of suspended cells by applied electric fields. *J. Membr. Biol.* 96:129–139.
- Eisenhart, L. P. 1934. Separable systems of Stäckel. *Ann. Math.* 35: 284–305.
- Gimsa, J., and D. Wachner. 1999. A polarization model overcoming the geometric restrictions of the Laplace solution for spheroidal cells: obtaining new equations for field-induced forces and transmembrane potential. *Biophys. J.* 77:1316–1326.
- Grosse, C., and H. P. Schwan. 1992. Cellular membrane potentials induced by alternating fields. *Biophys. J.* 63:1632–1642.
- Jerry, R. A., A. S. Popel, and W. E. Brownell. 1996. Potential distribution for a spheroidal cell having a conductive membrane in an electric field. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 43:970–972.
- Klee, M., and R. Plonsey. 1972. Finite difference solution for biopotentials of axially symmetric cells. *Biophys. J.* 12:1661–1675.
- Klee, M., and R. Plonsey. 1976. Stimulation of spheroidal cells—the role of cell shape. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 23:347–354.
- Kotnik, T., F. Bobanović, and D. Miklavčič. 1997. Sensitivity of transmembrane voltage induced by applied electric fields—a theoretical analysis. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 43:285–291.
- Kotnik, T., T. Slivnik, and D. Miklavčič. 1998. Time course of transmembrane voltage induced by time-varying electric fields—a method for theoretical analysis and its application. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 45: 3–16.
- Morse, P. M., and H. Feshbach. 1953. *Methods of Theoretical Physics, Part I*. McGraw-Hill, New York. 656–666.
- Neumann, E., and S. Kakorin. 1996. Electrooptics of membrane electroporation and vesicle shape deformation. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 1:790–799.
- Neumann, E., S. Kakorin, and K. Toensing. 1999. Fundamentals of electroporative delivery of drugs and genes. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 48:3–16.
- Rand, R. P. 1964. Mechanical properties of the red blood cell membrane. II. Viscoelectric breakdown of the membrane. *Biophys. J.* 4:303–316.
- Schwan, H. P. 1957. Electrical properties of tissue and cell suspensions. *Adv. Biol. Med. Phys.* 5:147–209.
- Winterhalter, M., and W. Helfrich. 1988. Deformation of spherical vesicles by electric fields. *J. Colloid Interface Sci.* 122:583–586.
- Wolfe, J., M. F. Dowgert, and P. L. Steponkus. 1986. Mechanical study of the deformation and rupture of the plasma membranes of protoplasts during osmotic expansion. *J. Membr. Biol.* 93:63–74.

CHAPITRE 3

Résultats expérimentaux: Électroperméabilisation par diverses impulsions

Ce chapitre est consacré à la présentation des résultats des expériences effectuées au cours du travail de cette thèse. Chaque étude effectuée peut être subdivisée en trois parties: la détermination du pourcentage de cellules électroperméabilisées, de la quantité des molécules exogènes internalisées, et du pourcentage de cellules survivantes, chaque en fonction de l'amplitude des impulsions. Les résultats de ces études ont permis de comparer l'efficacité d'électroperméabilisation obtenue avec des différents ensembles des paramètres des impulsions: le nombre, la durée et la forme des impulsions.

La Section 3.1 incorpore la description des matériels et des méthodes employés dans ces études. Les Sous-sections de 3.1.1 à 3.1.5 traitent de la manipulation des cellules, de l'exposition aux impulsions électriques, des méthodes d'évaluation du pourcentage de cellules qui survivent au traitement, de la quantité moyenne de molécules internalisées par cellule, et du pourcentage de cellules électroperméabilisées. La Sous-section 3.1.6 décrit le traitement statistique des données expérimentales.

Pour exposer des cellules aux impulsions à haut voltage d'une forme arbitraire, nous avons développé un système se composant d'un générateur de fonctions programmable commercial et d'un amplificateur bipolaire à haute fréquence et à haut voltage. Jusqu'ici, un tel système n'était pas disponible dans le commerce, et dans la Section 3.1.2 nous décrivons ce système un peu plus en détail.

La méthode la plus communément utilisée de détermination du pourcentage de cellules électroperméabilisées est basée sur l'utilisation de l'iodure de propidium, un marqueur fluorescent dont l'émission de fluorescence est activée par la liaison à l'ADN cellulaire. Cette méthode est bien établie, mais elle a trois désavantages en raison desquels les résultats expérimentaux peuvent être mal interprétés. Pour éliminer ces désavantages, nous avons développé une nouvelle méthode basée sur la bléomycine, un agent cytotoxique avec un taux très faible de pénétration à travers la membrane cellulaire intacte, mais avec une cytotoxicité très élevée s'il est internalisé. Cette dernière méthode, ainsi qu'une comparaison détaillée des avantages et des désavantages des deux méthodes, sont détaillées dans l'article qui forme l'essentiel de la Section 3.1.5.

Dans la Section 3.2, nous décrivons les résultats de quatre groupes d'expériences, dans lesquelles nous avons étudié l'efficacité de l'électroperméabilisation obtenue avec des formes d'impulsions différentes. Dans le premier groupe d'expériences (Section 3.2.1), nous avons comparé l'efficacité de quatre trains d'impulsions rectangulaires monophasiques différents: une impulsion de 100 μ s, huit impulsions de 100 μ s délivrées à des intervalles de 1 s (i.e., à une fréquence de répétition de 1 Hz), une 1 impulsion de 1 ms, et huit impulsions de 1 ms délivrées à des intervalles de 1 s. Dans le deuxième groupe (Section 3.2.2), nous avons comparé l'efficacité d'électroperméabilisation obtenue par des impulsions rectangulaires monophasiques et celle obtenue par des impulsions rectangulaires biphasiques symétriques de même durée. Dans le troisième groupe (Section 3.2.3), les rôles du temps d'élévation et du temps de chute ont été étudiés pour une impulsion trapezoïdale monophasique. Finalement, dans le quatrième groupe d'expériences (Section 3.2.4), nous avons comparé les effets obtenus par des impulsions rectangulaires biphasiques, par des ondes sinusoïdales, et par des ondes triangulaires.

Une discussion de ces résultats, et en particulier les conclusions tirées de ces résultats, sont seulement significatives si elles sont soutenues par les explications fournies par la compréhension des mécanismes fondamentaux. Ainsi, une analyse détaillée des données expérimentales est plus raisonnable si elle est basée sur la connaissance théorique, et la synthèse entre la théorie et les expériences constitue le sujet du Chapitre 4.

3.1 MATÉRIELS ET MÉTHODES

3.1.1 Cellules

Nous avons utilisé des cellules DC-3F, une lignée cellulaire de fibroblastes de hamster chinois spontanément transformés (Biedler and Riehm, 1970), qui ont été cultivées en monocouche à 37°C et avec 5% de CO₂ dans un incubateur (Universal Jacketed Incubator, Forma Scientific, Etats-Unis d'Amérique). Les flacons de 150 cm² (TPP, Suisse) ont été employés pour la culture générale, et les boîtes de Pétri de 60 mm (TPP) ont été utilisées pour la évaluation de l'efficacité de clonage. Le milieu de culture était composé de milieu essentiel minimum de Eagle (EMEM 41090, Life Technologies, Etats-Unis d'Amérique) complété par 10% de sérum de veau fœtal (Life Technologies), 100 U/ml de pénicilline (Sarbach/Solvay Pharma, Belgique) et 125 mg/ml de streptomycine (Sarbach/Solvay Pharma).

3.1.2 Exposition aux impulsions électriques

Après la trypsination avec de la trypsine-EDTA (Life Technologies), les cellules ont été centrifugées pendant 5 min à 1000 rpm dans une centrifugeuse (C312, Jouan, France) et resuspendues à 2×10^7 cellules/ml en milieu essentiel minimum de Spinner (SMEM 21385, Life Technologies), qui est une modification sans calcium du EMEM. Une goutte de 50 μ l de la suspension de cellules a été placée entre deux électrodes plates d'acier inoxydable écartées de 2 millimètres, et des impulsions électriques ont été

appliquées en utilisant le générateur d'impulsions. Pour le premier groupe d'expériences, qui a servi à étudier les paramètres des trains d'impulsions rectangulaires monophasiques, nous avons employé un électropulsateur commercial (GHT 1287B, Jouan). Pour les expériences suivantes, qui ont exigé d'autres formes d'impulsions, nous avons construit un système composé d'un générateur de fonctions programmable (AFG 310, Tektronix, Etats-Unis d'Amérique) et un amplificateur bipolaire à haute fréquence et à haut voltage. Les impulsions ont été transmises aux électrodes et observées sur l'oscilloscope. L'installation expérimentale entière est montrée schématiquement dans la Fig. 26.

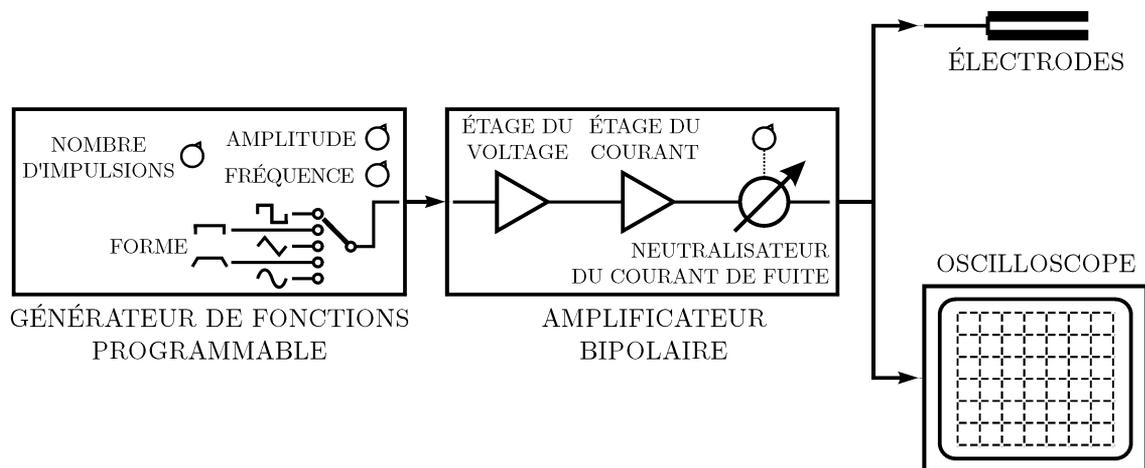


Figure 26

3.1.3 Détermination de la survie des cellules

Le pourcentage de cellules survivantes a été déterminé par l'efficacité de clonage. Dans cette méthode la viabilité est définie par la capacité de chacune des cellules vivantes à se multiplier et à former des colonies après quelques jours de culture. Les cellules ont été électropulsées en suspension, dans les conditions décrites ci-dessus. Après la pulsation, les cellules ont été incubées pendant 10 min à température ambiante et resuspendues dans du SMEM. Après 30 min additionnelles, les cellules ont été transférées dans le milieu de culture (voir la Section 3.1.1) et cultivées pendant 5 jours dans les boîtes de Pétri. Les cellules ont alors été fixées avec du méthanol 100% (Carlo Erba Reagenti, Italie) et les colonies ont été colorées avec du cristal violet 1% (Sigma, Etats-Unis d'Amérique). Les colonies ont été comptées sous un photomicroscope (Leica, Allemagne) et leur nombre a été comparé à celui du témoin absolu (les cellules non pulsées) pour obtenir le pourcentage de cellules survivantes.

3.1.4 Détermination de l'internalisation de molécules exogènes

Le transport de molécules exogènes à travers la membrane a été déterminée par l'internalisation du lucifer jaune (Lucifer Yellow – LY, Sigma). Avant la pulsation des cellules, le LY a été ajouté à la suspension en quantité adéquate pour obtenir une concentration finale de 1 mM. Après la pulsation, les cellules ont été incubées pendant

10 min à température ambiante et resuspendues dans du SMEM. Le LY externe a été lavé par deux centrifugations et deux resuspensions consécutives dans du PBS. Ensuite, les cellules ont été lysées par ultrasonication dans 1 ml de PBS (Sonifier 250, Branson, Etats-Unis d'Amérique) et la fluorescence a été mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre (SFM 25, BioTek Kontron, France). L'excitation a été effectuée à la longueur d'onde de 418 nm et l'émission a été détectée à 525 nm. Une courbe de calibrage a été obtenue par régression linéaire des fluorescences des cuvettes de calibrage contenant 10 nM, 100 nM, et 1 μ M de LY, et les concentrations de LY dans les échantillons ont été lues sur cette courbe.

3.1.5 Détermination de l'électroperméabilisation des cellules – ARTICLE 5

Evaluation of cell membrane electropermeabilization by means of a nonpermeant cytotoxic agent

[Évaluation de l'électroperméabilisation de la membrane cellulaire par un agent cytotoxique non perméant]

Publié dans *Biotechniques* 28: 921-926, 2000

Sommaire: Pour l'évaluation du pourcentage de cellules électroperméabilisées, les cellules sont habituellement exposées aux impulsions électriques en présence d'iodure de propidium, un colorant fluorescent dont l'émission de fluorescence est activée par la liaison à l'ADN cellulaire. Le pourcentage de cellules perméabilisées est alors déterminé en utilisant un cytomètre de flux. Cette méthode, largement utilisée, a plusieurs désavantages: (i) un choix arbitraire de l'intensité minimale de fluorescence pour la discrimination entre les cellules perméabilisées et les cellules non perméabilisées; (ii) l'incapacité de détecter les cellules désagrégées en raison de l'électroperméabilisation; et (iii) la fausse détection des fantômes cellulaires exempts de fluorescence en raison de la perte de l'ADN provoquée par l'électroperméabilisation. Nous présentons une méthode simple et peu coûteuse qui élimine ces désavantages. Cette méthode est basée sur l'utilisation d'un agent cytotoxique qui ne peut pas diffuser à travers une membrane plasmique intacte et mène ainsi à la mort sélective des cellules électroperméabilisées. La quantité de cellules non perméabilisées est donc déterminée par un essai approprié de viabilité. La bléomycine à une concentration de 5 nM ne cause aucun effet statistiquement significatif sur la survie des cellules en absence d'impulsions électriques, alors que cette concentration est suffisante pour causer la mort de toutes les cellules électroperméabilisées. La quantité de cellules qui survivent à l'exposition par rapport au témoin donne une valeur crédible du pourcentage de cellules non perméabilisées.

Short Technical Reports

Evaluation of Cell Membrane Electroporation by Means of a Nonpermeant Cytotoxic Agent

BioTechniques 28:921-926 (May 2000)

ABSTRACT

For the evaluation of cell membrane electroporation, cells are usually exposed to electric pulses in the presence of propidium iodide, a fluorescent dye activated by binding to cellular DNA. The fraction of permeabilized cells is then determined using a flow cytometer. This widely established method has several drawbacks: (i) an arbitrary choice of minimum fluorescence intensity for characterization of permeabilized cells; (ii) the inability to detect cells disintegrated because of intense electroporation; and (iii) false detection of cellular ghosts devoid of fluorescence because of leakage of DNA caused by electroporation. Here, we present a simple and inexpensive method that eliminates these drawbacks. The method is based on the use of a cytotoxic agent that cannot permeate through an intact plasma membrane and thus leads to selective death of the electroporated cells. The amount of nonpermeabilized cells is then determined by a suitable viability test. Bleomycin at a 5-nM concentration causes no statistically significant effect on cell survival in the absence of electric pulses, yet this concentration is sufficient for lethal toxicity in electroporated cells. The amount of cells surviving the exposure relative to the control gives a reliable value of the fraction of nonpermeabilized cells.

INTRODUCTION

Exposing cells to electric pulses can render their plasma membranes permeable to otherwise nonpermeant molecules. This phenomenon, referred to as membrane electroporation (sometimes called electroporation), depends on the number of pulses delivered, pulse duration and pulse ampli-

tude. With these parameters properly chosen, electroporation is reversible, and the cells return to their normal physiological state. Internalization of various molecules using this method has found applications in oncology (9), genetics (11), immunology (7) and cell biology (4).

Before the method is routinely used, pulse parameters for the best possible yield of reversible permeabilization have to be determined. In general, with a given number and duration of pulses, pulse amplitudes that are too low do not lead to permeabilization at all, while amplitudes that are too high lead mostly to irreversible permeabilization and therefore to cell death. Quantitatively, this can be characterized by two pulse amplitudes, as shown in Figure 1—the first leading to permeabilization of 50% of the cell population ($P_{50\%}$) and the second leading to death of 50% of the cell population ($D_{50\%}$).

$D_{50\%}$ is determined by the viability of the cells exposed to electric pulses; this is easily assessed either by their cloning efficiency (13) or by an MTT assay (5). $P_{50\%}$ is usually evaluated through the uptake of propidium iodide, a fluorescent dye activated by binding to DNA (2). Other dyes sometimes used for this purpose include trypan blue (14) and lucifer yellow (6). The latter two methods, however, have considerable weaknesses. Namely, trypan blue is a stain actively excluded from living cells, and the process of exclusion depends on the level of cellular ATP. Since the latter is perturbed by electroporation, this biases a quantitative evaluation. Lucifer yellow fluoresces both inside and outside the cell, and thus the cell suspension has to be washed and centrifuged two or three consecutive times before the measurement. Because the centrifugations are performed immediately after electroporation, this might lead to the death of certain cells that would otherwise survive the treatment.

Because propidium iodide binds to cellular DNA, it remains in the cell once internalized. In addition, propidium iodide only fluoresces when internalized, and thus no washing of the cell suspension after the exposure to electric pulses is required. The percentage of permeabilized cells is then efficiently mea-

sured on a flow cytometer (12). Because of this, the propidium iodide method is widely established today. However, despite its advantages over the alternative methods, it has three substantial drawbacks (Figure 2): (i) though various calibrations can be performed, the minimum fluorescence intensity for characterization of electroporated cells is largely chosen arbitrarily; (ii) the cells that disintegrated because of intense electroporation cannot be detected, which biases the calculated percentage of electroporated cells; and (iii) the cellular ghosts that are devoid of fluorescence because of leakage of DNA caused by electroporation are incorrectly detected as nonpermeabilized cells.

Here, we present a simple and inexpensive method that eliminates the drawbacks of the propidium iodide method. Exposure to electric pulses in the presence of bleomycin, a cytotoxic agent that cannot permeate through an intact plasma membrane (10), leads to selective death of the electroporated cells, and the survival is determined by the cloning efficiency. In the absence of electric pulses, a 5-nM concentration of bleomycin causes no statistically significant effect on cell survival, yet this concentration is sufficient for lethal toxicity in electroporated cells. The cloning efficiency normalized to the control gives a reliable value of the fraction of nonpermeabi-

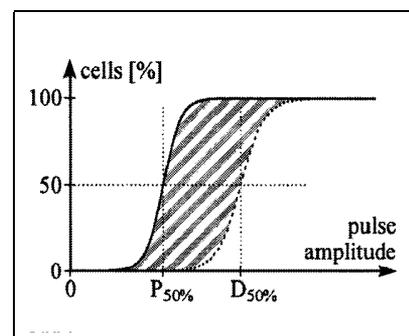


Figure 1. Electroporation (solid) and cell death (dashed) as functions of electric pulse amplitude (a hypothetical situation). Pulse amplitude is best evaluated as the voltage-to-distance ratio. We denote the pulse amplitudes corresponding to 50% values on the two curves as the $P_{50\%}$ and $D_{50\%}$. If permeabilization is assumed to be the only reason for cell death, reversibly permeabilized cells occupy the entire area between the two curves (hatched).

Short Technical Reports

lized cells. By subtracting this value from 100% at each pulse amplitude, one obtains the cell permeabilization as a function of the pulse amplitude. As with the propidium iodide method, $P_{50\%}$ can then be assessed by nonlinear regression of the experimental data.

MATERIALS AND METHODS

Cells

DC3F cells, a line of spontaneously transformed Chinese hamster fibroblasts (3), were grown in monolayers at 37°C and 5% CO₂ in a Universal Jacketed Incubator (Forma Scientific, Marietta, OH, USA). Flasks (150 cm²) were used for general cultivation, and 60-mm petri dishes were used for cloning efficiency assays (both from TPP, Trasadingen, Switzerland). The culture medium consisted of Eagle minimum essential medium (EMEM) 41090 supplemented with 10% fetal bovine serum (both from Life Technologies, Rockville, MD, USA), 100 U/mL penicillin and 125 µg/mL streptomycin (both from Sarbach/Solvay Pharma, Brussels, Belgium).

Exposure to Electric Pulses

After trypsination with trypsin-EDTA (Life Technologies), cells were centrifuged for 5 min at 1000 rpm in a C312 centrifuge (Jouan, Saint Herblain, France) and resuspended at 2×10^7 cells/mL in Spinner minimum essential medium (SMEM) 21385; (Life Technologies), which is a calcium-depleted modification of EMEM. A 50-µL droplet of the cell suspension was placed between two flat stainless steel electrodes 2 mm apart, and monophasic rectangular electric pulses were then applied with a GHT 1287B electropulsator (Jouan).

Determination of Electropermeabilization with Propidium Iodide

Before the exposure to electric pulses, propidium iodide was added to the suspension in the amount leading to 100-µM propidium iodide concentration. After the exposure, cells were incubated for 10 min and resuspended in

PBS (Life Technologies). A FACSort™ flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) was used to assess the percentage of permeabilized cells (Figure 2). Excitation was set at 488-nm wavelength and emission was detected at 640 nm.

Determination of Electropermeabilization with Bleomycin

Before the exposure to electric pulses, bleomycin (Laboratoires Roger Bellon, France) was added to the suspension in the amount leading to a 5-nM bleomycin concentration. After the exposure, cells were incubated for 10 min at room temperature and then resuspended in SMEM. After an additional 30 min, cells were diluted in the culture medium to 100 cells/mL, and 4 mL suspension were transferred into each 60-mm petri dish where the cells were grown for five days. Cells were then fixed by a 15-min exposure to 100% ethanol (Carlo Erba Reagenti, Milan, Italy) and stained for 15 min with 1% crystal violet (Sigma). Clone colonies were counted and normalized to the

control (no pulses) to get the percentage of cells surviving the exposure to electric pulses in suspension with 5 nM bleomycin. By subtracting this percentage from 100%, the percentage of permeabilized cells was obtained.

Treatment of Experimental Data

All experiments were repeated three times at intervals of several days or more. For each experimental point, mean and standard deviation (N-1) were determined. Using nonlinear regression, the data obtained by the propidium iodide method were fitted to a four-parameter sigmoid curve

$$\text{Eq. 1 } y(x) = y_{\text{MIN}} + \frac{y_{\text{MAX}} - y_{\text{MIN}}}{1 + \exp[(x_c - x)/b]}$$

where x is the pulse amplitude, y is the percentage of permeabilized cells, while x_c , y_{MIN} , y_{MAX} and b are the four parameters determining the shape of the sigmoid curve. Similarly, the data obtained by the bleomycin method were fitted to a two-parameter sigmoid curve

$$\text{Eq. 2 } y(x) = \frac{100\%}{1 + \exp[(x_c - x)/b]}$$

with x and y as above, and $x_c = P_{50\%}$ (bleomycin) and b the two parameters of the sigmoid curve. The use of a two-parameter sigmoid curve is justified by the fact that the bleomycin curves always span from 0%–100%. Furthermore, the parameters obtained by fitting the same data to both sigmoid curves differ only insignificantly (e.g., the values of $P_{50\%}$ differ by less than one part in a hundred).

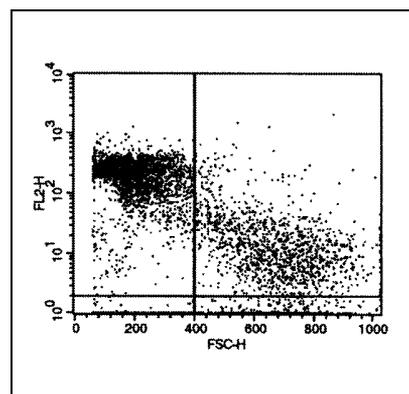


Figure 2. An example of a flow cytometer plot in the evaluation of electropermeabilization with the propidium iodide method. The x-axis gives the forward scattering (reflecting the size) of the analyzed particle (FSC-H), and the y-axis gives its fluorescence (FL2-H); both are in arbitrary units. Above the horizontal limiter, the particles have sufficient fluorescence to qualify as permeabilized, while to the right of the vertical limiter, the particles are large enough to qualify as cells. Debris of the cells disintegrated by intense permeabilization is mostly found in the thick cloud in the top left quadrant, and the ghosts devoid of DNA are in the bottom right quadrant. The measurement shown above was obtained with one monophasic rectangular pulse of 1-ms duration and 1200 V/cm amplitude.

RESULTS

Cell membrane electropermeabilization as assessed by the propidium iodide method and by the bleomycin method was determined for monophasic rectangular pulses with four typical sets of parameters: one 100-µs pulse, one 1-ms pulse, eight 100-µs pulses with 1-Hz repetition frequency and eight 1-ms pulses with 1-Hz repetition frequency. Figure 3 shows the results of these measurements.

Short Technical Reports

DISCUSSION

The bleomycin method introduced in this paper has several advantages compared with the established propidium iodide method. The first of these advantages is shown in Figure 3, where the bleomycin ("BLM") curve spans from 0%–100%, as expected, while the propidium iodide ("PI") curve always starts above 0% and often ends below 100%. The reasons for these differences are explained in the following paragraphs.

0% Minimum of the Bleomycin Method

It must be stressed that the 0% minimum of the bleomycin curves is not a biased artifact introduced by calculation. Without electric pulses, the viability of the cells is not affected even after an 18-h incubation in a culture medium containing 7000-nM bleomycin concentration (1). Likewise, the differences between the cloning efficiency of nonpulsed cells kept in pure suspension and of nonpulsed cells exposed to 5 nM bleomycin for the time of the experiment are statistically insignificant (data not shown). With no exposure to electric pulses, the 5-nM bleomycin method gives 0% electropermeabilization, as expected.

Above-0% Minimum of the Propidium Iodide Method

Cell suspensions necessarily contain a certain fraction of dead cells, essentially due to stress suffered in the handling during the experimental procedure. Since they are not killed by electric pulses, they should be omitted from the evaluation of both cell permeabilization and cell death caused by electric pulses. The bleomycin method excludes these cells automatically because they represent the same fraction in the control as in the assays where pulses are delivered. In the propidium iodide method, those dead cells that have not yet disintegrated fluoresce and appear as electropermeabilized. This inevitably gives an above-zero fraction of electropermeabilized cells in every assay including the control, though electropermeabilization obviously cannot occur if no pulses are delivered.

The propidium iodide curve is often scaled to start at 0% by subtracting the number of cells detected as permeabilized in the control from those detected as permeabilized in each assay. This approach can nevertheless be questioned, as its results depend on the chosen value of the minimum fluorescence of electropermeabilization (Figure 2).

100% Maximum of the Bleomycin Method

The bleomycin curve always reaches 100%, which implies that all the cells are electropermeabilized at the corresponding pulse amplitude. This is also supported by the fact that the 100% values are reached at pulse amplitudes significantly below those found to cause 100% cell killing in the medium with no bleomycin (8). It must be noted that for cell lines with an elevated ability of DNA repair, 5 nM

bleomycin might not suffice for the death of all electropermeabilized cells. This would result in a below-100% maximum of the bleomycin curve. In these cases, the lowest concentration of bleomycin that yields a 100% maximum should first be determined, and this concentration should be used for a fully functional method.

Below-100% Maximum of the Propidium Iodide Method

Even at very high pulse amplitudes, the bottom right quadrant of the flow cytometer plot often contains a certain number of particles. These are most probably cellular ghosts devoid of DNA (and thus of fluorescence), which can be the remnants of intensively electropermeabilized cells. Unlike the bleomycin curve, the propidium iodide curve often does not reach 100%, which does not reflect the reality.

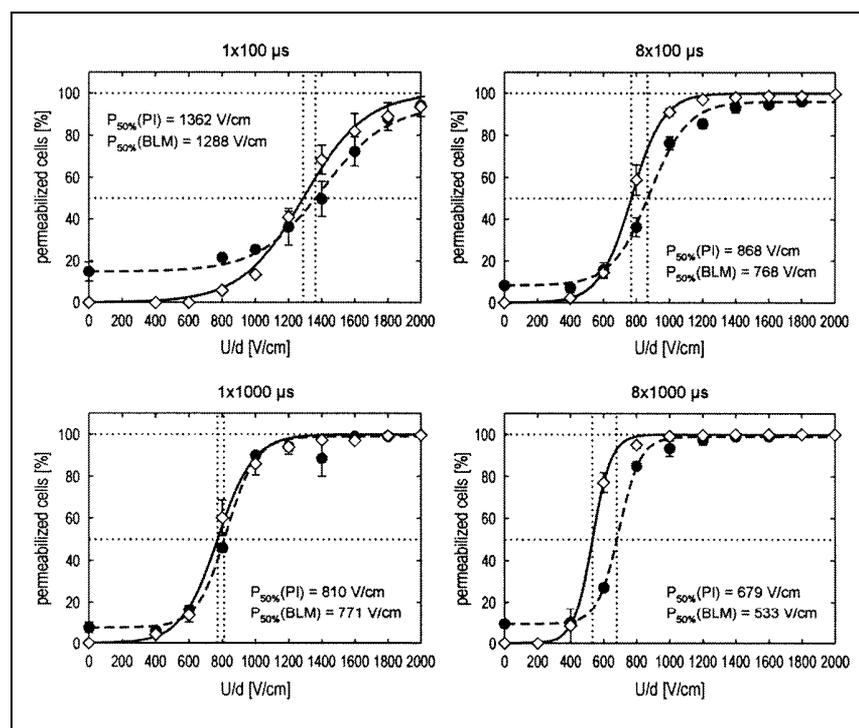


Figure 3. Electropermeabilization as a function of pulse amplitude determined by the bleomycin (BLM) method (\diamond) and by the propidium iodide (PI) method (\bullet). The symbols denote the means, and the error bars are the standard deviations. In each graph, a two-parameter sigmoid curve is fitted to bleomycin data (solid), and a four-parameter sigmoid curve is fitted to propidium iodide data (dashed). For both methods, the sigmoid curves define the corresponding values of $P_{50\%}$, which are also displayed. Cell death caused by the pulses alone (i.e., in the absence of bleomycin) only became detectable above 1600 V/cm at 1 \times 100- μ s pulse, above 1200 V/cm at 8 \times 100- μ s and 1 \times 1000- μ s pulses and above 600 V/cm at 8 \times 1000- μ s pulses (data not shown). With the exception of the last, these pulse amplitudes are far above the respective $P_{50\%}$ values.

Short Technical Reports

Other Features of the Bleomycin Method

The second advantage of the bleomycin method is correct detection of cells disintegrated because of intensive electroporation. The bleomycin method determines cell survival, and the disintegrated cells are evidently included along with the other dead cells. In contrast, the propidium iodide method detects the disintegrated cells in the debris in the top left quadrant. To classify them correctly as permeabilized cells, the number of cells would have to be reconstructed out of the number of debris particles, which is clearly an impossible task.

The third advantage of the bleomycin method is that it needs no arbitrarily chosen limit for the classification of permeabilized cells. With the propidium iodide method, the lower limit of fluorescence intensity must be chosen

manually, and an appropriate choice is based entirely on experience. In addition, fluorescence can be affected by the experimental conditions and can also differ between cell lines. The effect of the manual choice of the fluorescence limit is demonstrated in Figure 3, where the $P_{50\%}$ values given by the propidium iodide method are invariably higher than the ones provided by the bleomycin method. If a lower value of the limiting fluorescence is chosen, the propidium iodide curves are shifted to the right.

The bleomycin method successfully eliminates these drawbacks of the propidium iodide method, but the latter method still has its merits. First, based on the fluorescence intensity, the propidium iodide method gives an insight into the distribution of the uptake among the cell population (Figure 2). Second, when the results have to be obtained very rapidly, the propidium iodide method only takes hours, while the

cloning efficiency determination in the bleomycin method requires five days.

Finally, the fourth advantage of the bleomycin method lies in its affordability. No sophisticated equipment is needed, and a single package of bleomycin, if properly repacked and stored (e.g., frozen), can last for thousands of experiments.

REFERENCES

1. **Akiyama, S., K. Hidaka, S. Komiyama and M. Kuwano.** 1979. Control of permeation of bleomycin A₂ by polyene antibiotics in cultured Chinese hamster cells. *Cancer Res.* 39:5150-5154.
2. **Arndt-Jovin, D.J. and T.M. Jovin.** 1989. Fluorescence labeling and microscopy of DNA. *Methods Cell. Biol.* 30:417-448.
3. **Biedler, J.L. and H. Riehm.** 1970. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro. *Cancer Res.* 30:1174-1184.
4. **Bobinac, Y., A. Khodyakov, L.M. Mir, C.L. Rieder, B. Eddé and M. Bornens.** 1998. Centriole disassembly in vivo and its effects

Short Technical Reports

- on chromosome structure and function in vertebrate cells. *J. Cell Biol.* 143:1575-1589.
5. **Denizot, F. and R. Lang.** 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* 89:271-277.
6. **Dinchuk, J.E., K.A. Kelley and G.N. Callahan.** 1992. Flow cytometric analysis of transport activity in lymphocytes electroporated with a fluorescent organic anion dye. *J. Immunol. Methods* 155:257-265.
7. **Lukas, J., J. Bartek and M. Strauss.** 1994. Efficient transfer of antibodies into mammalian cells by electroporation. *J. Immunol. Methods* 170:255-259.
8. **Mir, L.M., H. Banoun and C. Paoletti.** 1988. Introduction of definite amounts of nonpermeant molecules into living cells after electroporation: direct access to the cytosol. *Exp. Cell Res.* 175:15-25.
9. **Mir, L.M., L.F. Glass, G. Serša, J. Teissié, C. Domenge, D. Miklavčič, M.J. Jaroszeski, S. Orłowski et al.** 1998. Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumors by electrochemotherapy. *Br. J. Cancer* 77:2336-2342.
10. **Mir, L.M., O. Tounekti and S. Orłowski.** 1996. Bleomycin: revival of an old drug. *Gen. Pharmacol.* 27:745-748.
11. **Neumann, E., S. Kakorin and K. Toensing.** 1999. Fundamentals of electroporative delivery of drugs and genes. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 48:3-16.
12. **Rols, M.P. and J. Teissié.** 1998. Flow cytometry quantification of electroporation. *Methods Mol. Biol.* 91:141-147.
13. **Roper, P.R. and B. Drewinko.** 1976. Comparison of in vitro methods to determine drug-induced cell lethality. *Cancer Res.* 36:2182-2188.
14. **Saunders, J.A., C.H. Lin, B.H. Hou, J. Cheng, N. Tsengwa, J.J. Lin, C.R. Smith, M.S. McIntosh and S. Van Wert.** 1995. Rapid optimization of electroporation conditions for plant cells, protoplasts, and pollen. *Mol. Biotechnol.* 3:181-90.

This work was supported in part by the CNRS, the Institut Gustave-Roussy, the University of Paris XI and by the Ministry of Science and Technology of the Republic of Slovenia. Address correspondence to Dr. Lluís M. Mir, UMR 8532 CNRS, Institut Gustave-Roussy, 39 rue C. Desmoulins, F-94805 Villejuif, France. Internet: luismir@igr.fr

Received 8 November 1999; accepted 24 January 2000.

Tadej Kotnik^{1,2}, Alenka Maček-Lebar¹, Damijan Miklavčič¹ and Lluís M. Mir²

¹University of Ljubljana
Ljubljana, Slovenia

²CNRS/Institut Gustave-Roussy
Villejuif, France

3.1.6 Traitement statistique des données expérimentales

Toutes les expériences ont été répétées trois fois à des intervalles de plusieurs jours. La température et l'humidité de l'air ont été contrôlées. Pour chaque point expérimental, la moyenne et l'écart type des trois répétitions de la même expérience ont été déterminés.

En utilisant une régression non-linéaire, les données d'électroperméabilisation et de survie ont été adaptées à des courbes sigmoïdales à deux paramètres

$$y(x) = \frac{100\%}{1 + \exp[(x_C - x)/b]}.$$

Pour les données d'électroperméabilisation, x représente l'amplitude de l'impulsion, y le pourcentage de cellules perméabilisées, x_C l'amplitude de l'impulsion qui mène à la perméabilisation de 50% des cellules ($P_{50\%}$), et b la pente de la courbe sigmoïdale.

Pour les données de survie, x représente l'amplitude de l'impulsion, y le pourcentage de cellules survivantes, x_C l'amplitude de l'impulsion qui mène à la mort de 50% des cellules ($D_{50\%}$), et b détermine la pente de la courbe sigmoïdale.

Les variations de $P_{50\%}$ et de $D_{50\%}$ ont été déterminées comme les écart types des trois valeurs de $P_{50\%}$ et de $D_{50\%}$ obtenues par des régressions séparées de chacune des trois répétitions de l'expérience.

3.2 RÉSULTATS

3.2.1 Amplitude, durée, et nombre d'impulsions

Le rôle de l'amplitude, de la durée, et du nombre d'impulsions rectangulaires dans l'efficacité de l'électroperméabilisation ont été étudiés en détail par plusieurs auteurs (Rols et Teissié, 1990a; Wolf et al., 1994; Maček-Lebar et al., 1998; Rols et Teissié, 1998a). Dans notre étude, la recherche sur ces paramètres a servi principalement à valider notre protocole expérimental et à déterminer les conditions optimales pour des expériences ultérieures. Quatre combinaisons différentes de la durée d'impulsion et du nombre d'impulsions ont été employées, comme illustré dans la Fig. 27: une impulsion de 100 μ s, un train de huit impulsions de 100 μ s délivrées à des intervalles de 1 s (i.e., à fréquence de répétition de 1 Hz), une impulsion de 1 ms, et un train de huit impulsions de 1 ms délivrées à des intervalles de 1 s. Pour chaque combinaison, l'électroperméabilisation, la survie, et l'internalisation ont été déterminées pour dix amplitudes d'impulsions:¹ 0, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, et 2000 V/cm. Les Figs. 28, 29, 30 et 31 montrent ces résultats, chaque figure donnant la survie et la perméabilisation dans le graphique du haut, et la concentration intracellulaire de LY dans le graphique du bas. $P_{50\%}$ et $D_{50\%}$ ont été définis dans la Section 3.1.6.

¹ Dans toute cette thèse, l'amplitude d'impulsion est donnée par le rapport du voltage d'impulsion (U) et de la distance entre les électrodes (d). Pour des électrodes plates parallèles, ce rapport sert d'estimation fiable du champ électrique.

Comme ces résultats le montrent, avec huit impulsions il y a un pic prononcé dans la courbe d'internalisation du LY, alors qu'un tel pic n'est pas présent quand une seule impulsion est délivrée. Pour le train de huit impulsions, le pic de LY correspond étroitement à l'intersection entre les courbes de perméabilisation et de survie. Ceci implique que la diminution de la quantité de molécules internalisées avec l'augmentation des amplitudes des impulsions au-delà du pic est le résultat de la perméabilisation irréversible des cellules.² Comme le train de huit impulsions rectangulaires monophasiques de 1 ms se caractérise par le pic le plus pointu, ce train d'impulsions a été choisi comme norme pour les études sur l'efficacité des autres formes d'impulsion qui ont été étudiées ensuite et qui sont décrites ci-dessous.

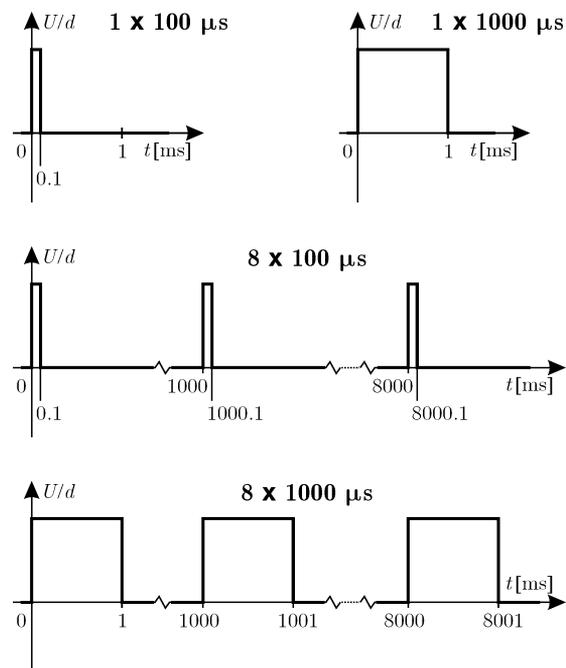


Figure 27

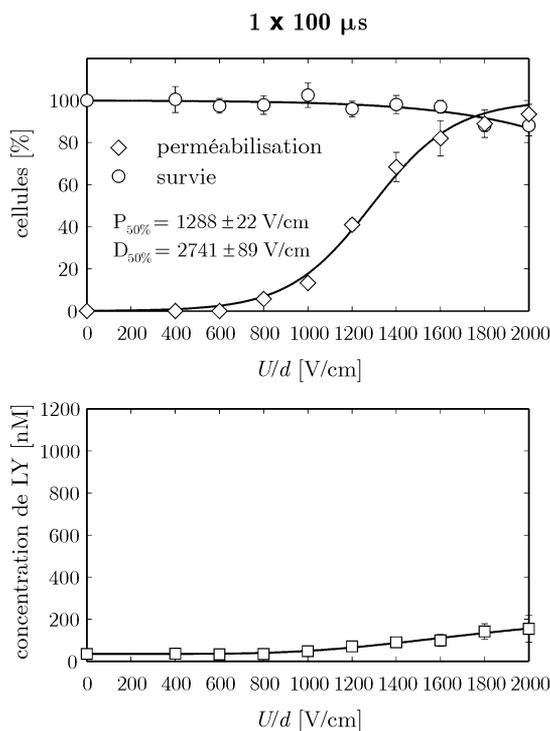


Figure 28

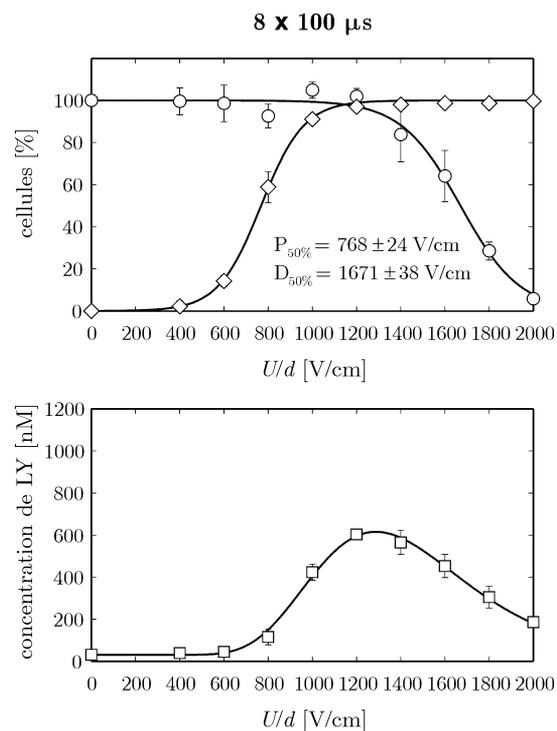


Figure 29

² À la différence de l'iodure de propidium qui est lié à l'ADN et ainsi confiné à l'intérieur des cellules quelque soit l'état final de la membrane, le LY est libre de quitter la cellule si la membrane reste perméabilisée.

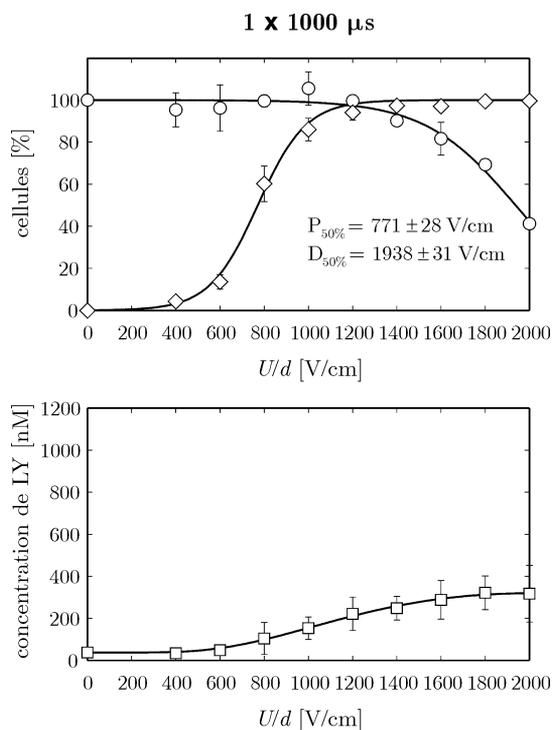


Figure 30

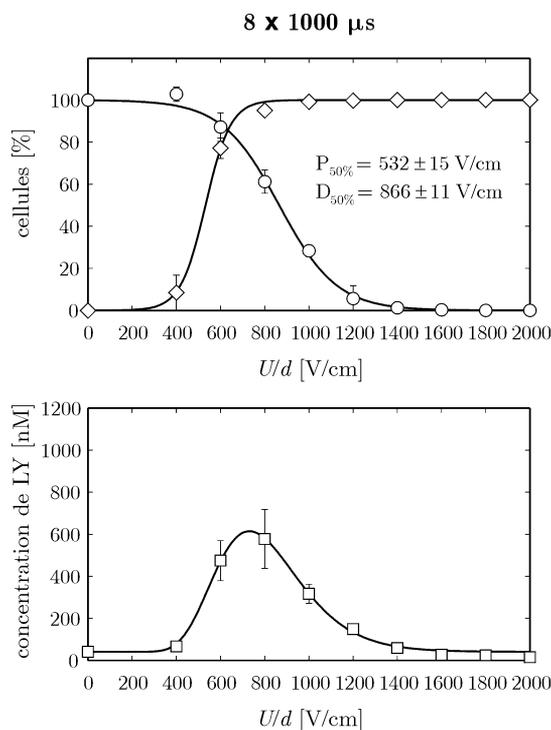


Figure 31

3.2.2 Impulsions rectangulaires monophasiques et biphasiques

Pour comparer l'efficacité des impulsions rectangulaires monophasiques et des impulsions rectangulaires biphasiques symétriques, nous avons divisé les cellules en trois groupes. Dans le premier groupe, nous avons appliqué un train de huit impulsions monophasiques de 1 ms (Fig. 32, en haut).³ Le deuxième groupe a été exposé à un train de huit impulsions biphasiques symétriques de 1 ms, i.e., dans chaque impulsion la phase positive de 500 μs a été suivie par une phase négative de 500 μs de même amplitude (Fig. 32, au milieu). Pour le troisième groupe, on a utilisé un train de quatre impulsions biphasiques symétriques de 2 ms, chacun se composant d'une phase positive de 1 ms et d'une phase négative de 1 ms de même amplitude (Fig. 32, en bas). Pour chaque combinaison, l'électroporabilité, la survie, et l'internalisation ont été déterminées pour des amplitudes d'impulsion de 0, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, et 1400 V/cm. Les résultats de ces expériences sont montrés dans les Figs. 33, 34 et 35.

Comme les figures le montrent, aucune différence statistiquement significative n'a été détectée entre les courbes de survie obtenues par les trois protocoles. D'autre part, avec les deux protocoles biphasiques, les courbes de perméabilisation ont été décalées vers

³ Cette expérience a déjà été faite avec l'électropulsateur Jouan (Section 3.2.1), mais pour l'uniformité avec les autres expériences de ce groupe, elle a été refaite en utilisant la combinaison du générateur de fonctions Tektronix et de l'amplificateur de haut voltage. Comme les Figs. 30 et 31 en témoignent, les différences entre les courbes obtenues par les deux installations étaient dans la marge des écarts types. Les différences entre les impulsions rectangulaires produites par les deux appareillages étaient très faibles: l'amplitude était stable et contrôlée dans les deux cas, alors que le temps de montée des impulsions du Jouan était de 2.8 μs par rapport à 1.9 μs pour la combinaison Tektronix - amplificateur de haut voltage. Comme cela est décrit dans la Section 3.2.3, une telle différence dans le temps de montée ne peut pas affecter l'efficacité de l'électroporabilité.

des voltages plus bas. Dans les deux cas, le décalage observé était statistiquement significatif, avec une évaluation quantitative donnée par la comparaison des valeurs de $P_{50\%}$. La différence était encore plus prononcée pour l'internalisation du LY, pour laquelle à l'amplitude d'impulsion de 800 V/cm (correspondant à la fluorescence

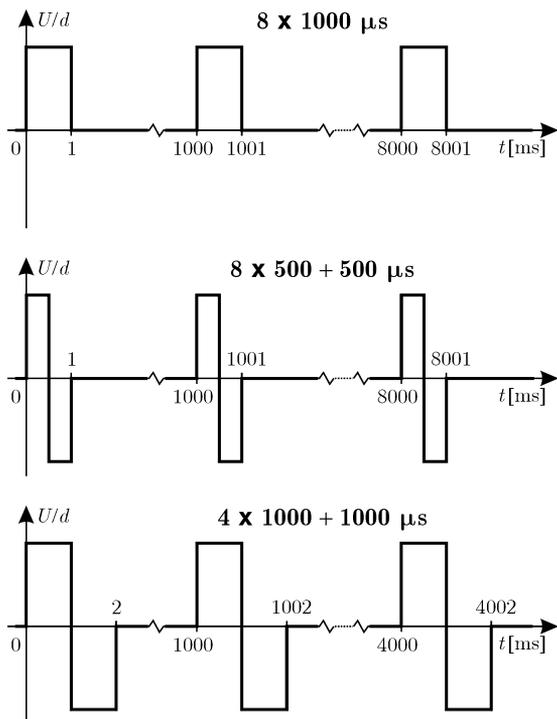


Figure 32

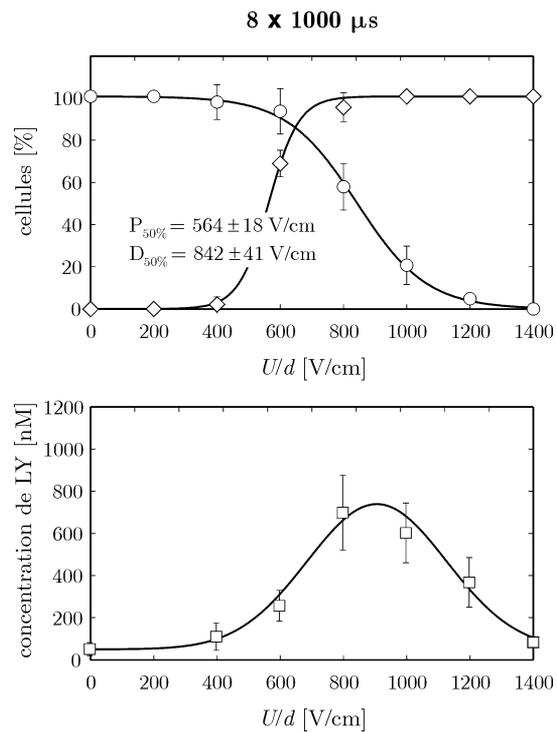


Figure 33

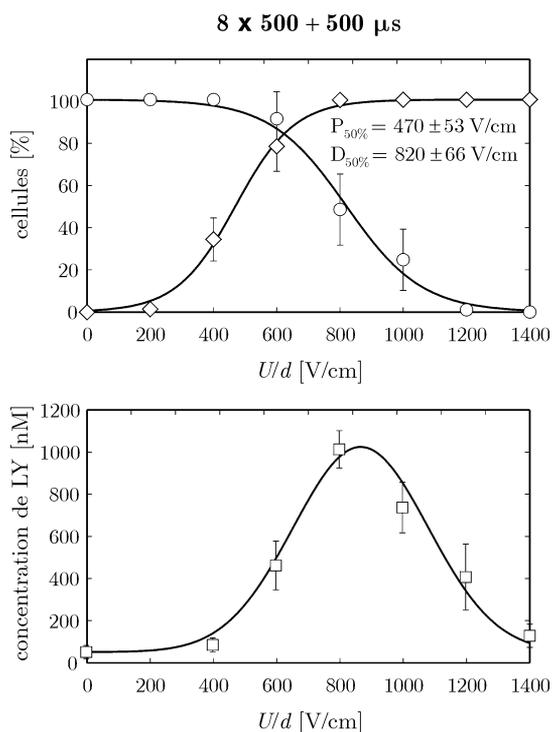


Figure 34

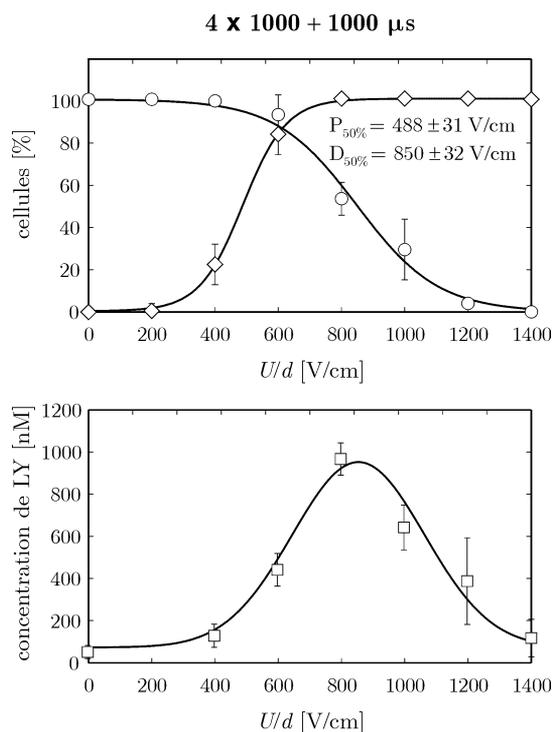


Figure 35

maximale) la concentration intracellulaire de LY était accrue de plus de 20% avec les impulsions biphasiques par rapport aux impulsions monophasiques ($p < 0.005$).

La comparaison des résultats obtenus par les deux trains biphasiques montre que l'efficacité de ces deux trains par rapport à l'électroperméabilisation, la survie, et l'internalisation ont été très similaires.

3.2.3 Temps de montée et temps de descente de l'impulsion

Pour l'analyse du rôle hypothétique du temps de montée et du temps de descente de l'impulsion dans l'électroperméabilisation, nous avons divisé les cellules en trois groupes. Pour tous les groupes, un train de huit impulsions trapézoïdales monophasiques symétriques a été appliqué, chaque impulsion ayant une durée de 1 ms au niveau de sa valeur maximale (i.e., de l'amplitude d'impulsion). Dans le premier groupe, le temps de montée et le temps de descente étaient de 2 μs , alors que dans le deuxième et troisième groupe ils étaient respectivement de 10 μs et de 100 μs (i.e., avec des durées totales respectivement de 1004 μs , 1020 μs et 1200 μs). Comme les Figs. 36 et 37 le montrent, la survie et la perméabilisation en fonction de l'amplitude des impulsions se sont révélées d'être très similaires dans chacun des trois groupes.

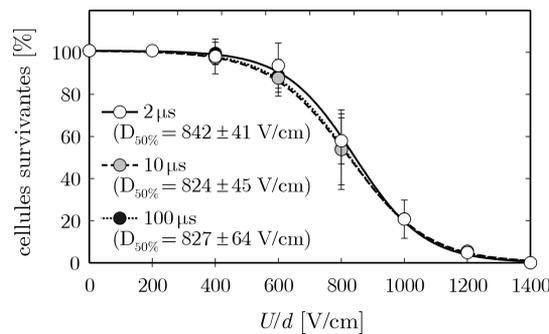


Figure 36

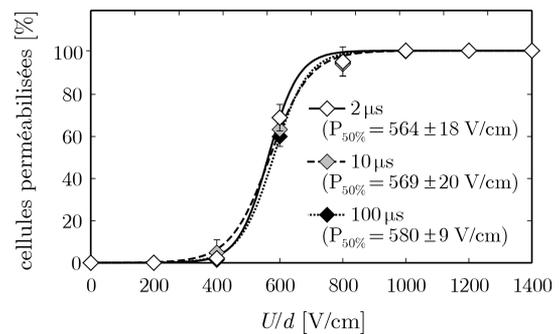


Figure 37

3.2.4 Forme de l'impulsion

Pour étudier l'effet de la forme de l'impulsion sur l'efficacité de l'électroperméabilisation, nous avons constitué, de nouveau, trois groupes de cellules. Un train de huit impulsions, chaque impulsion ayant une durée totale de 1 ms, a été utilisé. Dans le premier groupe, l'impulsion était une onde triangulaire biphasique symétrique d'une durée de 1 ms, ce qui correspond à la fréquence de l'onde triangulaire de 1 kHz (Fig. 38, en haut). Dans le deuxième groupe, l'impulsion était une onde sinusoïdale biphasique symétrique d'une durée de 1 ms, ce qui correspond à la fréquence de l'onde sinusoïdale de 1 kHz (Fig. 38, au milieu). Dans le troisième groupe, chaque impulsion était composée de dix ondes sinusoïdales continues, la durée totale de l'impulsion étant de 1 ms, ce qui correspond à la fréquence de l'ondulation sinusoïdale de 10 kHz (Fig. 38, en bas). Les Figs. 39 et 40 montrent la survie et la perméabilisation en fonction de l'amplitude des impulsions pour ces trois groupes.

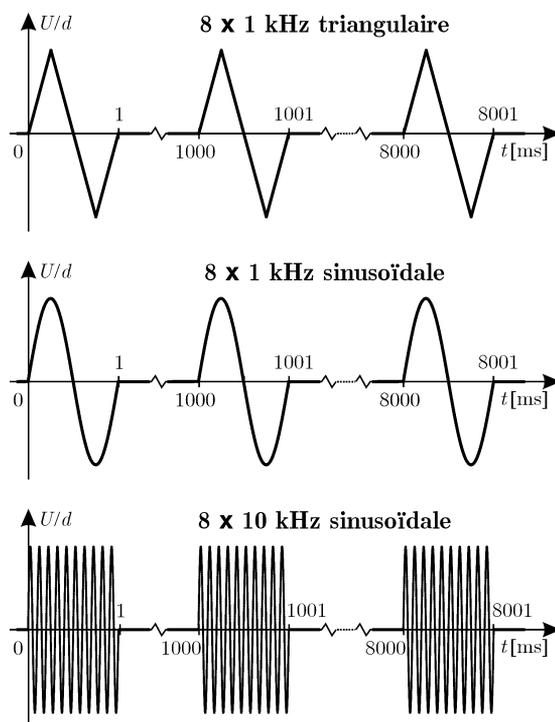


Figure 38

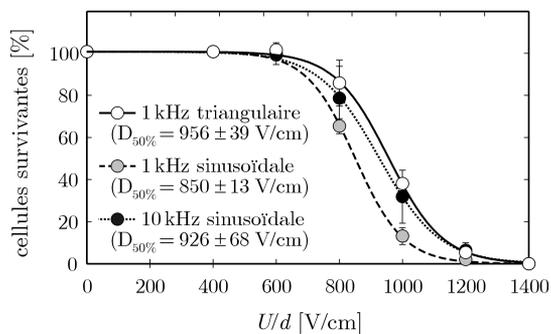


Figure 39

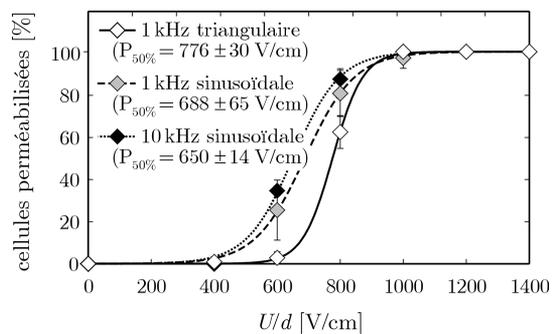


Figure 40

CHAPITRE 4

Discussion

4.1 IMPLICATIONS DES CALCULS THÉORIQUES

Dans la Section 1.2.2, nous avons discuté les mérites et les limitations de la théorie classique du voltage transmembranaire induit. Dans les Sections 2.1 à 2.4, nous avons développé les outils théoriques qui permettent d'analyser le voltage transmembranaire induit dans certaines situations qui ne peuvent pas être abordées correctement par la théorie classique. Dans cette section, nous définissons ces situations et nous élaborons davantage les implications des résultats obtenus à l'aide des méthodes théoriques développées.

4.1.1 Les rôles de la conductivité du milieu et de la durée d'impulsion

Comme l'analyse dans la Section 2.1 le montre, pour des cellules en suspension dans des milieux avec une conductivité électrique supérieure à 0.01 S/m, le voltage transmembranaire induit calculé par l'équation statique de Schwan (Section 1.2.2.1) diffère au maximum de quelques pour cents par rapport à l'équation qui prend en considération la conductivité non nulle de la membrane (Section 2.1, eq. 2 dans l'Article 1). Aussi, pour des milieux avec une conductivité au-dessus de 0.01 S/m, la constante de temps de l'induction est toujours inférieure à 10 μ s. Par conséquent, pour les conditions expérimentales dans lesquelles l'électroperméabilisation est typiquement exécutée,¹ les prévisions données par l'équation statique de Schwan sont suffisamment précises pour tous les objectifs pratiques.

Tandis que l'équation statique de Schwan est ainsi valide pour l'évaluation du voltage transmembranaire induit au cours de l'électroperméabilisation, elle n'est pas applicable aux expériences exécutées dans des milieux de basse conductivité, en particulier lors des expériences d'électrorotation et de diélectrophorèse. Les milieux typiquement utilisés pour ces expériences ont des conductivités de 0.005 à 0.05 S/m (Fuhr et al., 1986; Gascoyne et al., 1995), et comme ces expériences utilisent des fréquences dans la

¹ Ceci s'applique à l'électroperméabilisation exécutée dans les milieux "physiologiques", pour lesquels la conductivité est dans la gamme de 1.2 à 1.8 S/m, aussi bien que dans des milieux tamponnés avec des conductivités typiques dans la gamme 0.1-0.3 S/m, telles que, par exemple, le milieu employé par Teissié et ses collaborateurs (Rols et Teissié, 1990a; Rols et Teissié, 1993; Rols et Teissié, 1998a). Néanmoins, il ne s'applique pas à certaines des méthodes moins typiques d'électroperméabilisation, telles que la méthode employant les impulsions d'une durée de quelques dizaines de nanosecondes (Schoenbach et al., 1997).

gamme du MHz, la durée pendant laquelle le champ électrique maintient sa polarité est plus courte que 1 μ s. Pour ces cas, le modèle présenté dans la Section 2.1 (eqs. 2 et 3 dans l'Article 1) donne des évaluations précises pour les fréquences jusqu'à quelques dizaines de MHz. Pour des calculs valides aux fréquences jusqu'à quelques centaines de MHz, on doit employer le modèle de deuxième ordre dérivé dans les Sections 2.2 et 2.3. Il a également été montré que le facteur 3/2 dans l'équation de Schwan (Section 1.2.2.1) est seulement valide pour des suspensions très peu concentrées en cellules. Si les cellules représentent une fraction significative du volume de la suspension, ce facteur diminue avec l'augmentation de la densité de cellules, atteignant une valeur limite de 1 pour une suspension dans laquelle les cellules se touchent. En outre, avec des suspensions denses, la distribution cosinusoidale du voltage transmembranaire induit sur la surface de la membrane cesse également d'être valide (Susil et al., 1998).

4.1.2 Le rôle de la forme de l'impulsion

Dans la Section 1.3.1.4. nous avons brièvement discuté les publications qui affirment l'amélioration de l'efficacité de l'électroporabilisation en utilisant des impulsions de forme atypique, telles que des impulsions rectangulaires biphasiques (Tovar et Tung, 1991), des impulsions rectangulaires modulées par des ondes sinusoïdales (Chang, 1989; Chang et al., 1991) ou des impulsions "pointues" d'une durée de quelques dizaines de nanosecondes (Schoenbach et al., 1997). Ces rapports demandent une explication théorique, et dans les lignes suivantes nous considérons ces résultats à la lumière de la théorie de l'induction du voltage transmembranaire.

4.1.2.1 Impulsions biphasiques

L'avantage des impulsions rectangulaires biphasiques symétriques par rapport aux impulsions monophasiques de durée et d'amplitude identiques devient évident si nous généralisons l'analyse de l'aire électroporabilisée de la membrane (voir l'Insert 9 dans la Section 1.3.3.1) au cas du voltage transmembranaire de repos non nul.

Pour cette dérivation, nous maintenons les hypothèses (i) que les cellules sont sphériques, et (ii) que l'électroporabilisation se produit à tous les endroits où une certaine valeur critique du voltage transmembranaire, U_c , est dépassée. Soit encore R le rayon des cellules, S_p l'aire électroporabilisée de la membrane, U_{TR} le voltage transmembranaire de repos, U_{TI} le voltage transmembranaire induit, et U_{TI0} la valeur maximale d' U_{TI} . Pour $U_{TR} \neq 0$, l'équation (2) dans la Section 1.3.3.1 est remplacée par

$$S_p = 2\pi R^2 \begin{cases} 0, & U_{TI0} + |U_{TR}| < U_c \\ 1 - U_c / (U_{TI0} + |U_{TR}|), & U_{TI0} - |U_{TR}| < U_c \leq U_{TI0} + |U_{TR}| \\ 2 - U_c / (U_{TI0} + |U_{TR}|) - U_c / (U_{TI0} - |U_{TR}|), & U_c \leq U_{TI0} - |U_{TR}| \end{cases}$$

pour des impulsions monophasiques,

et par

$$S_p = 4\pi R^2 \begin{cases} 0, & U_{T10} + |U_{TR}| < U_c \\ 1 - U_c / (U_{T10} + |U_{TR}|), & U_{T10} + |U_{TR}| \geq U_c \end{cases}$$

pour des impulsions biphasiques (voir l'Insert 10).

Ainsi, des impulsions monophasiques mènent à l'électroperméabilisation unilatérale si $U_{T10} + |U_{TR}|$ excède la valeur d' U_c , et à l'électroperméabilisation bilatérale seulement si en plus $U_{T10} - |U_{TR}|$ excède la valeur d' U_c . Par contre, avec des impulsions biphasiques, à toutes les amplitudes qui mènent à l'électroperméabilisation, celle-ci est bilatérale. De ce fait, une plus grande aire perméabilisée est provoquée par des impulsions biphasiques par rapport aux impulsions monophasiques de même amplitude.

La Fig. 41 montre la fraction de l'aire membranaire où le voltage transmembranaire dépasse la valeur-seuil de l'électroperméabilisation, en fonction de l'amplitude d'impulsion, pour une impulsion biphasique (la ligne continue), et pour une impulsion monophasique (la ligne à tirets), à $U_c = 250$ mV, $U_{TR} = -60$ mV et $R = 10$ μ m. L'insertion dans la figure

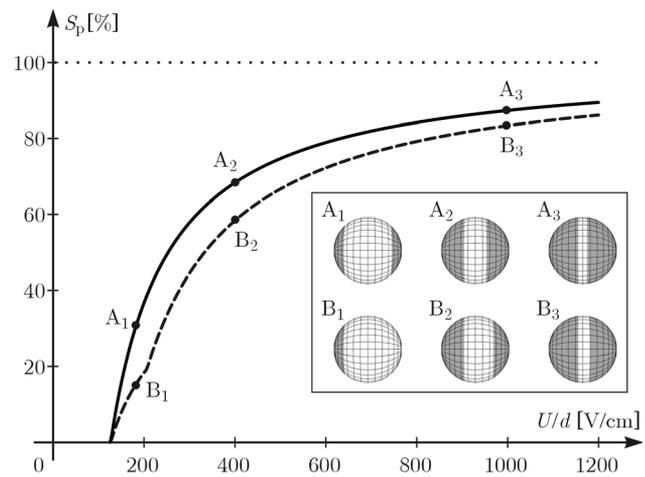


Figure 41

Insert 10: L'aire de la membrane où le voltage transmembranaire dépasse la valeur-seuil U_c (à $U_{TR} \neq 0$)

Dans la Section 1.3.3.1 (Insert 9), nous avons dérivé l'expression qui donne l'aire électroperméabilisée de la membrane,

$$S_p = 4\pi R^2 (1 - U_c / U_{T10}), \text{ pour } U_{T10} \geq U_c, \\ \text{et } S_p = 0 \text{ autrement.}$$

Si un voltage de repos, U_{TR} , est aussi présent sur la membrane, le voltage transmembranaire total diminue à un pôle de la cellule, et augmente par la même quantité au pôle opposé. Ainsi les deux pôles sont électroperméabilisés d'une manière asymétrique, et on a

$$S_p = 0, \text{ pour } U_{T10} + |U_{TR}| < U_c, \\ S_p = 2\pi R^2 (1 - U_c / (U_{T10} + |U_{TR}|)), \text{ pour } U_{T10} - |U_{TR}| < U_c \leq U_{T10} + |U_{TR}|, \text{ et} \\ S_p = 2\pi R^2 (1 - U_c / (U_{T10} + |U_{TR}|)) + 2\pi R^2 (1 - U_c / (U_{T10} - |U_{TR}|)) \\ = 2\pi R^2 (2 - U_c / (U_{T10} + |U_{TR}|) - U_c / (U_{T10} - |U_{TR}|)), \text{ pour } U_c \leq U_{T10} - |U_{TR}|.$$

Si pendant la durée de l'impulsion électrique sa polarité est renversée, la même valeur maximale du voltage transmembranaire se produit sur les deux pôles de la cellule. Ainsi les deux pôles sont électroperméabilisés de la même manière et la symétrie est regagnée, ce qui mène à une situation plus simple, où

$$S_p = 0, \text{ pour } U_{T10} + |U_{TR}| < U_c, \text{ et} \\ S_p = 2\pi R^2 (1 - U_c / (U_{T10} + |U_{TR}|)) + 2\pi R^2 (1 - U_c / (U_{T10} + |U_{TR}|)) \\ = 4\pi R^2 (1 - U_c / (U_{T10} + |U_{TR}|)), \text{ pour } U_{T10} + |U_{TR}| \geq U_c.$$

montre les régions électroperméabilisées de la membrane cellulaire. On voit qu'avec l'augmentation de l'amplitude des impulsions, la différence entre les aires membranaires perméabilisées par des impulsions biphasiques et par des impulsions monophasiques devient de plus en plus petite. Comme la mort cellulaire se produit pour des impulsions de plus haute amplitude que celle qui mène à l'électroperméabilisation, il est compréhensible qu'en comparant les effets des impulsions biphasiques et monophasiques, les différences entre les pourcentages de cellules perméabilisées seront plus grandes que celles entre les pourcentages de cellules survivantes. Les résultats présentés dans la Section 3.2.2 prouvent que c'est en effet le cas. Dans la Section 4.2, nous discuterons les implications de ceci un peu plus en détail.

4.1.2.2 Impulsions rectangulaires modulées et impulsions "ultracourtes"

Les publications de Chang et Schoenbach et leurs collaborateurs ont provoqué de l'intérêt pour l'étude des impulsions de durée très courte et des impulsions à haute fréquence² comme des outils possibles pour l'électroperméabilisation des cellules. Néanmoins, il y a aussi des arguments qui suggèrent de traiter ces résultats avec un certain degré d'attention.

Alors que dix années se sont écoulées depuis les rapports de Chang et de ses collaborateurs sur l'effet amélioré obtenu avec des impulsions rectangulaires modulées par des ondes sinusoïdales, à cette date aucun autre groupe n'a publié une nouvelle comparaison entre des impulsions modulées et non modulées de même forme fondamentale.³ De même, aucun autre auteur n'a encore rendu compte des effets réalisés par des impulsions d'une durée de quelques dizaines de nanosecondes, similaires à celles utilisées par Schoenbach et ses collaborateurs.

Pour autant, l'analyse de la dynamique du processus d'induction (Sections 1.2.2.2, 2.2 et 2.3) prouve que les composantes d'une impulsion qui sont beaucoup plus rapides que la constante de temps de la membrane⁴ ne jouent pas un rôle important dans l'induction du voltage transmembranaire. Les impulsions ayant des durées de quelques dizaines de nanosecondes appartiennent certainement à cette catégorie, et il est ainsi difficile de fournir une explication de ces effets rapportés sur la base du processus d'induction.

Chang a proposé que l'effet rapporté de la modulation à haute fréquence pourrait être expliqué par l'existence d'effets résonants dans la membrane pour des fréquences de quelques dizaines de kHz (Chang, 1989; Chang et al., 1991). Avec une impulsion

² Dans ce contexte, nous employons le terme "à haute fréquence" pour les fréquence de quelques dizaines de kHz, i.e., la gamme utilisée par Chang et ses collaborateurs.

³ Il y a un rapport récent dans lequel les impulsions rectangulaires modulées sont comparés aux impulsions exponentielles non modulées (Zald et al., 2000), mais il est difficile de juger sur les effets introduits par la modulation sans connaître l'effet d'une impulsion non modulée de même forme fondamentale. Le plus incertain est la comparaison des effets pour une amplitude d'impulsion donnée, parce qu'une impulsion exponentielle a cette amplitude seulement à l'instant de son début, alors qu'une impulsion rectangulaire maintient son amplitude pendant toute sa durée.

⁴ En utilisant un jargon plus technique, ceci s'applique à toutes les impulsions pour lesquelles le spectre de fréquence est dominé par des fréquences supérieures à 1 MHz.

contenant une fréquence proche de la fréquence de résonance, une faible composante à haute fréquence du voltage transmembranaire induit par l'impulsion pourrait mener à un phénomène secondaire beaucoup plus prononcé, tel qu'une ondulation mécanique de la membrane. Pour étudier la possibilité d'existence de tels mécanismes non-linéaires, nous avons conçu et exécuté une série d'expériences dans lesquelles nous avons comparé les efficacités des impulsions ayant des temps de montée et de descente de 2 μ s à 100 μ s, qui couvrent la gamme des fréquences entre quelques kHz jusqu'à quelques centaines de kHz. Comme les résultats présentés dans la Section 3.2.3 le montrent, aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les effets des impulsions ayant des temps de montée et de descente dans cette gamme. Cependant, comme nous le discutons plus en détail dans la Section 4.2.3, ceci n'élimine pas la possibilité de la présence d'une bande de fréquences très étroite dans laquelle de tels effets pourraient se produire.

4.1.3 Le rôle de la forme des cellules

Dans la Section 2.4, nous avons dérivé les expressions qui décrivent le voltage transmembranaire induit sur les cellules sphéroïdales. L'analyse de ces expressions prouve que pour les cellules qui dévient de manière significative de la forme sphérique, les résultats basés sur l'équation de Schwan sont incorrects. La généralisation de l'équation de Schwan qui s'applique à toutes les cellules sphéroïdales (Section 2.4, l'Article 4, eq. 7) élargit la gamme des cellules pour lesquelles une évaluation analytique du voltage transmembranaire induit est possible pour toutes les cellules dont la forme peut être rapprochée de celle d'un sphéroïde. En utilisant la formule dérivée dans la Section 2.4, on peut évaluer le voltage transmembranaire induit sur des cellules de formes très différentes, telles que des érythrocytes aplatis ou des bacilles allongés.

4.2 RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX ET LEUR LIAISON AVEC LES FONDEMENTS THÉORIQUES

Le but principal de cette thèse était d'étudier les possibilités d'amélioration de l'efficacité de l'électroporation par le choix de la forme d'impulsion, avec une analyse limitée à la situation *in vitro*, i.e., à des études sur des suspensions de cellules. Comme le montre la description courte des résultats expérimentaux dans la Section 3, chaque groupe d'expériences a été conçu pour analyser un aspect particulier de la dynamique des impulsions:

- La comparaison de l'efficacité des trains d'impulsions rectangulaires monophasiques de différentes durées a eu pour but principal d'établir le protocole expérimental. Elle a également servi de vérification de la méthode nouvellement développée d'évaluation de l'électroporation par l'exposition des cellules aux impulsions électriques en présence de bléomycine (Section 3.1.2).

- La comparaison de l'efficacité entre les impulsions rectangulaires monophasiques et biphasiques symétriques a été effectuée pour vérifier expérimentalement les arguments théoriques en faveur des impulsions biphasiques.
- La comparaison de l'efficacité des impulsions trapézoïdales ayant des temps de montée et de descente différents a visé l'étude des effets hypothétiques de résonance pour des fréquences dans la gamme de quelques dizaines de kHz. Le paramètre le plus simple de la dynamique d'impulsion est sa dérivée de premier ordre par rapport au temps – la vitesse de variation de l'intensité d'impulsion (moins formellement, sa "pente"). Pendant leur montée et leur descente, des impulsions trapézoïdales se caractérisent par la valeur constante de cette dérivée, et en comparant les efficacités des impulsions trapézoïdales de la même durée, mais avec des temps différents de montée et de descente, nous nous sommes concentré entièrement sur le rôle éventuel de la vitesse de variation de l'intensité d'impulsion.
- La comparaison de l'efficacité des impulsions ayant une forme différente (ondes sinusoïdales, ondes triangulaires) a été effectuée pour une exploration assez empirique des différences possibles de l'électroperméabilisation produite par ces impulsions.

Dans les paragraphes suivants, nous passons en revue les résultats expérimentaux à la lumière des fondements théoriques présentés et développés dans ce travail de thèse, essayant, dans la mesure du possible, de fournir une explication des effets observés.

4.2.1 Le rôle de l'amplitude, de la durée, et du nombre d'impulsions

Les résultats présentés dans la Section 3.2.1 sont en accord étroit avec les effets établis de l'amplitude, de la durée, et du nombre d'impulsions sur l'efficacité de l'électroperméabilisation (voir la Section 1.3.1.4). Spécifiquement, ils confirment que

- le pourcentage des cellules perméabilisées en fonction de l'amplitude d'impulsion a la forme d'une courbe sigmoïdale croissante avec l'augmentation d'amplitude, et le pourcentage des cellules survivantes en fonction de l'amplitude d'impulsion a la forme d'une courbe sigmoïdale décroissante;
- le pourcentage des cellules perméabilisées à une amplitude d'impulsion donnée augmente avec l'augmentation de la durée et du nombre d'impulsions;
- le pourcentage des cellules survivantes à une amplitude d'impulsion donnée diminue avec l'augmentation de la durée et du nombre d'impulsions.

Comme les Figs. 29 et 30 en témoignent, les pourcentages des cellules survivant à huit impulsions de $100\ \mu\text{s}$ et à une impulsion de $1\ \text{ms}$ sont très similaires, et il en est de même pour les pourcentages des cellules perméabilisées. Néanmoins, les quantités moyennes de LY internalisé par cellule qui sont obtenues par ces deux combinaisons d'impulsions sont très différentes. Tandis que le produit entre la durée T et le nombre des impulsions N est plus petit avec $8 \times 100\ \mu\text{s} = 0.8\ \text{ms}$ qu'avec $1 \times 1\ \text{ms} = 1\ \text{ms}$, la

quantité moyenne de LY internalisé par cellule est beaucoup plus importante avec la première combinaison qu'avec la deuxième. En outre, avec $8 \times 100 \mu\text{s}$ et avec $8 \times 1 \text{ ms}$, un pic distinct d'internalisation est obtenu, alors qu'aucun pic de ce type n'est détectable avec une impulsion simple de $100 \mu\text{s}$ ou de 1 ms , au moins dans la marge des amplitudes disponibles pour les impulsions.¹

Ainsi, nous avons établi que le produit $N \times T$ détermine en effet le pourcentage des cellules qui survivent au traitement et aussi le pourcentage des cellules électroperméabilisées, mais qu'une évaluation de l'internalisation en utilisant ce produit est moins certaine. Pour l'internalisation, le nombre d'impulsions semble jouer un rôle plus crucial que leur durée.

4.2.2 L'efficacité augmentée des impulsions biphasiques

Comme les résultats présentés dans la Section 3.2.2 l'indiquent, avec des impulsions biphasiques l'amplitude nécessaire pour la perméabilisation de 50% des cellules est approximativement 20% inférieure à celle nécessaire avec des impulsions monophasiques. Les impulsions biphasiques conduisent également à une nette augmentation de l'internalisation de LY. Par contre, aucune différence n'est détectée entre les amplitudes menant à la mort de 50% des cellules. Tous ces résultats peuvent être expliqués, au moins qualitativement, par les considérations de l'aire électroperméabilisée de la membrane, qui sont présentés dans la Section 4.1.2.1.

Comme la différence entre les aires perméabilisées obtenues par des impulsions monophasiques et biphasiques est plus prononcée aux amplitudes d'impulsion inférieures, en utilisant des impulsions biphasiques la perméabilisation est affectée beaucoup plus intensément que la survie. Tandis qu'avec des cellules d'une forme sphérique idéale, et avec une membrane parfaitement homogène, le seuil de perméabilisation devrait être le même avec des impulsions monophasiques et biphasiques (voir la Fig. 41), en réalité les cellules ne sont pas entièrement sphériques, et la membrane n'est pas entièrement homogène. Ainsi, pour une certaine fraction des cellules en suspension, les impulsions biphasiques d'une amplitude donnée induisent l'électroperméabilisation, alors qu'avec les impulsions monophasiques de la même amplitude cet effet ne se produira pas. Un exemple d'un tel effet est montré schématiquement dans la Fig. 42.

Une plus grande aire perméabilisée de la membrane produite par des impulsions biphasiques explique également l'internalisation plus importante observée avec des impulsions

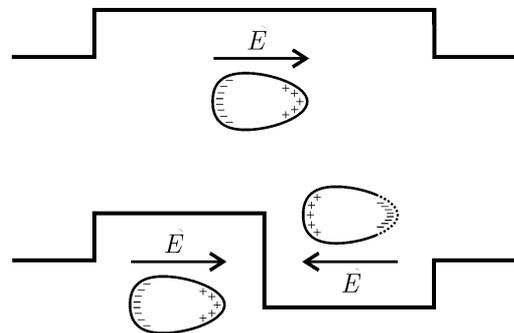


Figure 42

¹ Un tel pic est vraisemblablement expliqué par le fait que l'augmentation de l'intensité de la perméabilisation est nécessairement couplée à une diminution des cellules qui survivent à une impulsion si intense.

biphasiques par rapport aux impulsions monophasiques – même pour des cellules parfaitement sphériques. De plus, comme prévu théoriquement, cette différence est moins prononcée pour des amplitudes d'impulsion plus élevées.

Il y a également un troisième argument théorique en faveur des impulsions biphasiques par rapport aux impulsions monophasiques qui n'a pas été mentionné jusqu'ici. Les impulsions biphasiques délivrent aux électrodes une charge électrique équilibrée, et donc il est raisonnable de pronostiquer que leurs effets électrolytiques seront beaucoup moins prononcés que ceux des impulsions monophasiques de durée et d'amplitude identiques. Pour des impulsions qui équilibrent les charges et avec des fréquences au-dessus de 1 kHz, les effets électrolytiques disparaissent pratiquement (Compton et Sanders, 1996; Fisher, 1998), et par conséquent, des impulsions biphasiques devraient réduire l'érosion électrolytique des électrodes. Ceci diminuerait également la contamination de la suspension avec des ions métalliques libérés par les électrodes, réduisant la possibilité d'artefacts expérimentaux provoqués par les effets de ces ions sur les cellules. En utilisant des cuvettes en aluminium, Loomis-Husselbee et ses collaborateurs ont rapporté que la concentration des ions d'aluminium libérés par des impulsions exponentielles était suffisante pour affecter de manière significative certaines réactions biochimiques impliquant des phosphatidyl inositols (Loomis-Husselbee et al., 1991). Basés sur les effets observés, les auteurs de cette étude ont conclu que la contamination de la suspension avec des ions d'aluminium peut représenter un problème sérieux dans les études dans lesquelles l'électroperméabilisation est effectuée dans des cuvettes en aluminium.

En résumé, nos résultats expérimentaux prouvent que la situation résultant de l'utilisation d'impulsions rectangulaires biphasiques est meilleure que celle résultant de l'utilisation d'impulsions monophasiques de durée et d'amplitude identiques. Tandis que le pourcentage de cellules perméabilisées et l'internalisation moyenne par cellule sont augmentés, la survie reste pratiquement inchangée. En outre, les impulsions biphasiques délivrent une charge électrique équilibrée, et ainsi la contamination de la suspension avec des ions métalliques libérés par les électrodes est diminuée. Ces arguments sont insuffisants pour des conclusions définitives, mais si des résultats similaires sont également obtenus dans les tissus, il sera raisonnable de pronostiquer que les générateurs d'impulsions biphasiques pourraient en temps opportun être utilisés de manière beaucoup plus large, ou même prédominante, pour l'électroperméabilisation.

4.2.3 Le rôle du temps de montée et du temps de descente des impulsions

Les résultats expérimentaux présentés dans la Section 3.2.3 ne fournissent aucune évidence des effets de résonance sur lesquels quelques auteurs ont fait des hypothèses. En fait, les différences entre les courbes de perméabilisation, aussi bien qu'entre celles de survie, sont largement au-dessous de la signification statistique. Ceci implique que le

temps de montée et le temps de descente de l'impulsion ne jouent pas un rôle significatif dans l'électroperméabilisation.²

Tandis que nos expériences ne confirment pas l'existence des phénomènes de résonance dans la membrane dans la gamme des fréquences de quelques dizaines de kHz, un ensemble beaucoup plus grand des temps de montée et de descente devrait être exploré afin de permettre de réfuter avec certitude l'hypothèse d'une telle existence. Si une fréquence de résonance existe dans la membrane, mais qu'elle affecte seulement une bande de fréquences très étroite, elle pourrait ne pas être détecté par nos expériences, car nous avons utilisé seulement trois temps de montée et de descente différents.

En dépit de la similarité mutuelle des résultats obtenus par des impulsions avec des temps différents de montée et de descente, il serait intéressant d'effectuer également la comparaison de l'internalisation des molécules produite par ces impulsions. De telles expériences sont programmées dans un futur proche.

4.2.4 Le rôle de la forme d'impulsion en général

Les résultats de l'électroperméabilisation obtenus avec les ondes sinusoïdales et avec les ondes triangulaires (Section 3.2.4) apportent aussi des informations sur le rôle des paramètres dynamiques des impulsions.

La comparaison entre les courbes de perméabilisation³ obtenues par l'onde sinusoïdale de 1 kHz et par l'onde triangulaire de 1 kHz montre que l'onde sinusoïdale produit l'électroperméabilisation pour des amplitudes plus faibles que l'onde triangulaire. Ceci suggère que la durée pour laquelle l'impulsion dépasse une certaine valeur critique joue un rôle très important dans l'électroperméabilisation. Une telle conclusion résulte du fait que pour n'importe quelle amplitude d'impulsion et pour n'importe quelle valeur de l'intensité critique, l'onde sinusoïdale de 1 kHz dépasse cette valeur critique pour une plus longue durée que l'onde triangulaire de la même fréquence. Pour illustrer cela, dans la Fig. 43 nous montrons ces deux impulsions, avec les lignes horizontales pointillées indiquant une valeur possible de l'intensité critique.

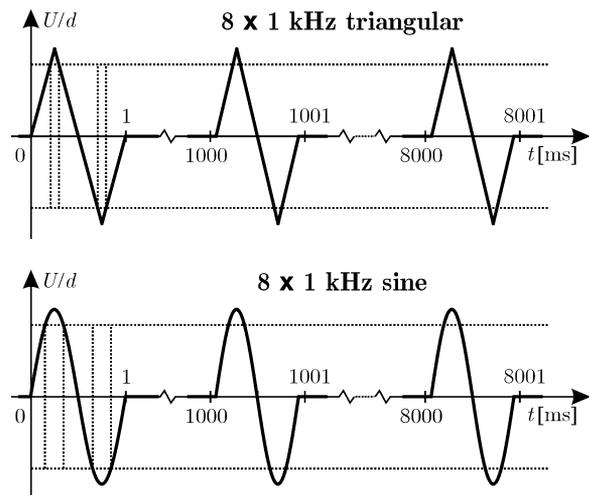


Figure 43

² Comme nous avons seulement étudié des impulsions d'une durée de 1 ms, nous ne pouvons pas exclure un effet possible dans le cas d'impulsions qui sont trop courtes pour atteindre le plateau du voltage transmembranaire induit.

³ La différence entre les données correspondantes de la survie n'était pas statistiquement significative (voir la Fig. 39 et les déviations de $P_{50\%}$ y figurant), et par conséquent nous n'en discuterons pas.

La comparaison entre les effets d'une onde sinusoïdale de 1 kHz et de dix ondes sinusoïdales de 10 kHz, les deux formes ayant la même durée totale, implique qu'il y a d'autres paramètres importants en plus de la durée de l'intensité d'impulsion au-dessus de la valeur critique. En particulier, pour n'importe quelle amplitude d'impulsion et pour n'importe quelle valeur de l'intensité critique, la durée totale pour laquelle ces deux impulsions excèdent cette intensité est évidemment identique. Néanmoins, pour une onde sinusoïdale de 1 kHz la mort de cellules se produit pour des amplitudes d'impulsion inférieures par rapport à dix ondes sinusoïdales de 10 kHz (voir la Fig. 39).⁴ Pour comprendre cela, nous nous rappellerons d'une caractéristique importante de l'électroperméabilisation que nous avons discuté dans la description d'évidence expérimentale (Section 1.3.1), à savoir (i) que l'électroperméabilisation est initialisée en moins d'une microseconde après le début de l'impulsion (l'effondrement du voltage transmembranaire, voir la Section 1.3.1.2), mais (ii) qu'elle n'atteint sa pleine ampleur qu'après quelques dizaines de microsecondes (la conductivité accrue de plus de trois ordres de grandeur, voir la Section 1.3.1.1). Par conséquent, il est raisonnable de prévoir que pour les impulsions courtes, non seulement la durée totale, mais aussi la durée sans interruption de l'intensité au-dessus de la valeur critique puisse jouer un rôle important dans l'efficacité d'électroperméabilisation.

⁴ La différence entre les données correspondantes de la perméabilisation n'était pas statistiquement significative (voir la Fig. 40 et les déviations de $P_{50\%}$ y figurant), et par conséquent nous n'en discuterons pas.

CHAPITRE 5

Conclusions

En conclusion, nous passons en revue brièvement les contributions et les résultats les plus importants du travail théorique et expérimental effectué pendant le déroulement de ma thèse:

- Pour les expériences exécutées dans des milieux non physiologiques, il est important de déterminer la conductivité du milieu pour une évaluation fiable du voltage transmembranaire induit. Si cette conductivité dépasse 0.01 S/m, l'évaluation peut être effectuée en utilisant l'équation de Schwan, alors que dans le cas opposé une évaluation plus précise peut être obtenue en utilisant l'expression plus générale que nous avons dérivé (Section 2.1, Article 1, eqs. 2 et 3).
- Pour des expériences exécutées sur des cellules de forme non-sphérique, à condition que la forme des cellules puisse être rapprochée de celle d'un sphéroïde, le voltage transmembranaire induit peut être calculé par la généralisation de l'équation de Schwan aux cellules sphéroïdales que nous avons dérivé (Section 2.4, Article 4, eq. 7).
- Nous avons développé une nouvelle méthode de détermination du pourcentage de cellules électroperméabilisées (Section 3.1.5, Article 5). Cette méthode est basée sur la bléomycine, un agent cytotoxique qui ne peut pas diffuser à travers une membrane plasmique intacte et qui mène donc à la mort sélective des cellules perméabilisées. La méthode utilisant la bléomycine élimine plusieurs des désavantages des autres méthodes, telles qu'un choix arbitraire de l'intensité minimale de fluorescence pour la discrimination entre les cellules perméabilisées et les cellules non perméabilisées, l'incapacité de détecter les cellules désagrégées en raison de l'électroperméabilisation, et la fausse détection des fantômes cellulaires exempts de fluorescence en raison de la perte de l'ADN provoquée par l'électroperméabilisation. La méthode utilisant la bléomycine est aussi beaucoup moins coûteuse par rapport à la méthode la plus communément utilisée, celle basée sur l'iodure de propidium, qui exige d'utiliser un cytomètre de flux.
- En étudiant l'électroperméabilisation avec des impulsions rectangulaires monophasiques, nous avons montré que la perméabilisation augmente et que la survie diminue avec l'augmentation de la durée et du nombre des impulsions. Ce résultat est en accord avec les connaissances existantes (Rols et Teissié, 1990a; Rols et

Teissié, 1998a). Pour l'internalisation des petites molécules exogènes, nous avons montré que le nombre d'impulsions joue un rôle plus important que la durée d'impulsion.

- En étudiant l'électroperméabilisation avec des impulsions rectangulaires biphasiques symétriques, nous avons constaté que la perméabilisation et l'internalisation des petites molécules exogènes provoquées par les impulsions biphasiques sont augmentées par rapport aux impulsions monophasiques de durée et d'amplitude identiques. Par contre, la survie obtenue avec des impulsions biphasiques reste très proche de celle obtenue par des impulsions monophasiques. Au moins qualitativement, ces effets peuvent être expliqués sur la base de l'asymétrie du voltage transmembranaire total en raison du voltage transmembranaire de repos. Les impulsions biphasiques compensent cette asymétrie, et augmentent de ce fait la probabilité d'une électroperméabilisation bilatérale (voir l'Insert 10 et la Fig. 41), et vraisemblablement aussi la probabilité de l'électroperméabilisation des cellules non-sphériques (Fig. 42). En plus, en raison de l'équilibre de la charge délivrée par les impulsions biphasiques symétriques, il est raisonnable de prévoir que les impulsions biphasiques conduisent à une contamination électrolytique nettement inférieure que celle provoquée par des impulsions monophasiques de durée et d'amplitude identiques.
- Nous n'avons trouvé aucune influence des temps de montée et de descente des impulsions rectangulaires monophasiques dans l'efficacité de l'électroperméabilisation. Ces données expérimentales n'appuient pas l'hypothèse de l'existence d'effets de résonance dans la membrane dans la gamme de quelques dizaines de kHz, qui aurait pu expliquer l'efficacité accrue rapportée par Chang et ses collaborateurs (Chang, 1989; Chang et al., 1991). En même temps, nos expériences couvrent la gamme de ces fréquences de manière trop peu dense pour offrir une démonstration évidente permettant de réfuter complètement des effets hypothétiques de résonance.
- Nos résultats expérimentaux en utilisant des formes d'impulsion différentes impliquent qu'un des paramètres les plus importants pour l'électroperméabilisation est la durée sans interruption pendant laquelle l'impulsion dépasse une certaine intensité critique. À cet égard, les impulsions rectangulaires sont plus efficaces que n'importe quelle autre forme, et il est ainsi incertain que l'électroperméabilisation puisse être améliorée en utilisant des impulsions non rectangulaires. Ceci est également soutenu par le fait que pour une perméabilisation par les ondes sinusoïdales ou triangulaires, les amplitudes des impulsions sont clairement supérieures à celles nécessaires avec des impulsions rectangulaires (cf. Figs. 33, 34, 35, 39 et 40, et aussi les valeurs de $P_{50\%}$ et $D_{50\%}$ données dans ces figures).

Enfin, plusieurs directives peuvent être données pour des études ultérieures:

- Une comparaison de la contamination électrolytique de la suspension de cellules produite par des impulsions rectangulaires biphasiques symétriques et par des impulsions monophasiques, suivie par une évaluation de la survie de cellules, et peut-être de certains processus biochimiques sous une telle contamination. Des électrodes d'acier inoxydable et des électrodes en aluminium devraient être examinées et comparées.
- Une comparaison de l'internalisation de LY *in vitro* obtenue par des impulsions ayant des temps différents de montée et de descente, ainsi que des durées différentes.
- Une comparaison de l'efficacité de l'électroperméabilisation *in vivo* obtenue par des impulsions rectangulaires monophasiques et biphasiques.

Références

1. Abidor IG, Arakelyan VB, Chernomordik LV, Chizmadzhev YA, Pastushenko VF, Tarasevich MR. 1979. Electric breakdown of bilayer membranes: I. The main experimental facts and their qualitative discussion. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 6: 37-52.
2. Afzelius B, Maunsbach AB. 1999. *Biomedical Electron Microscopy*. Academic Press, Etats-Unis d'Amérique.
3. Akiyama S, Hidaka K, Komiyama S, Kuwano M. 1979. Control of permeation of bleomycin A₂ by polyene antibiotics in cultured Chinese hamster cells. *Cancer Res.* 39: 5150-5154.
4. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. 1994. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, New York, Etats-Unis d'Amérique.
5. Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 1998. *Essential Cell Biology*. Garland Publishing, New York, Etats-Unis d'Amérique.
6. Alvarez O, Latorre R. 1978. Voltage-dependent capacitance in lipid bilayer made from monolayers. *Biophys. J.* 21: 1-17.
7. Arndt-Jovin DJ, Jovin TM. 1989. Fluorescence labeling and microscopy of DNA. *Methods Cell. Biol.* 30: 417-448.
8. Arnold WM, Schmutzler RK, Schmutzler AG, van der Ven H, Al-Hasani S, Krebs D, Zimmermann U. 1987. Electrorotation of mouse oocytes: single-cell measurements of zona-intact and zona-free cells and of the isolated zona pellucida. *Biochim. Biophys. Acta* 905: 454-464.
9. Arnold WM, Zimmermann U. 1988. Electro-rotation: development of a technique for dielectric measurements on individual cells and particles. *J. Electrostat.* 21: 151-191.
10. Asami K, Hanai T, Koizumi N. 1976. Dielectric properties of yeast cells. *J. Membr. Biol.* 28: 169-180.
11. Atwood HL, Mackay WA. 1989. *Essentials of Neurophysiology*. BC Decker, Toronto, Canada.
12. Babakov AV, Ermishkin LN. 1966. Influence of electric field on the capacity of phospholipid membranes. *Nature* 210: 953-955.
13. Bao S, Thrall BD, Miller DL. 1997. Transfection of a reporter plasmid into cultured cells by sonoporation in vitro. *Ultrasound Med. Biol.* 23: 953-959.
14. Bardy GH, Marchlinski FE, Sharma AD, Worley SJ, Luceri RM, Yee R, Halperin BD, Fellows CL, Ahern TS, Chilson DA, Packer DL, Wilber DJ, Mattioni TA, Reddy R, Kronmal RA, Lazzara R. 1996. Multicenter comparison of truncated biphasic shocks and standard damped sine wave monophasic shocks for transthoracic ventricular defibrillation. *Circulation* 94: 2507-2514.
15. Barnett A, Weaver JC. 1991. Electroporation: a unified, quantitative theory of reversible electrical breakdown and rupture. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 25: 163-182.

16. Benz R, Conti F. 1981. Reversible electrical breakdown of squid giant axon membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 645: 115-123.
17. Benz R, Janko K. 1976. Voltage-induced capacitance relaxation of lipid bilayer membranes. Effects of membrane composition. *Biochim. Biophys. Acta* 455: 721-738.
18. Benz R, Zimmermann U. 1980a. Relaxation studies on cell membranes and lipid bilayers in the high electric field range. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 7: 723-739.
19. Benz R, Zimmermann U. 1980b. Pulse-length dependence of the electrical breakdown in lipid bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 597: 637-642.
20. Benz R, Zimmermann U. 1981. The resealing process of lipid bilayers after reversible electrical breakdown. *Biochim. Biophys. Acta* 640: 169-178.
21. Benz R, Beckers F, Zimmermann U. 1979. Reversible electrical breakdown of lipid bilayer membranes: a charge-pulse relaxation study. *J. Membr. Biol.* 48: 181-204.
22. Bernhardt J, Pauly H. 1973. On the generation of potential differences across the membranes of ellipsoidal cells in an alternating electrical field. *Biophysik* 10: 89-98.
23. Biedler JL, Riehm H. 1970. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells *in vitro*. *Cancer Res.* 30: 1174-1184.
24. Bobinac Y, Khodyakov A, Mir LM, Rieder CL, Eddé B, Bornens M. 1998. Centriole disassembly *in vivo* and its effects on chromosome structure and function in vertebrate cells. *J. Cell Biol.* 143: 1575-1589.
25. Bonnafous JC, Dornand J, Mani JC. 1982. Alamethicin or detergent permeabilization of the cell membrane as a tool for adenylate cyclase determination. *Biochim. Biophys. Acta* 720: 235-241.
26. Boyle RT, Lieberman M. 1999. Permeabilization by streptolysin O reveals a role for calcium-dependent protein kinase c isoforms alpha and beta in the response of cultured cardiomyocytes to hyposmotic challenge. *Cell. Biol. Int.* 23: 685-693.
27. Bozzola JJ, Russell LD. 1998. *Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists*. Jones and Bartlett, New York, Etats-Unis d'Amérique.
28. Bradshaw JP, Bushby RJ, Giles CC, Saunders MR, Saxena A. 1997. The headgroup orientation of dimyristoylphosphatidylinositol-4-phosphate in mixed lipid bilayers: a neutron diffraction study. *Biochim. Biophys. Acta* 1329: 124-138
29. Bryant G, Wolfe J. 1987. Electromechanical stresses produced in the plasma membranes of suspended cells by applied electric fields. *J. Membrane Biol.* 96: 129-139.
30. Büchner R, Hefter GT, May PM. 1999. Dielectric relaxation of aqueous NaCl solutions. *J. Phys. Chem. A* 103: 1-9.
31. Chang DC. 1989. Cell poration and cell fusion using an oscillating electric field. *Biophys. J.* 56: 641-652.
32. Chang DC, Reese TS. 1990. Changes of membrane structure induced by electroporation as revealed by rapid-freezing electron microscopy. *Biophys. J.* 58: 1-12.
33. Chang DC, Gao PQ, Maxwell BL. 1991. High efficiency gene transfection by electroporation using a radio-frequency electric field. *Biochim. Biophys. Acta* 1092: 153-160.

34. Chang DC, Chassy BM, Saunders JA, Sowers AE. 1992. *Guide to Electroporation and Electrofusion*. Academic Press, San Diego, Etats-Unis d'Amérique.
35. Chernomordik LV, Abidor IG. 1980. The voltage-induced local defects in unmodified BLM. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 7: 617-623.
36. Chernomordik LV, Sukharev SI, Abidor IG, Chizmadzhev YA. 1982. The study of the BLM reversible electrical breakdown mechanism in the presence of UO_2^{2+} . *Bioelectrochem. Bioenerg.* 9: 149-155.
37. Churchill RV. 1972. *Operational Mathematics*. McGraw-Hill, New York, Etats-Unis d'Amérique.
38. Cole KS. 1972. *Membranes, Ions and Impulses*. University of California Press, Berkeley, Etats-Unis d'Amérique.
39. Compton RG, Sanders GHW. 1996. *Electrode Potentials*. Oxford University Press, Oxford, Grande-Bretagne.
40. Crowley JM. 1973. Electrical breakdown of bimolecular lipid membranes as an electro-mechanical instability. *Biophys. J.* 13: 711-724.
41. Cruzeiro-Hansson L, Ipsen JH, Mouritsen OG. 1989. Intrinsic molecules in lipid membranes change the lipid-domain interfacial area: cholesterol at domain interfaces. *Biochim. Biophys. Acta* 979: 166-176.
42. Cruzeiro-Hansson L, Mouritsen OG. 1988. Passive ion permeability of lipid membranes modelled via lipid-domain interfacial area. *Biochim. Biophys. Acta* 944: 63-72.
43. Čemažar M, Jarm T, Miklavčič D, Maček-Lebar A, Ihan A, Kopitar NA, Serša G. 1998. Effect of electric-field intensity on electropermeabilization and electrosensitivity of various tumor-cell lines in vitro. *Electro. Magnetobiol.* 17: 261-270.
44. Delius M, Adams G. 1999. Shock wave permeabilization with ribosome inactivating proteins: a new approach to tumor therapy. *Cancer Res.* 59: 5227-5232.
45. Denizot F, Lang R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* 89: 271-277.
46. Dimitrov DS. 1984. Electric field-induced breakdown of lipid bilayer and cell membranes: a thin viscoelastic film model. *J. Membr. Biol.* 78: 53-60.
47. Dimitrov DS, Jain RK. 1984. Membrane stability. *Biochim. Biophys. Acta* 779: 437-468.
48. Dinchuk JE, Kelley KA, Callahan GN. 1992. Flow cytometric analysis of transport activity in lymphocytes electroporated with a fluorescent organic anion dye. *J. Immunol. Methods* 155: 257-265.
49. Dufourc EJ, Mayer C, Stohrer J, Althoff G, Kothe G. 1992. Dynamics of phosphate head groups in biomembranes. *Biophys. J.* 61: 42-57.
50. Eisenhart LP. 1934. Separable systems of Stäckel. *Ann. Math.* 35: 284-305.
51. Fano RM, Chu LJ, Adler RB. 1960. *Electromagnetic Fields, Energy, and Forces*. John Wiley, New York, Etats-Unis d'Amérique.
52. Fisher AC. 1998. *Electrode Dynamics*. Oxford University Press, Oxford, Grande-Bretagne.

53. Foster KR, Schwan HP. 1989. Dielectric properties of tissues and biological materials: A critical review. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 17: 25-104.
54. Freeman SA, Wang MA, Weaver JC. 1994. Theory of electroporation for a planar bilayer membrane: predictions of the fractional aqueous area, change in capacitance and pore-pore separation. *Biophys. J.* 67: 42-56.
55. Fröhlich H. 1986. *Theory of Dielectrics*. Clarendon Press, Oxford, Grande-Bretagne.
56. Fuhr G, Glaser R, Hagedorn R. 1986. Rotation of dielectrics in a rotating electric high-frequency field — model experiments and theoretical explanation of the rotation effect of living cells. *Biophys. J.* 49: 395-402.
57. Fuhr G, Geissler F, Müller T, Hagedorn R, Torner H. 1987. Differences in the rotation spectra of mouse oocytes and zygotes. *Biochim. Biophys. Acta* 930: 65-71.
58. Fynan EF, Webster RG, Fuller DH, Haynes JR, Santoro JC, Robinson HL. 1993. DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11478-11482.
59. Gabriel C, Gabriel S, Grant EH, Halstead BSJ, Mingos DMP. 1998. Dielectric parameters relevant to microwave dielectric heating. *Chem. Soc. Rev.* 27: 213-223.
60. Gabriel B, Teissié J. 1997. Direct observation in the millisecond time range of fluorescent molecule asymmetrical interaction with the electropermeabilized cell membrane. *Biophys. J.* 73: 2630-2637.
61. 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.
62. Gascoyne PRC, Pethig R, Burt JPH, Becker FF. 1993. Membrane changes accompanying the induced differentiation of Friend murine erythroleukemia cells studied by dielectrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta* 1146: 119-126.
63. Gascoyne PRC, Becker FF, Wang XB. 1995. Numerical analysis of the influence of experimental conditions on the accuracy of dielectric parameters derived from electrorotation measurements. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 36: 115-125.
64. Gennis RB. 1989. *Biomembranes: Molecular Structure and Function*. Springer, New York.
65. Gimsa J, Wachner D. 1999. A polarization model overcoming the geometric restrictions of the Laplace solution for spheroidal cells: obtaining new equations for field-induced forces and transmembrane potential. *Biophys. J.* 77: 1316-1326.
66. Glaser RW, Leikin SL, Chernomordik LV, Pastushenko VF, Sokirko AI. 1988. Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores. *Biochim. Biophys. Acta* 940: 275-287.
67. Goldman DE. 1943. Potential, impedance, and rectification in membranes. *J. Gen. Physiol.* 27: 37-60.
68. 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.

69. Gross D. 1988. Electromobile surface charge alters membrane potential changes induced by applied electric fields. *Biophys. J.* 54: 879-884.
70. Grosse C, Schwan HP. 1992. Cellular membrane potentials induced by alternating fields. *Biophys. J.* 63:1632-1642.
71. Hamilton WA, Sale AJH. 1967. Effects of high electric fields on microorganisms: II. Mechanism and action of the lethal effect. *Biochim. Biophys. Acta* 148: 789-800.
72. Harris CM, Kell DB. 1983. The radio-frequency dielectric properties of yeast cells measured with a rapid, automated, frequency-domain dielectric spectrometer. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 11: 15-28.
73. Hibino M, Shigemori M, Itoh H, Nagayama K, Kinosita KJr. 1991. Membrane conductance of an electroporated cell analyzed by sub-microsecond imaging of transmembrane potential. *Biophys. J.* 59: 209-220.
74. Hibino M, Itoh H, Kinosita KJr. 1993. Time courses of electroporation as revealed by submicrosecond imaging of transmembrane potential. *Biophys. J.* 64: 1789-1800.
75. Hodgkin AL, Katz B. 1949. The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J. Physiol.* 108: 37-77.
76. Hölzel R, Lamprecht I. 1992. Dielectric properties of yeast cells as determined by electrorotation. *Biochim. Biophys. Acta* 1104: 195-200.
77. Hu X, Arnold WM, Zimmermann U. 1990. Alterations in the electrical properties of T and B lymphocyte membranes induced by mitogenic stimulation: activation monitored by electrorotation of single cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1021: 191-200.
78. Israelachvili JN, Pashley RM. 1984. Measurement of the hydrophobic interaction between two hydrophobic surfaces in aqueous electrolyte solutions. *J. Coll. Interface Sci.* 98: 500-514.
79. Jacobs RE, Hudson BS, Andersen HC. 1975. A theory of the chain melting phase transition of aqueous phospholipid dispersions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 3993-3997.
80. Jacobs RE, Hudson BS, Andersen HC. 1977. A theory of phase transitions and phase diagrams for one- and two-component phospholipid bilayers. *Biochemistry* 16: 4349-4359.
81. Jacobsen C. 1999. Soft x-ray microscopy. *Trends Cell Biol.* 9: 44-47.
82. Jaffe LF, Nuccitelli R. 1977. Electrical controls of development. *Ann. Rev. Biophys. Bioenerg.* 6: 445-476.
83. Jerry RA, Popel AS, Brownell WE. 1996. Potential distribution for a spheroidal cell having a conductive membrane in an electric field. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 43: 970-972.
84. Kaler KVIS, Jones TB. 1990. Dielectrophoretic spectra of single cells determined by electrorotation. *Biophys. J.* 57: 173-182.
85. Kakorin S, Stoylov SP, Neumann E. 1996. Electrooptics of membrane electro-poration in diphenylhexatriene-doped lipid bilayer vesicles. *Biophys. Chem.* 58: 109-116.
86. Kim PS, Baldwin RL. 1982. Specific intermediates in the folding reactions of small proteins and the mechanisms of protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* 51: 459-489.

87. Kinosita KJr, Tsong TY. 1979. Voltage induced conductance in human erythrocyte membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 554: 479-497.
88. Kinosita KJr, Ashikawa I, Saita N, Yoshimura H, Itoh H, Nagayama K, Ikegami A. 1988. Electroporation of cell membrane visualized under a pulsed-laser fluorescence microscope. *Biophys. J.* 53: 1015-1019.
89. Klee M, Plonsey R. 1972. Finite difference solution for biopotentials of axially symmetric cells. *Biophys. J.* 12: 1661-1675.
90. Klee M, Plonsey R. 1976. Stimulation of spheroidal cells — the role of cell shape. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 23: 347-354.
91. Klenchin VA, Sukharev SI, Serov SM, Chernomordik LV, Chizmadzhev YA. 1991. Electrically induced DNA uptake by cells is a fast process involving DNA electrophoresis. *Biophys. J.* 60: 804-811.
92. Klösgen B, Reichle C, Kohlmann S, Kramer KD. 1996. Dielectric spectroscopy as a sensor of membrane headgroup mobility and hydration. *Biophys. J.* 71: 3251-3260.
93. Kotnik T, Bobanović F, Miklavčič D. 1997. Sensitivity of transmembrane voltage induced by applied electric fields — a theoretical analysis. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 43: 285-291.
94. Kotnik T, Slivnik T, Miklavčič D. 1998. Time course of transmembrane voltage induced by time-varying electric fields — a method for theoretical analysis and its application. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 45: 3-16.
95. Kotnik T, Maček-Lebar A, Miklavčič D, Mir LM. 2000. Evaluation of cell membrane electroporation by means of a nonpermeant cytotoxic agent. *Biotechniques* 28: 921-926.
96. Kotnik T, Miklavčič D. 2000a. Theoretical evaluation of the distributed power dissipation in biological cells exposed to electric fields. *Bioelectromagnetics* 21: 385-394.
97. Kotnik T, Miklavčič D. 2000b. Second-order model of membrane electric field induced by alternating electric fields. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 47: 1074-1081.
98. Kotnik T, Miklavčič D. 2000c. Analytical description of transmembrane voltage induced by electric fields on spheroidal cells. *Biophys. J.* 79: 670-679.
99. Krassowska W, Neu JC. 1994. Response of a single cell to an external electric field. *Biophys. J.* 66: 1768-1776.
100. Kreyszig E. 1993. *Advanced Engineering Mathematics*. John Wiley & Sons, New York, Etats-Unis d'Amérique.
101. Leikin SL, Parsegian VA, Rau DC, Rand RP. 1993. Hydration forces. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 44: 369-395.
102. Lemons R, Forster S, Thoene J. 1988. Protein microinjection by protease permeabilization of fibroblasts. *Anal. Biochem.* 172: 219-227.
103. Lin MT, Pulkkinen L, Uitto J, Yoon K. 2000. The gene gun: current applications in cutaneous gene therapy. *Int. J. Dermatol.* 39: 161-170.
104. Litster JD. 1975. Stability of lipid bilayers and red blood cell membranes. *Phys. Lett.* 53A: 193-194

105. Lo MMS, Tsong TY, Conrad MK, Strittmatter SM, Hester LD, Snyder S. 1984. Monoclonal antibody production by receptor-mediated electrically induced cell fusion. *Nature* 310: 792-794.
106. Lojewska Z, Farkas DL, Ehrenberg B, Loew LM. 1989. Analysis of the effect of medium and membrane conductance on the amplitude and kinetics of membrane potentials induced by externally applied electric fields. *Biophys. J.* 56: 121-128.
107. Loomis-Husselbee JW, Cullen PJ, Irvine RF, Dawson AP. 1991. Electroporation can cause artefacts due to solubilization of cations from the electrode plates. *Biochem. J.* 277: 883-885.
108. Lukas J, Bartek J, Strauss M. 1994. Efficient transfer of antibodies into mammalian cells by electroporation. *J. Immunol. Methods* 170: 255-259.
109. Maček-Lebar A, Kopitar NA, Ihan A, Serša G, Miklavčič D. 1998. Significance of treatment energy in cell electroporation. *Electro. Magnetobiol.* 17: 253-260.
110. Mahvi DM, Sheehy MJ, Yang NS. 1997. DNA cancer vaccines: a gene gun approach. *Immunol. Cell. Biol.* 75: 456-460.
111. Maldarelli C, Jain RK, Ivanov IB, Ruckenstein E. 1980. Stability of symmetric and unsymmetric, thin liquid films to short and long wavelength perturbations. *J. Colloid. Interface Sci.* 78: 118-143.
112. Marszalek P, Liu DS, Tsong TY. 1990. Schwan equation and transmembrane potential induced by alternating electric field. *Biophys. J.* 58: 1053-1058.
113. Mehrle W, Hampp R, Zimmermann U, Schwan HP. 1988. Mapping of the field distribution around dielectrophoretically aligned cells by means of small particles as field probes. *Biochim. Biophys. Acta* 939: 561-568.
114. Merz KMJr, Roux B. 1996. *Biological Membranes: A Molecular Perspective from Computation and Experiment*. Birkhäuser, Boston, Etats-Unis d'Amérique.
115. Michael DH, O'Neill ME. 1970. Electrohydrodynamic instability in plane layers of fluid. *J. Fluid Mech.* 41: 571-580.
116. Miklavčič D, Beravs K, Šemrov D, Čemažar M, Demšar F, Serša G. 1998. The importance of electric field distribution for effective in vivo electroporation of tissues. *Biophys. J.* 74: 2152-2158.
117. Mir LM, Banoun H, Paoletti C. 1988. Introduction of definite amounts of nonpermeant molecules into living cells after electroporation: direct access to the cytosol. *Exp. Cell Res.* 175: 15-25.
118. Mir LM, Orłowski S, Belehradek JJr, Paoletti C. 1991. Electrochemotherapy potentiation of antitumor effect of bleomycin by local electric pulses. *Eur. J. Cancer* 27: 68-72.
119. Mir LM, Orłowski S, Belehradek JJr, Teissié J, Rols MP, Serša G, Miklavčič D, Gilbert R, Heller R. 1995. Biomedical applications of electric pulses with special emphasis on antitumor electrochemotherapy. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 38: 203-207.
120. Mir LM, Tounekti O, Orłowski S. 1996. Bleomycin: revival of an old drug. *Gen. Pharmacol.* 27: 745-748.

121. Mir LM, Glass LF, Serša G, Teissié J, Domenge C, Miklavčič D, Jaroszeski MJ, Orłowski S, Reintgen DS, Rudolf Z, Belehradec M, Gilbert R, Rols MP, Belehradec JJr, Bachaud JM, DeConti R, Štabuc B, Čemažar M, Coninx P, Heller R. 1998. Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumors by electrochemotherapy. *Br. J. Cancer* 77:2336-2342, 1998.
122. Mir LM, Bureau MF, Gehl J, Rangara R, Rouy D, Caillaud JM, Delaere P, Branellec D, Schwartz B, Scherman D. 1999. High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 4262-4267.
123. Montag M, Rink K, Delacretaz G, van der Ven H. 2000. Laser-induced immobilization and plasma membrane permeabilization in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 15: 846-852.
124. Morse PM, and Feshbach H. 1953. *Methods of Theoretical Physics, Part I*. McGraw-Hill, New York, Etats-Unis d'Amérique.
125. Mouneimne Y, Tosi PF, Barhoumi R, Nicolau C. 1990. Electroinsertion of full length recombinant CD4 into red blood cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 1027: 53-58.
126. Neumann E, Kakorin S. 1996. Electrooptics of membrane electroporation and vesicle shape deformation. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 1: 790-799.
127. Neumann E, Rosenheck K. 1972. Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *J. Membrane Biol.* 10: 279-290.
128. Neumann E, Schaefer-Riedler M, Wang Y, Hofschneider PH. 1982. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* 1: 841-845.
129. Neumann E, Sowers AE, Jordan CA. 1989. *Electroporation and Electrofusion in Cell Biology*. Plenum Press, New York, Etats-Unis d'Amérique.
130. Neumann E, Kakorin S, Tönsing K. 1999. Fundamentals of electroporative delivery of drugs and genes. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 48: 3-16.
131. Nörtemann K, Hilland J, Kaatze U. 1997. Dielectric properties of aqueous NaCl solutions at microwave frequencies. *J. Phys. Chem. A* 101: 6864-6869.
132. Ohad I, Kyle DJ, Arntzen CJ. 1984. Membrane protein damage and repair: removal and replacement of inactivated 32-kilodalton polypeptides in chloroplast membranes. *J. Cell Biol.* 99: 481-485.
133. Okino M, Mohri H. 1987. Effects of a high-voltage electrical impulse and an anticancer drug on in vivo growing tumors. *Jpn. J. Cancer Res.* 78: 1319-1321.
134. Parsegian A. 1969. Energy of an ion crossing a low dielectric membrane: solutions to four relevant electrostatic problems. *Nature* 221: 844-846.
135. Pauly H, Schwan HP. 1959. Über die Impedanz einer Suspension von kugelförmigen Teilchen mit einer Schale. *Z. Naturforsch.* 14B: 125-131.
136. Pliquett U, Gift EA, Weaver JC. 1996. Determination of the electric field and anomalous heating caused by exponential pulses with aluminum electrodes in electroporation experiments. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 39: 39-53.
137. Pohl HA. 1978. *Dielectrophoresis*. Cambridge University Press, London, Grande-Bretagne.

138. Pottel R, Göpel KD, Henze R, Kaatze U, Uhlendorf V. 1984. The dielectric permittivity spectrum of aqueous colloidal phospholipid solutions between 1 kHz and 60 GHz. *Biophys. Chem.* 19: 233-244.
139. Privalle LS, Burris RH. 1983. Permeabilization of isolated heterocysts of *Anabaena sp.* strain 7120 with detergent. *J. Bacteriol.* 155: 940-942.
140. Raffy S, Teissié J. 1995. Insertion of glycophorin A, a transmembraneous protein, in lipid bilayers can be mediated by electropermeabilization. *Eur. J. Biochem.* 230: 722-732.
141. Rand RP. 1964. Mechanical properties of the red blood cell membrane. II. Viscoelectric breakdown of the membrane. *Biophys. J.* 4: 303-316.
142. Robinson KR. 1985. The responses of cells to electrical fields: a review. *J. Cell Biol.* 101: 2023-2027.
143. Rols MP, Teissié J. 1989. Ionic-strength modulation of electrically induced permeabilization and associated fusion of mammalian cells. *Eur. J. Biochem.* 179: 109-115.
144. Rols MP, Teissié J. 1990a. Electropermeabilization of mammalian cells: quantitative analysis of the phenomenon. *Biophys. J.* 58: 1089-1098.
145. Rols MP, Teissié J. 1990b. Modulation of electrically induced permeabilization and fusion of Chinese hamster ovary cells by osmotic pressure. *Biochemistry* 29: 4561-4567.
146. Rols MP, Teissié J. 1998a. Electropermeabilization of mammalian cells to macromolecules: control by pulse duration. *Biophys. J.* 75: 1415-1423.
147. Rols MP, Teissié J. 1998b. Flow cytometry quantification of electropermeabilization. *Methods Mol. Biol.* 91: 141-147.
148. Rols MP, Delteil C, Serin G, Teissié J. 1994. Temperature effects on electrotransfection of mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 22: 540.
149. Roper PR, Drewinko B. 1976. Comparison of *in vitro* methods to determine drug-induced cell lethality. *Cancer Res.* 36: 2182-2188.
150. Sale AJH, Hamilton WA. 1967. Effects of high electric fields on microorganisms: I. Killing of bacteria and yeasts. *Biochim. Biophys. Acta* 148: 781-788.
151. Sale AJH, Hamilton WA. 1968. Effects of high electric fields on microorganisms: III. Lysis of erythrocytes and protoplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 163: 37-43.
152. Saunders JA, Lin CH, Hou BH, Cheng J, Tsengwa N, Lin JJ, Smith CR, McIntosh MS, Van Wert S. 1995. Rapid optimization of electroporation conditions for plant cells, protoplasts, and pollen. *Mol. Biotechnol.* 3:181-190
153. Schoenbach KH, Peterkin FE, Alden RW III, Beebe SJ. 1997. The effects of pulsed electric fields on biological cells: Experiments and applications. *IEEE Trans. Plasma Sci.* 25: 284-292.
154. Schutt W, Klinkmann H, Lamprecht I, Wilson T. 1991. *Physical Characterization of Biological Cells*. Verlag Gesundheit, Berlin, Allemagne.
155. Schwan, HP. 1957. Electrical properties of tissue and cell suspensions. *Adv. Biol. Med. Phys.* 5: 147-209.

156. Serša G, Čemažar M, Miklavčič D. 1995. Antitumor effectiveness of electrochemotherapy with cis-diamminedichloroplatinum(II) in mice. *Cancer Res.* 55: 3450-3455.
157. Serša G, Čemažar M, Šemrov D, Miklavčič D. 1996. Changing electrode orientation improves the efficacy of electrochemotherapy of solid tumors in mice. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 39: 61-66.
158. Sowers AE. 1987. *Cell Fusion*. Plenum Press, New York, Etats-Unis d'Amérique.
159. Stämpfli R. 1958. Reversible electrical breakdown of the excitable membrane of a Ranvier node. *An. Acad. Brasil. Ciens.* 30: 57-63.
160. Steinchen A, Gallez D, Sanfeld A. 1982. A viscoelastic approach to the hydrodynamic stability of membranes. *J. Colloid. Interface. Sci.* 85: 5-15.
161. Sugár IP. 1979. A theory of the electric field-induced phase transition of phospholipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 556: 72-85.
162. Sukharev SI, Klenchin VA, Serov SM, Chernomordik LV, Chizmadzhev YA. 1992. Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells. *Biophys. J.* 63: 1320-1327.
163. Sunderman FW. 1945. Measurement of serum total base. *Am. J. Clin. Path.* 15: 219-222.
164. Susil R, Šemrov D, Miklavčič D. 1998. Electric-field induced transmembrane potential depends on cell density and organization. *Electro. Magnetobiol.* 17: 391-399.
165. Suttitanamongkol S, Gear AR, Polanowska-Grabowska R. 2000. Geldanamycin disrupts platelet-membrane structure, leading to membrane permeabilization and inhibition of platelet aggregation. *Biochem. J.* 345: 307-314.
166. Šemrov D, Miklavčič D. 1998. Calculation of the electrical parameters in electrochemotherapy of solid tumours in mice. *Comput. Biol. Med.* 28: 439-448.
167. Taupin C, Dvolaitzky M, Sauterey C. 1975. Osmotic pressure induced pores in phospholipid vesicles. *Biochemistry* 14: 4771-4775.
168. Taylor GI, Michael DH. 1973. On making holes in a sheet of fluid. *J. Fluid Mech.* 58: 625-639.
169. Teissié J, Rols MP. 1993. An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electroporation. *Biophys. J.* 65: 409-413.
170. Tekle E, Astumian RD, Chock PB. 1994. Selective and asymmetric molecular transport across electroporated cell membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11512-11516.
171. Tomov TC. 1995. Quantitative dependence of electroporation on the pulse parameters. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 37: 101-107.
172. Tovar O, Tung L. 1991. Electroporation of cardiac cell membranes with monophasic and biphasic rectangular pulses. *Pacing Clin. Electrophysiol.* 14:1887-1892.
173. Tsong TY. 1991. Electroporation of cell membranes. *Biophys. J.* 60: 297-306.
174. Ulrich AS, Watts A. 1994. Molecular response of the lipid headgroup to bilayer hydration monitored by ²H-NMR. *Biophys. J.* 66: 1441-1449.
175. Weaver JC, Chizmadzhev YA. 1996. Theory of electroporation: a review. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 41: 135-160.

176. Weaver JC, Mintzer RA. 1981. Decreased bilayer stability due to transmembrane potentials. *Phys. Lett.* 86A: 57-59.
177. Wicher D, Gundel J. 1989. Electrorotation of multi- and oligolamellar liposomes. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 21: 279-288.
178. Winterhalter M, Helfrich W. 1988. Deformation of spherical vesicles by electric fields. *J. Colloid. Interface Sci.* 122: 583-586.
179. Wobshall D. 1972. Voltage dependence of bilayer membrane capacitance. *J. Colloid. Interface. Sci.* 40: 417-423.
180. 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.
181. Wolfe J, Dowgert MF, Steponkus PL. 1986. Mechanical study of the deformation and rupture of the plasma membranes of protoplasts during osmotic expansion. *J. Membrane Biol.* 93: 63-74.
182. Wong TK, Neumann E. 1982. Electric field mediated gene transfer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 107: 584-587.
183. Yamanouchi Y, Brewer JE, Olson KF, Mowrey KA, Mazgalev TN, Wilkoff BL, Tchou PL. 1999. Fully discharging phases: A new approach to biphasic waveforms for external defibrillation. *Circulation* 100: 826-831.
184. Zald PB, Cotter MA II, Robertson ES. 2000. Improved transfection efficiency of 293 cells by radio frequency electroporation. *Biotechniques* 28: 418-420.
185. Zimmermann U. 1982. Electric field mediated fusion and related electrical phenomena. *Biochim. Biophys. Acta* 694: 227-277.

RESUME

L'électroperméabilisation est une méthode établie pour permettre l'internalisation des molécules exogènes dans les cellules en suspension et dans les tissus. Dans beaucoup d'applications, expérimentales et cliniques, il est très important que le pourcentage des cellules perméabilisées, le pourcentage des cellules survivantes, et souvent aussi la quantité de molécules internalisées, soient tous aussi élevés que possible. Pour améliorer l'efficacité des protocoles d'électroperméabilisation, le rôle de l'amplitude, de la durée et du nombre d'impulsions ont été étudiés en détail. Par contre, les études de l'influence de la forme de l'impulsion sur l'efficacité de l'électroperméabilisation ont été très rares, ce qui est en partie dû au manque de générateurs d'impulsions de haut voltage d'une forme autre qu'exponentielle ou rectangulaire.

Le but principal de la recherche décrite dans cette thèse était d'étudier le rôle de la forme des impulsions dans l'efficacité de l'électroperméabilisation des cellules en suspension.

Pour établir une base théorique pour les études expérimentales, nous avons développé une méthode d'analyse du voltage transmembranaire induit par des champs électriques qui varient au cours du temps. Nous avons également analysé le rôle des conductivités du milieu extracellulaire, de la membrane et du cytoplasme, et aussi du rayon et de la forme des cellules sur le voltage transmembranaire induit.

Pour générer des impulsions ayant différentes formes, nous avons construit un système composé d'un générateur de fonctions programmable commercial et d'un amplificateur bipolaire à haute fréquence et à haut voltage.

Concernant la détermination du pourcentage de cellules électroperméabilisées, nous avons développé une nouvelle méthode basée sur la bléomycine, un agent cytotoxique qui ne peut pas diffuser à travers une membrane plasmique intacte et qui mène ainsi à la mort sélective des cellules perméabilisées. Cette méthode élimine plusieurs des inconvénients de la méthode la plus communément utilisée, celle basée sur l'iodure de propidium.

Nos expériences nous permettent de confirmer que pour des impulsions rectangulaires monophasiques, la perméabilisation augmente et la survie diminue avec l'augmentation de la durée et du nombre d'impulsions. Pour l'internalisation des petites molécules exogènes, nous montrons que le nombre d'impulsions joue un rôle plus important que la durée d'impulsion.

Nous montrons aussi que la perméabilisation et l'internalisation des petites molécules exogènes provoquées par les impulsions biphasiques sont augmentées par rapport à des impulsions monophasiques de durée et d'amplitude identiques. Par contre, la survie obtenue avec des impulsions biphasiques est très similaire à celle réalisée par des impulsions monophasiques. Ces effets peuvent être expliqués sur la base de l'asymétrie du voltage transmembranaire total en raison du voltage transmembranaire de repos. Les impulsions biphasiques compensent cette asymétrie, et en plus elles permettent de délivrer une charge équilibrée au niveau des électrodes, réduisant la contamination électrolytique.

Dans la gamme des temps de montée et de descente des impulsions rectangulaires de 2 μ s à 100 μ s, nous n'avons trouvé aucune influence de ces temps dans l'efficacité de l'électroperméabilisation.

Nos résultats suggèrent aussi qu'un des paramètres très importants pour l'électroperméabilisation est la durée sans interruption pendant laquelle l'impulsion dépasse une certaine intensité critique.

Mots clés: électroperméabilisation, voltage transmembranaire induit, impulsions électriques