



CHAMPS ÉLECTROMAGNÉTIQUES : DE LA DOSIMÉTRIE À LA SANTÉ HUMAINE

Electroporation et transfert de siARN au travers de modèles de membranes cellulaires

Molecular Insights into electroporation and siRNA electrotransfer through model cell membranes

Lucie Delemotte, Marie Breton**, Lluis M. Mir**, Mounir Tarek**

* UMR structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes, CNRS - Université de Lorraine, Nancy, mounir.tarek@univ-lorraine.fr

** Université Paris-Sud, Laboratoire de Vectorologie et Thérapeutiques Anticancéreuses, UMR8203, Orsay, F-91405
CNRS, Orsay, Laboratoire de Vectorologie et Thérapeutiques Anticancéreuses, UMR 8203, F-91405
Institut Gustave Roussy, Laboratoire de Vectorologie et Thérapeutiques Anticancéreuses, UMR8203, Villejuif, F-94805 Lluis.Mir@igr.fr

Key words: MD simulations, Nanosecond electrical pulses, GUV
Mots-clefs : Simulations de DM, Impulsions nanoseconde, Vésicules.

Résumé

L'effet d'impulsions électriques de très courte durée (nanoseconde) sur les membranes cellulaires reste à ce jour mal caractérisé. En particulier, on ignore si oui ou non de telles impulsions sont efficaces pour l'électrotransfert de larges molécules. Pour répondre spécifiquement à ces questions, nous avons établi des protocoles et des stratégies combinant des investigations expérimentales et computationnelles. Nous présentons ici les résultats préliminaires sur l'effet d'impulsions nanosecondes (IENS) de quelques 100 kV/cm sur les vésicules uni-lamellaires géantes (GUV) considérées comme modèles simples de cellules. En utilisant les microscopies confocale et de transmission nous avons étudié la stabilité de telles GUVs soumises à des IENS, et nous montrons que sous certaines conditions, ces impulsions permettent la vectorisation de brins d'ARN interférants (siARN) à l'intérieur des vésicules. Nous présentons ensuite des simulations de dynamique moléculaire (MD) qui ont permis de caractériser, à une résolution atomique, l'électroporation des bicouches lipidiques et la translocation des siARN au travers de celles-ci.

Introduction

L'application d'un champ électrique intense aux cellules et aux tissus augmente la perméabilité de la membrane cellulaire [1]. Ce processus, appelé électroporation ou électroperméabilisation trouve aujourd'hui de nombreuses applications car, sous certaines conditions, il est réversible et permet par conséquent de transférer des petites molécules dans le cytoplasme d'une manière efficace. Cette approche est utilisée en biologie moléculaire, en biotechnologie et en médecine [2].

Les impulsions électriques (IE), suivant leur durée, leur amplitude, et leur nombre, ont des effets très variés sur les cellules, *in vitro* et *in vivo*. Les utilisations les plus courantes de cette technique font appel à des impulsions électriques d'une durée de la micro- à la milliseconde. Dans de telles conditions, les impulsions de basse intensité (~ 100 V/cm) permettent de générer un potentiel transmembranaire, qui, dépassant un certain seuil, peut avoir pour conséquence de perméabiliser de la membrane plasmique (extérieure) des cellules. L'électro-manipulation de l'intégrité des membranes cellulaires trouve entre autre des applications très intéressantes en médecine telles que l'électrochimiothérapie antitumorale [3] ou encore l'électrotransfert d'acides nucléiques en vue d'une thérapie génique [4].

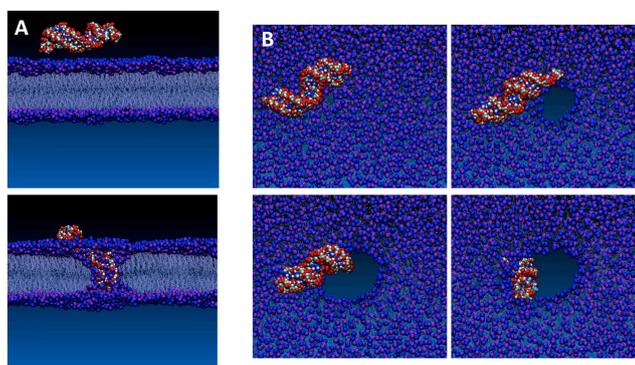
Récemment, l'apparition de nouveaux générateurs a permis de tester l'effet d'IE de plus grande amplitude (~ 100 kV/cm) et de beaucoup plus courte durée (de l'ordre de la nanoseconde) [5]. Les premières études montrent que de telles nsIE permettent de perméabiliser à la fois les membranes cellulaires et celles des organelles internes. D'un point de vue pratique, à l'inverse de l'EP classique, cette technique présente l'avantage de réduire les effets thermiques consécutifs à l'application prolongée des champs électriques. Ici, on montre pour la première fois que de telles impulsions sont capables d'induire la vectorisation d'ARN interférants (siARN) vers l'intérieur de vésicules lipidiques.

Résultats

L'effet de l'application de nsIE sur la stabilité de vésicules unilamellaires géantes (GUV) ainsi que sur la translocation de brins de siARN vers l'intérieur de celles-ci a été suivie par microscopies confocale et de transmission. Les vésicules lipidiques marquées à la Rhodamine ont été mises en présence d'une concentration micro-molaire de siARN marquées au FITC. Les vésicules ont ainsi été visualisées par leur fluorescence rouge et les siARN par leur fluorescence verte, sur des images prises 2-5 minutes après l'application d'IE de quelques kV/mm d'une durée de 10ns.

Nos résultats montrent qu'une seule impulsion de cette amplitude et durée est capable d'induire d'importants changements: A faible intensité, on note une augmentation de la concentration des brins de siARN accumulés à la surface des vésicules. Au delà d'un certain seuil, les images et analyses de celles-ci indiquent la présence d'une fluorescence verte à l'intérieur des GUV ce qui montre que les siARN ont bien traversé les membranes lipidiques.

La description usuelle de la perméabilisation d'une membrane cellulaire est basée sur des théories impliquant la formation stochastique de pores. Dans des membranes d'érythrocyte, on peut observer, par microscopie électronique par exemple, de grands pores. Toutefois, l'observation directe de la formation des pores (et encore moins d'un transport moléculaire) n'est généralement pas possible avec des techniques conventionnelles. Les simulations atomistiques et en particulier les simulations de dynamique moléculaire (DM) se sont, elles, à l'inverse avérées très utiles pour obtenir de telles informations. Plusieurs simulations ont été conduites afin de modéliser l'effet des champs électriques sur des membranes, fournissant peut-être le modèle moléculaire le plus complet du processus d'électroporation de bicouches lipidiques [6].



Nous avons eu recours ici à cette technique pour modéliser l'effet des nsIE sur des bicouches lipidiques et sur des brins de siARN placées au voisinage de ces membranes. Les simulations de DM montrent ainsi que sous l'action de champs électriques intenses, des brins de siARN (22 paires de bases) sont d'abord fortement associés avec les têtes polaires des lipides, ce qui peut expliquer l'accroissement de la fluorescence à la surface des GUV observé par microscopie. Lorsque les champs électriques sont capables de créer un pore (i.e., donnent lieu à l'électroporation), les siARN se trouvant à proximité peuvent traverser des membranes lipidiques dans des échelles de temps de quelques nanosecondes, confirmant ainsi les résultats expérimentaux.

Ainsi, bien que les paramètres électriques soient dans le cas de simples GUVs bien différentes de celles de cellules, l'étude actuelle est très prometteuse. Elle ouvre la voie, une fois optimisée en termes d'intensité et de durée des nano-impulsions, vers l'utilisation des nsIE pour la vectorisation d'ARN interférants dans des applications biotechnologiques et médicales.

Remerciements

Ces travaux ont été effectués dans le cadre du projet *ANR-10-BLAN-916-03-INTCELL*, et dans le cadre du Laboratoire Européen Associé EBAM. M.T remercie GENCI et le Centre Informatique National de l'Enseignement Supérieur (CINES) pour l'allocation (1010- et 2010 075137) d'heures de calculs.

Références

- [1] Neumann, E; Rosenheck, K. *J. Membr. Biol.* **1972**, *10*, 279-90.
- [2] *Advanced Electroporation Techniques in Biology and Medicine*. **2010** A. Pakhomov, D. Miklavcic and M. Markov, Editors. (Taylor and Francis/CRC Press)
- [3] Gothelf A; Mir LM; Gehl J. *Cancer Treat. Rev.* **2003**, *29*, 371-87. Breton, M. Mir, LM. *Bioelectromagnetics* **2012**, *33*, 106-23
- [4] Paganin-Gioanni A; Bellard E; Escoffre JM; Rols MP; Teissié J; Golzio M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2011**, *108*, 10443-7
- [5] Joshi RP ; Schoenbach KH. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* **2010**; *38* :255-304.
- [6] Tarek, M. *Biophys. J.* **2005**, *88*, 4045-53