



HAL
open science

Sonoporation de cellules adhérentes par cavitation inertielle régulée

Pauline Labelle

► **To cite this version:**

Pauline Labelle. Sonoporation de cellules adhérentes par cavitation inertielle régulée. Acoustique [physics.class-ph]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2014. Français. NNT : 2014LYO10273 . tel-01119407

HAL Id: tel-01119407

<https://theses.hal.science/tel-01119407>

Submitted on 23 Feb 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N°d'ordre : 273-2014

Année 2014

THÈSE DE L'UNIVERSITÉ DE LYON
Délivrée par
L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE Mécanique, Energétique, Génie Civil, Acoustique

DIPLÔME DE DOCTORAT
Spécialité : ACOUSTIQUE

Soutenue publiquement le 20 novembre 2014 par

Pauline LABELLE

Sonoporation de cellules adhérentes par cavitation inertielle régulée

devant le jury composé de :

B. DUBUS	Directeur de Recherche, IEMN, Lille	Rapporteur
S. MENSAH	Maître de conférences, LMA, Marseille	Rapporteur
J-P. RIEU	Professeur, ILM, Lyon	Examineur
O. COUTURE	Chargé de Recherche, Institut Langevin, Paris	Examineur
J-C. BERA	Professeur, LabTAU, Lyon	Directeur de thèse
C. INSERRA	Maître de conférences, LabTAU, Lyon	Co-directeur de thèse

*En mémoire aux centaines
de millions de cellules
mortes pour la science
lors de cette thèse...*

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Directeur Général des Services

M. François-Noël GILLY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Directeur : Mme Caroline FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. P. FOURNIER

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

En premier lieu, je souhaite remercier chaleureusement mes co-directeurs de thèse Claude Inserra et Jean-Christophe Béra pour m'avoir accueillie au laboratoire d'abord lors de mon stage de Master 2 puis de m'avoir permis de continuer sur ce projet pendant 3 ans. Merci donc à Jean-Christophe Béra pour m'avoir fait confiance, pour sa disponibilité et pour sa réactivité lors des relectures d'article ou de mon manuscrit. Un grand merci à Claude Inserra, pour son encadrement lors de cette expérience "d'apprenti-chercheur", pour sa disponibilité toujours de bonne humeur, pour ses nombreux conseils ainsi que pour sa relecture très minutieuse de mon manuscrit. Je pense avoir beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse ma gratitude pour tout cela.

Je tiens à remercier Bertrand Dubus et Serge Mensah d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse, ainsi que Jean-Paul Rieu et Olivier Couture d'avoir accepté de faire partie du jury.

Cette thèse faisant partie d'un projet multidisciplinaire, il m'a fallu me former (au moins un peu) sur la biologie de la cellule, et je remercie donc Jacqueline Ngo pour avoir répondu à mes questions dans ce domaine ainsi que pour la culture cellulaire des cellules utilisées lors des expériences et pour avoir participé aux expériences. Je remercie également Manuela Fouqueray pour toutes ses explications (sur les cellules, fonctionnement de différents appareils, ou autres), toutes ses idées qui nous ont orienté vers des études très intéressantes, pour avoir participé aux expériences et pour sa relecture de mon chapitre 3.

Je remercie les collaborateurs de l'Institut Lumière Matière de Lyon, Jean-Paul Rieu, responsable d'équipe, et surtout Christelle der Loughian avec qui j'ai fait les expériences sur les membranes sous microscope. Expériences qui n'ont pas toujours été faciles, quand on cherche une aiguille dans une botte de foin (ou qu'on espère observer pendant tir une bulle qui saute au x40)...

De même, mes remerciements vont à Christophe Vanbelle pour sa participation lors des observations de sonoporation sous microscope confocal, ainsi qu'à Annabelle Bouchardon pour les expériences plus récentes sous vidéomicroscope.

De manière générale, je tiens à remercier le personnel du LabTAU et tout particulièrement certains de ses membres qui m'ont particulièrement aidée. Tout d'abord ceux qui ne sont plus là (à la retraite

maintenant) : Alain Birer (pour avoir soudés les transducteurs, pour tous ses conseils et explications sur les adaptation d'impédance électrique), Adrien Matias (pour l'usinage de pièces, et son animation des repas du midi avant son départ à une retraite bien méritée) et Bernard Lavandier (pour ses discussions et ses tomates). Sinon, un grand merci à Isabelle pour tout le côté administratif et Adrien Poizat, co-bureau, pour avoir entre autre agencé le système de placement de l'hydrophone de la platine et pour avoir fait les modifications du programme du FPGA dont j'avais besoin rapidement. Merci à Bruno Gilles pour ses conseils sur les TD de mécanique. Et puis, un grand merci à toute l'équipe du midi (même si on est de moins en moins nombreux...).

Et comme on n'arrive à rien sans un bon soutien moral, je remercie mes parents, Patrick et Murielle Labelle, et mon frère Valentin de s'être intéressé à mon travail et de m'avoir soutenue tout au long de mes études. En dernier lieu, je voudrais exprimer toute ma gratitude à Patrick Muleki Seya, mon mari, pour m'avoir supportée et soutenue au quotidien.

Table des matières

Table des matières	i
Notations	1
Introduction générale	1
1 Etat de l'art	5
1.1 La cavitation acoustique	6
1.1.1 Dynamique spatio-temporelle d'une bulle	6
1.1.2 Cas d'un nuage de bulles	12
1.1.3 La cavitation, un phénomène aléatoire...	13
1.2 Sonoporation des cellules	21
1.2.1 Les cellules biologiques	21
1.2.2 Mécanismes mis en avant dans les expériences de sonoporation	24
1.2.3 Observations de la poration des cellules	29
1.3 Conclusion	30
2 Système de sonoporation de cellules adhérentes en cavitation régulée	31
2.1 Système de sonoporation	31
2.1.1 Le dispositif technologique	31
2.1.2 Les transducteurs	32
2.1.3 L'hydrophone	35
2.2 Contrôle de l'activité de cavitation inertielle	36
2.2.1 Le principe	37
2.2.2 L'implémentation du contrôle	38
2.2.3 Effet de la régulation sur la stabilité temporelle et l'initiation de la cavitation inertielle	39
2.2.4 Calibration du CI par dosimétrie	40
2.2.5 Caractérisation dans de l'eau et du milieu cellulaire	43
2.2.6 Régulation vs UCAs?	46
2.3 Dynamique de bulles	48
2.3.1 Positions d'équilibre des bulles	48
2.3.2 Observations de bulles	50

2.3.3	Écoulement hydrodynamique	52
2.4	Conclusion	58
3	Mise en oeuvre du système de cavitation régulée sur les cellules adhérentes.	61
3.1	Sonoporation de cellules adhérentes	62
3.1.1	Méthode de mesure de la sonoporation	62
3.1.2	Apport de la régulation de l'activité de cavitation inertielle pour la sonoporation de cellules adhérentes	66
3.1.3	Études paramétriques sur la sonoporation	70
3.1.4	Étude des mécanismes potentiels	73
3.2	Effet des ultrasons et de la cavitation acoustique sur les cellules à moyen terme	75
3.2.1	Méthode d'évaluation de la reprise de croissance cellulaire	75
3.2.2	Reprise de croissance des cellules après exposition à différentes stimulations ultrasonores	78
3.2.3	Effet de la cavitation inertielle sur la reprise de croissance des cellules adhérentes sonoporées ou non et détachées	83
3.3	Conclusion	86
4	Observation sous microscope de l'action de la cavitation sur les cellules	87
4.1	Principe de fonctionnement des microscopes utilisés	87
4.2	Les bicouches lipidiques : des membranes modèles	89
4.2.1	Protocole de fabrication des bicouches de lipides et protocole de microscopie	89
4.2.2	Observations préliminaires	90
4.2.3	Analyse des fissures membranaires	92
4.2.4	Bulles sauteuses	99
4.2.5	Cartographie des interactions bulles-membranes	105
4.3	Cellules	108
4.3.1	Paramètres des observations	108
4.3.2	Le détachement cellulaire	109
4.3.3	Sonoporation	114
4.4	Conclusion	118
	Conclusion générale	121
5	Annexe : statistiques	125
	Bibliographie	129

Introduction

L'utilisation des ultrasons à des fins thérapeutiques s'est développée de manière importante depuis les années 1980. Les ultrasons présentent à la fois des effets thermiques et mécaniques. Les effets mécaniques sont exploités en clinique pour le traitement des calculs rénaux et urétraux : c'est la lithotritie par ondes de choc. Les effets thermiques sont, quant à eux, exploités pour la nécrose de tissus par hyperthermie (ultrasons focalisés de fortes intensités HIFU) en vue du traitement de certaines tumeurs cancéreuses (de la prostate et du foie notamment). Les ultrasons sont également utilisés pour la délivrance de substances médicamenteuses ou pour la sonoporation. Cette dernière technique consiste à utiliser les ultrasons afin d'augmenter la perméabilité de la membrane cellulaire et ainsi créer des pores transitoires, mécanisme sous-jacent à la transfection ultrasonore, c'est-à-dire le transfert de matériel génétique à l'intérieur de la cellule. La sonoporation est donc une technique prometteuse, notamment pour la thérapie génique qui vise à activer ou inhiber la production de certaines protéines, par exemple dans le but de traiter des maladies héréditaires, mais également d'autres maladies où des gènes défectueux sont présents (comme les cancers par exemple). Les techniques de transfection actuelles sont des techniques biologiques, chimiques ou physiques présentant des taux de transfection et de mortalité différents selon les techniques et les types cellulaires. Pour des applications *in vivo*, la transfection ultrasonore présenterait potentiellement l'avantage d'assurer une action spatialement ciblée et une mise en œuvre extracorporelle.

La sonoporation a montré sa faisabilité *in vitro* pour différents dispositifs expérimentaux et types de cellules. Cependant afin de pouvoir utiliser cette technique, il est important de mieux définir les mécanismes sous-jacents à la formation des pores afin de pouvoir contrôler les effets biologiques. S'il est généralement admis que la cavitation acoustique est le principal facteur impliqué dans la sonoporation, les mécanismes sous-jacents à la formation de pores dans la membrane cellulaire ne sont pas encore clairement définis. La cavitation acoustique comprend l'ensemble des étapes de génération, d'entretien et d'extinction des bulles : leur nucléation dans un liquide soumis à une onde acoustique, leurs oscillations radiales linéaires et non linéaires, et leurs implosions. La cavitation ultrasonore est un phénomène complexe présentant un caractère aléatoire, responsable de taux de sonoporation peu reproductibles et très variables selon les études. La cavitation acoustique est responsable de divers phénomènes comme la présence de microstreaming acoustique lié aux oscillations ou aux translations des bulles ainsi que la formation d'ondes de choc et de microjets lors de l'implosion de bulles de cavitation. Dans la littérature, ces différents phénomènes ont été mis en avant pour expliquer la sonoporation des cellules. Il a par ailleurs été observé une corrélation entre la sonoporation et l'activité

de cavitation inertielle, via le bruit large bande émis par l'implosion des bulles et indicateur de ce régime de cavitation. Afin de mieux appréhender ces mécanismes, il est potentiellement intéressant d'étudier les interactions entre les bulles, les cellules et le milieu fluide environnant. Quelques études ont été menées dans ce sens, à travers des observations en temps-réel sous microscope des interactions entre une cellule et une bulle unique.

La visualisation en temps-réel sous microscope implique de fixer soit la position des cellules, et donc l'utilisation de cellules adhérentes, soit celle des bulles, en créant et piégeant une bulle avec un laser par exemple. Ainsi, les études précédentes portant sur l'observation des interactions bulles-cellules s'intéressent soit à l'effet d'une bulle unique près d'une cellule soit à une monocouche de cellules adhérentes. Ces expériences mettent en avant la déformation de cellules, menant à la créations de pores dans la membrane, en présence de bulles oscillantes près ou sur la cellule ou bien par l'implosion de bulles produisant des microjets liquides. Ces études renseignent sur les modes d'interactions bulles-cellules et sur les potentiels mécanismes sous-jacents à la sonoporation mais ne permettent pas d'obtenir le taux de sonoporation global lié à ces différents mécanismes. Nous avons donc développé un système de sonoporation adapté à la visualisation en temps-réel sous microscope et dédié aux cellules adhérentes. Afin de s'affranchir du comportement stochastique de la cavitation acoustique, un système de régulation de la cavitation inertielle est implémenté afin d'obtenir des effets biologiques plus reproductibles.

Le premier objectif de ce travail est donc de montrer la faisabilité de la sonoporation de cellules adhérentes, ainsi que l'intérêt de l'utilisation de la régulation de la cavitation inertielle dans ce cas. Le second est d'observer les interactions bulles-cellules sur le fond d'un puits de culture, et de comprendre les interactions bulles-membrane cellulaire au moyen de membranes modèles, les bicouches lipidiques.

Cette thèse est composée de quatre chapitres. Le premier chapitre a pour objet de décrire la cavitation acoustique ainsi que les principaux phénomènes qui y sont reliés, et de présenter les mécanismes sous-jacents à la sonoporation mis en évidence dans la littérature et qui concernent à la fois la cavitation acoustique stable et inertielle. Cette variété de mécanismes mis en avant peut être liée aux différents types de cellules, de bulles (agents de contrastes ultrasonore, bulles de cavitation acoustique ou encore créées par un laser), de molécules à internaliser et de conditions acoustiques. Ceci met en évidence la nécessité de mieux comprendre ces phénomènes afin de pouvoir contrôler les effets biologiques.

Dans le deuxième chapitre, le système de sonoporation adapté à la visualisation en temps réel sous microscope ainsi que le système de régulation de l'activité de cavitation inertielle sont présentés et caractérisés en termes de champ acoustique, d'activité de cavitation inertielle ainsi que de dynamique de bulles.

Le troisième chapitre s'intéresse à la validation du système de sonoporation en termes de sonoporation de cellules adhérentes, de détachement et de mortalité. Après avoir quantifié l'intérêt de réguler l'activité de cavitation inertielle pour améliorer la reproductibilité de la sonoporation, nous étudierons l'effet de paramètres de type biologique, environnemental et acoustique ainsi que la

dépendance spatiale de la sonoporation. Dans un second temps, l'effet à moyen terme des ultrasons et de la sonoporation sur les cellules est exploré à travers la mesure de la reprise de croissance des cellules après insonification.

Finalement, dans le quatrième et dernier chapitre, des investigations plus poussées des phénomènes sont menées au moyen du dispositif d'observation sous microscope validé dans les chapitres précédents. D'une part ce dispositif est mis en oeuvre pour étudier les interactions bulles-membranes en utilisant un modèle de bicouche lipidique fluorescente déposée au fond d'un puits de culture. D'autre part, des travaux sont conduits sur le détachement et la sonoporation des cellules lors des insonifications.

Chapitre 1

Etat de l'art

La transfection, le transfert de gènes à l'intérieure d'une cellule, est une méthode utilisée pour la thérapie génique. Celle-ci consiste à faire pénétrer des gènes dans les cellules ou les tissus d'un individu pour traiter une maladie (inhiber ou activer la production de certaines protéines par exemple). Si la thérapie génique a été imaginée au début pour traiter des maladies héréditaires, elle s'est rapidement développée pour s'étendre à d'autres pathologies dans lesquelles il y a des gènes défectueux : les cancers, les infections virales, les affections cardiaques ou les atteintes traumatiques du système nerveux par exemple.

Il existe différentes méthodes de transfection basées sur des méthodes biologiques virales (Johnson-Saliba et Jans, 2001) et non virales. Les techniques virales donnent de relativement bons résultats *in vitro* et *in vivo*, cependant elles peuvent causer des réactions immunitaires ou être toxiques. Les techniques non virales sont par exemple la lipofection (transfert de gènes via un système complexe d'ADN et de lipides cationiques) responsables d'effets secondaires minimisés mais aussi d'une transfection peu efficace avec une délivrance spatiale et temporelle non contrôlée (Mehier-Humbert *et al.*, 2005a,b; Chen *et al.*, 2004). Les liposomes et les mixtures lipide-plasmide sont les agents de délivrance de gènes non-viraux les plus populaires : ils sont robustes, faciles à préparer, peuvent délivrer de larges molécules d'ADN et ont une réponse immunogénique faible. Cependant ils sont peu efficaces *in vivo* et ne peuvent pas être ciblés dans des tissus spécifiques sans molécules vecteurs comme des anticorps (Zhao *et al.*, 2008). Il existe aussi des méthodes chimiques comme l'utilisation de lipides cationiques (Brown *et al.*, 2001) ou des drogues conjuguées (Fischer *et al.*, 2001), ainsi que des méthodes physiques comme l'électroporation ou la sonoporation (Miller *et al.*, 1996). L'électroporation, bien qu'efficace *in vitro*, est invasive et difficile à appliquer aux tissus en profondeur et aux organes *in vivo* (Chen *et al.*, 2004). La sonoporation consiste à utiliser les ultrasons pour augmenter la perméabilité de la membrane cellulaire et ainsi permettre l'entrée de molécules à l'intérieur. L'utilisation des ultrasons pour la transfection est intéressante pour les expérimentations *in vivo*. En effet, l'utilisation de transducteurs focalisés permet une approche non invasive et un effet localisé. Ainsi, cette méthode présente l'avantage d'être applicable à une grande variété de cellules, aux tissus et organes. Escoffre *et al.* (2010) combine ces deux méthodes physiques dans le but de diminuer la mortalité par l'électroporation et d'améliorer le taux de transfection par la sonoporation.

L'électroporation induit la formation d'agrégats d'ADN sur la membrane et la sonoporation induit leur propulsion directe dans le cytoplasme. Toutefois cette méthode est adaptée pour la transfection in vitro.

Le principal phénomène physique impliqué dans la sonoporation est la cavitation acoustique. Ce phénomène complexe peut induire différents effets pouvant être impliqués dans la poration des cellules. La sonoporation est une technique prometteuse cependant il faut définir clairement les mécanismes mis en oeuvre afin de pouvoir contrôler les effets biologiques induits. Ce chapitre fera donc un état de l'art de la cavitation acoustique ainsi que des différents phénomènes qui y sont associés. Puis, dans une seconde partie, les mécanismes impliqués dans la sonoporation sont évoqués.

1.1 La cavitation acoustique

La cavitation acoustique peut être définie comme l'interaction entre un champ ultrasonore dans un milieu et une inclusion gazeuse dans le milieu insonifié (Miller *et al.*, 1996). En effet, sous l'action du champ acoustique dans un liquide, il peut y avoir nucléation de bulle de vapeur ou de gaz. En pratique, dans tous les liquides il existe une distribution de petits nucléi de gaz qui servent de sites de nucléation pour la cavitation acoustique (Flynn, 1984). Dans cette section, les équations décrivant la dynamique de bulle de gaz cavitantes sont présentées.

1.1.1 Dynamique spatio-temporelle d'une bulle

Pour mieux cerner la physique complexe du phénomène de cavitation acoustique, il est utile de ne s'intéresser, dans un premier temps, qu'à la physique d'une bulle. En partant du postulat que cette bulle existe, de manière stable, dans un liquide infini, elle peut osciller sous l'action de l'onde ultrasonore, se déplacer et implorer. En ce qui concerne la phase de nucléation de cette bulle, le lecteur pourra se référer à la littérature exhaustive sur le sujet, dont (Flynn, 1984; Brennen, 1995).

Oscillations radiales de bulle

Soit une bulle sphérique, plongée dans un liquide incompressible qui s'étend à l'infini, et soumis à une onde acoustique de pression $p(t)$. En ne s'intéressant qu'à ses oscillations purement radiales, sa dynamique est régie par l'équation de Rayleigh-Plesset (Plesset, 1949), où sont négligées la tension de surface de la bulle et la viscosité du liquide,

$$R\ddot{R} + \frac{3}{2}\dot{R}^2 = \frac{1}{\rho} \left(p_{g_0} \left(\frac{R_0}{R} \right)^{3k} - P_{stat} - p(t) \right) \quad (1.1)$$

où R est le rayon instantané de la bulle et R_0 le rayon d'équilibre de la bulle, ρ est la masse volumique du liquide, $p_{g_0} \left(\frac{R_0}{R} \right)^{3k}$ représente la pression partielle instantanée du gaz dans la bulle., k l'exposant polytropique et P_{stat} la pression statique. $p(t) = p_a \sin(2\pi\nu_a t)$ avec p_a l'amplitude de la pression acoustique et ν_a la fréquence de l'excitation. En l'absence de tension de surface $p_{g_0} = P_{stat}$, l'équation de Rayleigh-Plesset s'écrit :

$$R\ddot{R} + \frac{3}{2}\dot{R}^2 = \frac{1}{\rho} \left(P_{stat} \left(\frac{R_0}{R} \right)^{3k} - P_{stat} - p(t) \right). \quad (1.2)$$

L'équation (1.2) est une équation non linéaire, dont la solution linéarisée permet de décrire les oscillations de faibles amplitudes d'une bulle autour de son rayon d'équilibre. En posant $R(t) = R_0 + r(t)$, avec $r(t) \ll R_0$, la forme linéarisée de (1.2) est :

$$\ddot{r} + \omega_0^2 r = \frac{-p(t)}{\rho R_0} \quad (1.3)$$

avec $\omega_0^2 = \frac{3kP_{stat}}{\rho R_0^2}$. Une bulle d'air dans l'eau se comporte alors comme un oscillateur harmonique non amorti de fréquence propre :

$$f_0 = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{3kP_{stat}}{\rho R_0^2}} \quad (1.4)$$

Dans l'eau cette relation est approximée par $f_0 R_0 = 3$. Pour $P_{stat} = 1$ bar, $\rho = 1000$ kg/m³, dans le cas isotherme ($k = 1$) alors $f_0 R_0 = 2,76$ et dans le cas adiabatique ($k = 1,4$) alors $f_0 R_0 = 3,26$. La forme approximée $f_0 R_0 = 3$ permet de raisonner rapidement sur les rayons résonants de bulles générées pour une excitation acoustique de fréquence donnée.

Par la suite, Noltingk et Neppiras (1950) ont introduit l'effet de la tension de surface de la bulle dans cette équation en utilisant la formule de Laplace à l'interface liquide-gaz :

$$R\ddot{R} + \frac{3}{2}\dot{R}^2 = \frac{1}{\rho} \left(p_{g0} \left(\frac{R_0}{R} \right)^{3k} - P_{stat} - \frac{2\sigma}{R} - p(t) \right) \quad (1.5)$$

Dans ce cas $p_{g0} = \frac{2\sigma}{R_0} + P_{stat}$, et σ est la tension de surface. Dans cette configuration la bulle se comporte toujours comme un oscillateur harmonique non amorti.

Puis, (Poritsky, 1952) a pris en compte la viscosité du fluide externe sur la dynamique de la bulle :

$$R\ddot{R} + \frac{3}{2}\dot{R}^2 = \frac{1}{\rho} \left(p_{g0} \left(\frac{R_0}{R} \right)^{3k} - P_{stat} - \frac{2\sigma}{R} - \frac{4\mu}{R} \dot{R} - p(t) \right) \quad (1.6)$$

où μ est la viscosité cinématique du liquide. Dans cette configuration, la bulle se comporte comme un oscillateur harmonique amorti. Lauterborn (1976) a suggéré l'appellation RPNNP pour cette équation en référence à ses auteurs : Rayleigh, Plesset, Noltingk, Neppiras et Poritsky. Elle est aussi appelée équation de Rayleigh-Plesset généralisée.

Le modèle de Keller-Miksis prend en compte la compressibilité de la bulle par l'ajout d'un terme de pression rayonnée par la bulle (Keller, 1980), ce qui modifie l'équation de dynamique de la bulle :

$$\left(1 - \frac{\dot{R}}{c} \right) R\ddot{R} + \frac{3}{2}\dot{R}^2 \left(1 - \frac{\dot{R}}{3c} \right) = \left(1 + \frac{\dot{R}}{c} \right) \frac{p_1}{\rho} + \frac{R}{\rho c} \frac{dp_1}{dt} \quad (1.7)$$

où

$$p_1 = p_{g0} \left(\frac{R_0}{R} \right)^{3k} - P_{stat} - \frac{2\sigma}{R} - \frac{4\mu}{R} \dot{R} - p(t) \quad (1.8)$$

L'équation de Keller-Miskis peut être modifiée pour prendre en compte l'effet de l'énergie cinétique du gaz dans la bulle (Yasui, 1997).

Pour de petites oscillations à des oscillations faiblement non linéaires, la bulle est en régime de cavitation stable (ou non inertielle) et est soumise au phénomène de diffusion rectifiée. Les oscillations fortement non linéaires peuvent mener à l'implosion de la bulle et sont responsables de phénomènes comme des oscillations chaotiques et la génération de bruit large bande. La bulle est donc dans ce cas en régime de cavitation inertielle. Le seuil de cavitation inertielle, séparant ces deux régimes est intéressant à étudier. En pratique, il est défini par une condition sur le rayon de la bulle, $R_{max} = 2, 3R_0$, ou sur la vitesse de sa paroi, $V_{bulle} > V_{son}$. Une carte délimitant ces deux régimes, permettant une lecture facile, est présentée sur la Figure 1.1 pour différentes conditions de rayons et de pressions acoustiques.

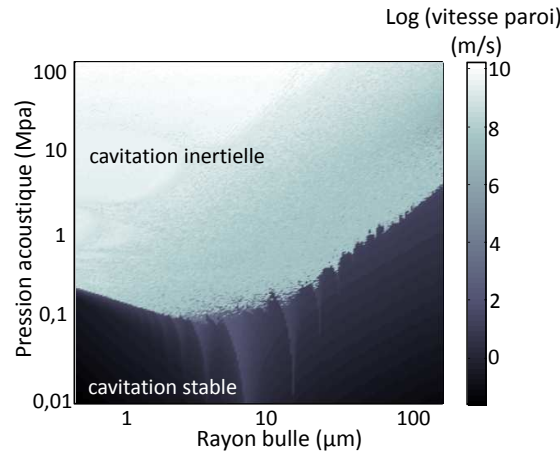


FIGURE 1.1 – Évolution de la vitesse maximale atteinte par la paroi de la bulle pour des conditions initiales de pression acoustique (0,01 à 100 MPa) et de rayon de bulle (0,5 à 150 μm) à 500 kHz.

En présence d'un champ acoustique et en régime de cavitation stable, la bulle de cavitation oscille et va voir son rayon augmenter par diffusion rectifiée. Cet augmentation du rayon de la bulle est lié à deux effets : l'effet de volume et l'effet de couche. Lorsque la bulle se contracte, le gaz à l'intérieur est à une pression plus importante que lorsque la bulle est à son rayon d'équilibre et donc il y a diffusion de gaz dissous de la bulle vers le liquide. Lors de la phase d'expansion, c'est l'inverse et il y a diffusion du gaz dissous du liquide vers l'intérieur de la bulle. Comme le flux de gaz est proportionnel à la surface d'échange, il y a plus de diffusion de gaz vers la bulle lors de la phase d'expansion que vers le liquide lors de la phase de contraction. De plus, lors de la phase d'expansion de la bulle, la couche de liquide autour de la bulle est comprimée et contient alors une plus grande concentration de gaz dissous et un gradient de concentration plus élevé. Ceci tend à renforcer la plus grande entrée de gaz dissous dans

la bulle lors de son expansion (Leighton, 1994). Les micro-écoulements acoustiques générés par des oscillations de surface de la bulle tendent à emmener le liquide au plus près des parois des bulles et donc à augmenter la vitesse de grossissement (Leighton, 1995; Crum, 1980). La diffusion rectifiée tend à "amener" la population de bulles autour du rayon résonant.

Implosion de bulle

Lorsque la pression acoustique augmente, la bulle de cavitation grossit de manière explosive jusqu'à atteindre plusieurs dizaines de fois son rayon d'équilibre. L'inertie du liquide est responsable de la diminution drastique de la taille de la bulle (implosion) qui est suivie de plusieurs rebonds. Chomas *et al.* (2001) suggère que si l'énergie transférée durant l'implosion n'est pas suffisamment dissipée durant un cycle acoustique lors du rebond alors la bulle va devenir instable et va se fragmenter en plusieurs plus petites bulles. Selon Brennen (2002), le nombre de bulles filles créées lors de l'implosion d'une bulle est lié aux modes de surface de la bulle et le nombre de bulles est $N = n^3$, où n représente le mode de surface présentant le maximum de distorsions. Selon ce modèle, la fragmentation d'une bulle est prédictible mais la nucléation et la coalescence aléatoire des bulles et le mouvement aléatoire de celles-ci fait de la fragmentation des bulles un processus aléatoire non prédictible (Yasui *et al.*, 2010).

En présence d'une dissymétrie du milieu (présence d'une paroi rigide par exemple), l'implosion de la bulle forme un jet liquide quand une bulle se contracte. Un jet liquide à grande vitesse peut alors se former et est projeté vers la paroi. L'implosion asymétrique fait que la vitesse de la partie supérieure de la paroi de la bulle est plus grande que celle de la partie inférieure pour conserver l'impulsion du système bulle/fluide. En conséquence, le volume de liquide au-dessus de la bulle est accéléré et dirigé durant l'implosion, menant à la formation d'un jet liquide vers la frontière (Postema *et al.*, 2004). La direction du jet peut être influencée par la présence de bulles à proximité. Dans ce cas le jet s'orientera en direction de la bulle la plus proche (si la bulle à proximité est de même taille ou plus grosse et donc vue comme une "paroi"). En l'absence de frontière c'est dans la direction de l'onde de pression (pression de radiation) qu'aura lieu le jet (Wolfrum *et al.*, 2002; Leighton, 1995).

L'implosion violente de la bulle peut mener à la formation d'ondes de choc, à des compressions et températures très élevées et donc à la génération de flash lumineux ou sonoluminescence (Taleyarkhan *et al.*, 2002). Durant l'implosion l'énergie est centrée à l'intérieur de la bulle et peut engendrer des effets comme des points chauds gazeux ou des chocs de gaz responsables de la génération de radicaux libres (Leighton, 1995). Au niveau chimique, la sonolyse de l'eau permet la formation de radicaux OH^\bullet , qui peuvent être utilisés comme marqueurs de l'implosion des bulles (Villeneuve *et al.*, 2009).

Translation de bulle

En présence d'un champ acoustique, une bulle oscillante va absorber et diffuser l'onde acoustique incidente. Dans le cas d'une onde propagative, on peut s'attendre à ce que la pression de radiation pousse la bulle dans la direction des ondes acoustiques. Dans le cas d'une onde acoustique stationnaire, la contribution des ondes voyageant dans les deux sens s'annulent à certaines positions du champ acoustique. La force de radiation dans ce cas est appelée force de Bjerknes primaire et les positions

où cette force s'annule correspondent aux nœuds et aux ventres de la pression acoustique (Leighton, 1994).

En partant d'un cas simple où le champ de pression est unidimensionnel :

$$P_a(x, t) = -P_a \sin\left(\frac{2\pi x}{L}\right) \cos(\omega t), \quad (1.9)$$

Une bulle de rayon $R(t)$ est soumise à la force de Bjerknes primaire instantanée :

$$F_{Bj} = \frac{-4}{3} \pi R^3 \nabla P_a \quad (1.10)$$

qui s'écrit après linéarisation de l'équation de Rayleigh-Plesset :

$$F_{Bj} = \frac{-4}{3} \pi R_0^3 (1 + 3\epsilon \cos(\omega t)) P_a \frac{2\pi}{L} \cos\left(\frac{2\pi x}{L}\right) \cos(\omega t) \quad (1.11)$$

$$\text{avec } \epsilon = \frac{P_a \sin\left(\frac{2\pi x}{L}\right)}{\rho R_0^2 (\omega_0^2 - \omega^2)}.$$

En faibles amplitudes d'oscillations, la translation d'une bulle, qui se réalise sur un temps caractéristique très grand devant la période acoustique, est découplée de ses oscillations radiales. En prenant ainsi la moyenne de (1.11) sur une période acoustique, il vient :

$$\langle F_{Bj} \rangle_{T=} = \frac{-2\pi^2 P_a^2 \sin\left(\frac{4\pi x}{L}\right) R_0^3}{L \rho R_0^2 (\omega_0^2 - \omega^2)}. \quad (1.12)$$

L'expression de (1.12) de la force de Bjerknes primaire exercée sur une bulle présente deux caractéristiques intéressantes. La première est le doublement de la période spatiale par rapport à celle de l'onde de pression acoustique. L'annulation du terme $\sin\left(\frac{4\pi x}{L}\right)$ permet d'obtenir les positions

d'équilibre de bulles, soit $\left\{ \begin{array}{l} x = L/4 \\ x = L/2 \\ x = 3L/4 \end{array} \right\}$, comme étant les nœuds et les ventres de pression acoustique.

La seconde particularité est la dépendance du signe de la force appliquée avec le rayon d'équilibre R_0 , par l'intermédiaire du terme $\omega_0^2 - \omega^2$.

Une analyse, par perturbations des solutions d'équilibre et études des convergences ou divergences des solutions obtenues, permet de montrer simplement que les ventres de pression acoustique (ici pour $x = L/4$ et $x = 3L/4$) sont des positions d'équilibres stables pour des petites bulles $R < R_{res}$, ou de manière analogue $\omega_0^2 - \omega^2 > 0$. De même, les nœuds de pression acoustique (ici $x = L/2$) sont des positions d'équilibres stables pour les grosses bulles $R > R_{res}$, ou $\omega_0^2 - \omega^2 < 0$. Il est à noter qu'une position stable pour une taille de bulle (par exemple $R < R_{res}$) est instable pour l'autre ($R > R_{res}$). Une représentation de la force de Bjerknes primaire appliquée sur une bulle dans un champ de pression acoustique (1.9) est donnée en Figure 1.2. La stabilité d'une position d'équilibre, selon la taille de la bulle considérée, peut aussi être déduite de la lecture graphique du gradient de force (correspondant à une dérivée seconde sur l'énergie) au voisinage de cette position.

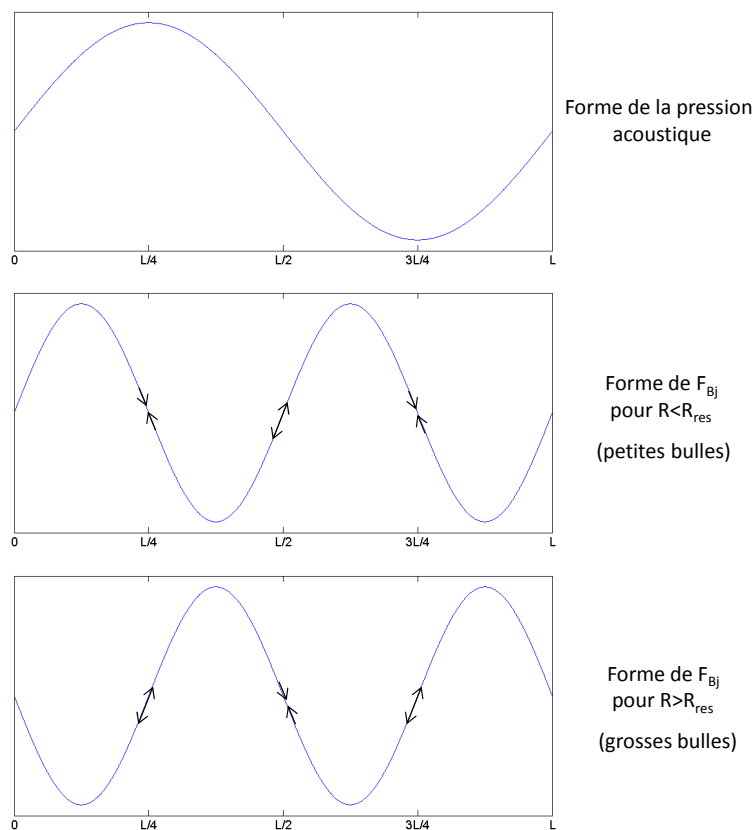


FIGURE 1.2 – Forme de la force de Bjerknes primaire pour des bulles de rayon inférieur et supérieur au rayon résonant et lecture graphique de la stabilité des positions d'équilibre.

La vitesse de translation d'une bulle plus petite que la taille de résonance peut être plusieurs fois plus grande que la vitesse de remontée de la bulle en l'absence de champ acoustique (Crum et Eller, 1970). Cette particularité est exploitée dans les expériences de piégeage de bulles (Rogers et Neild, 2011).

Pour des amplitudes de pression suffisamment élevées, cette vision simplifiée des translations de bulles est mise en défaut par la nécessité de prendre en compte les couplages entre les oscillations radiales de bulles et leur mouvement de translation (Doinikov, 2002). Ce couplage est à l'origine d'instabilités de translations, qui peuvent, par exemple dans le cas de bulles de rayon inférieur au rayon résonant $R < r_{res}$, les faire osciller autour d'un nœud de pression acoustique qui est leur position linéaire d'équilibre instable. Ces bulles, forcées par le champ acoustique à osciller autour d'une position d'équilibre statique instable, peuvent présenter des trajectoires erratiques (dancing bubbles) ou des trajectoires spiralante dans le cas d'une cuve cylindrique (Desjoux *et al.*, 2013a).

Les oscillations de la bulle, leur possible translation, ou alors la combinaison de ces deux phénomènes, peuvent être à l'origine de micro-écoulements autour de la bulle. Un corps oscillant dans un fluide visqueux génère des fluctuations de la vitesse et la pression du fluide autour de lui. Dans le cas d'une bulle de gaz, on parle de microstreaming. Ce phénomène n'est pas à confondre avec le streaming acoustique qui est relié à l'atténuation de l'énergie acoustique quand une onde acoustique

passé à travers un fluide (Tho *et al.*, 2007). La forme du flux de microstreaming observée dépend du mode d'oscillation de la bulle. Ces modes incluent les oscillations de translation (quand la bulle bouge périodiquement le long d'un ou plusieurs axes), les oscillations de volume (quand la bulle s'étend et se contracte radialement en conservant sa forme sphérique) et les mode de surface à fréquence plus élevée. La majorité des formes de streaming montrent une régularité ou une symétrie liée à ces modes d'oscillation. Les régimes de microstreaming de cavitation varient en fonction de la viscosité du liquide et l'amplitude de l'onde acoustique (Elder, 1959) mais aussi de la fréquence (Tho *et al.*, 2007).

1.1.2 Cas d'un nuage de bulles

En pratique, il y a génération d'un nuage de bulles de cavitation et non d'une bulle unique. Ces bulles s'organisent en structures qui forment des clusters de quelques bulles ou des formes filamenteuses de bulles. Ces formes du nuage de bulles sont dues à des forces d'attraction et de répulsion par l'interaction avec les champ acoustique et avec les autres bulles (Parlitz *et al.*, 1999).

Oscillations radiales des bulles

Yasui *et al.* (2008, 2010) a pris en compte la présence d'autres bulles sur la dynamique d'une bulle. Pour cela, il pose l'hypothèse d'une population de bulles de même rayon et réparties de manière homogène, et introduit l'interaction des autres bulles sous la forme d'un terme de couplage. Cette équation est présentée en négligeant l'effet de l'énergie cinétique du gaz dans la bulle (qui est pris en compte dans (Yasui *et al.*, 2008, 2010)).

$$\left(1 - \frac{\dot{R}}{c}\right) R\ddot{R} + \frac{3}{2}\dot{R}^2 \left(1 - \frac{\dot{R}}{3c}\right) = \left(1 + \frac{\dot{R}}{c}\right) \frac{p_1}{\rho} + \frac{R}{\rho c} \frac{dp_1}{dt} - \frac{1}{d} \left(2\dot{R}_b^2 R_b + R_b^2 \ddot{R}_b\right) \quad (1.13)$$

Le terme de couplage est ici introduit dans l'équation de Keller-Miksis, avec d la distance entre les bulles et R_b le rayon instantané des bulles composant le nuage. Ce terme de couplage peut être généralisé à N bulles :

$$- \sum_{i=1}^{N-1} \frac{1}{d_i} \left(2\dot{R}_i^2 R_i + R_i^2 \ddot{R}_i\right) \quad (1.14)$$

Les oscillations des bulles vont avoir des amplitudes plus faibles lorsqu'il y a des interactions entre les bulles (Yasui *et al.*, 2008) car la présence de bulles voisines va limiter le grossissement de la bulle. La fréquence de résonance linéaire d'un nuage de bulles est bien inférieure à celle d'une bulle individuelle de ce nuage. Celle-ci dépend du nombre de bulle et du rayon du nuage et est essentiellement liée au volume total de gaz du nuage (Omta, 1987).

Le régime de cavitation inertielle est caractérisé par l'apparition d'un bruit large bande sur le spectre. Selon Frohly *et al.* (2000), ce bruit large bande peut être attribué à de fortes oscillations chaotiques des bulles et des émissions d'ondes de choc par l'implosion des bulles. Pour Yasui *et al.* (2010), l'origine principale du bruit large bande est la fluctuation temporelle du nombre de bulles dans le milieu et non les pulsations chaotiques des bulles. Ainsi, les bulles en régime de cavitation inertielle

gènèrent du bruit large bande en se fragmentant en autres bulles car cela induit des fluctuations dans le nombre de bulles.

Translation des bulles

La force de Bjerknes secondaire, ou force de radiation secondaire, provient du champ de pression rayonné par une bulle pulsante agissant sur une seconde bulle (Leighton, 1994). De cette force résulte soit une attraction entre les deux bulles oscillantes, soit une répulsion, en fonction du déphasage des oscillations. Deux bulles s'attirent si elles oscillent en phase (toutes les deux en dessous ou au dessus au rayon résonant), ou se repoussent lorsqu'elles sont en opposition de phase (l'une en dessous et l'autre au-dessus du rayon résonant) (Leighton, 1994).

La force de Bjerknes secondaire va également amplifier le phénomène de coalescence. La coalescence est la fusion de deux microbulles ou plus. Comme les bulles adjacentes grossissent, la pression dans le film d'eau entre elles augmente causant une déformation de la surface de la bulle. Le grossissement de la bulle cause un drainage (assèchement) du film. Ceci continue jusqu'à une finesse critique du film de $0.1 \mu\text{m}$, à laquelle les forces attractives de Van der Waals causent la rupture du film et la coalescence des bulles (Postema *et al.*, 2004).

1.1.3 La cavitation, un phénomène aléatoire...

La cavitation acoustique présente un caractère aléatoire, que ce soit dans son initiation ou dans son maintien au cours de l'excitation acoustique. Un exemple de ce comportement stochastique est présenté sur la Figure 3.4. Sur cette figure, le niveau de cavitation inertielle (ici le niveau du bruit large bande) mesurée par un hydrophone est tracé en fonction de l'intensité acoustique. Le niveau de cavitation inertielle est très variable.

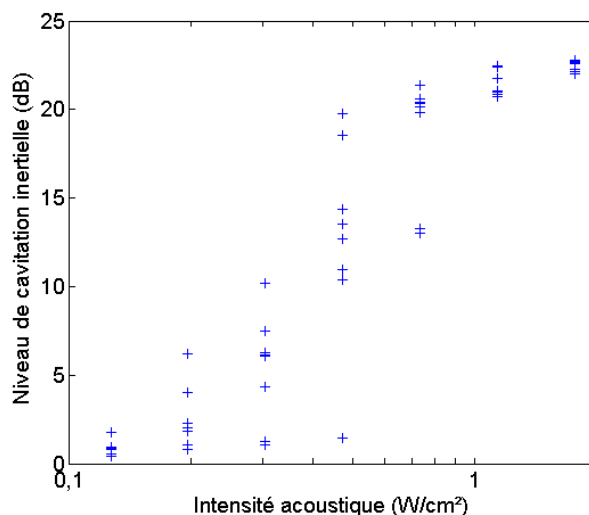


FIGURE 1.3 – Exemple du niveau de cavitation inertielle mesuré pour différentes intensités acoustiques.

Cette variabilité provient de la forte dépendance de l'initiation et du maintien du phénomène de cavitation aux conditions initiales, telles que le taux de gaz dissout, la distribution initiale de nuclei

et certains paramètres extérieurs (pression et température ambiante par exemple).

Dépendance taux de gaz, nuclei, paramètres extérieurs

Si dans l'absolu, la cavitation acoustique désigne la création de cavité par un abaissement de la pression à température constante et ainsi la vaporisation du liquide, dans tous les liquides il existe une distribution de petits nuclei de gaz qui servent de sites pour la cavitation acoustique. Il existe deux types de nucléation de la cavitation acoustique. Dans un liquide pur, la nucléation homogène consiste en des vides éphémères qui se forment à cause des mouvements thermiques des molécules dans le liquide, et la nucléation hétérogène décrit la nucléation qui peut se faire à l'interface entre le liquide et une limite solide (Brennen, 1995). Il peut aussi y avoir des particules de la taille d'un demi-micron qui polluent le liquide. Des bulles microscopiques de gaz polluant peuvent être présentes soit dans des fissures sur la surface du solide soit librement en suspension dans le liquide (Brennen, 1995). Ces bulles préexistantes sont appelés nuclei "stabilisés" car ils résistent à la dissolution. Par opposition, quand une bulle implose, elle peut rebondir ou se fragmenter en plusieurs petites bulles de gaz qui peuvent se comporter comme des sites de cavitation. Ces nucléi ne sont pas stabilisés contre la diffusion et sont appelés nuclei "non stabilisés". La densité de nuclei générés est beaucoup plus grande que la densité de nuclei stabilisés présents à l'origine dans le liquide (Flynn, 1984). Il existe plusieurs explications sur la résistance à la dissolution de ces nuclei "stabilisés". Les bulles peuvent être stabilisées dans des fissures (dans le cas où celles-ci sont hydrophobes) ou des impuretés (Yilmaz, 1976). Yount (1982) a émis l'hypothèse que ces nuclei ne se dissolvent pas car ils sont pourvus d'une membrane élastique ou composée de molécules de surface actives, qui sont généralement imperméables mais peuvent devenir perméables si la pression augmente rapidement et suffisamment.

Le taux de gaz dans le milieu influence le seuil de nucléation. Il correspond à la contrainte acoustique minimum pour former une bulle. Si le liquide est dégazé le seuil de nucléation sera plus élevé. Celui-ci est lié à la concentration en particules plutôt qu'à leur taille (Roy *et al.*, 1990). La nucléation et le maintien de la cavitation acoustique sont également dépendant de paramètres extérieurs comme la température et la pression ambiante. En effet, la nucléation et le grossissement des nuclei vers une taille stabilisée est plus rapide quand la température augmente (Brennen, 2005). De même, si la pression atmosphérique est plus faible, l'amplitude de pression négative nécessaire à la nucléation sera plus faible également.

Hystérésis du niveau de cavitation inertielle

La cavitation acoustique est un phénomène fortement non linéaire et donc dépendant fortement des conditions initiales. De plus, à l'échelle d'une bulle, des comportements non linéaires classiques sont observés (génération d'harmoniques) ou bien des comportements non classiques à pression acoustique plus importante (doublement de la période, oscillations chaotiques). En physique non linéaire, il existe de nombreux phénomènes complexes comme le doublement de la période, le démodulation ou des effets mémoire. Un des phénomènes qui pourrait être attendu est un comportement hystérétique de la population de bulle. La présence de cet effet d'hystérésis a donc été investigué sur l'activité de cavitation inertielle.

Un transducteur piézoélectrique plan (fréquence 501 kHz, diamètre 20 mm) est immergé dans une cuve d'eau dégazée (20 L, taux d' O_2 entre 2,3 et 3,7 mg/L). Le transducteur est placé de manière à ce que son axe acoustique soit vertical et couvert par 14 mm d'eau à sa surface (Figure 1.4a). Il génère une onde sinusoïdale continue à l'aide d'un générateur de fonction (HP 33120 A), successivement amplifié par un amplificateur à gain variable (AD 603) et un amplificateur de puissance (50 dB, 200 W, Adece). Les intensités acoustiques délivrées sont comprises entre 0,1 et 12,8 W/cm^2 . Le milieu insonifié, composé de 2 mL d'eau dégazée à température ambiante, est placé dans un des puits d'une plaque de culture en polystyrène (12 puits, diamètre 20 mm, BD sciences). Ce puits est placé au-dessus du transducteur et sa hauteur est ajustée afin que la surface du liquide corresponde à un nœud de pression acoustique dans le champ stationnaire du milieu irradié. Un hydrophone (fréquence de coupure 10 MHz) réalisé avec un film PVDF (diamètre 10 mm) moulé dans la résine (AY 103, Araldite) est placé à côté du transducteur afin de mesurer le bruit de cavitation dans le milieu exposé. Le signal reçu est amplifié (20 dB, NF Electronic Instrument $\text{\textcircled{R}}$ BX31), numérisé (carte d'acquisition PXI-5620, résolution de 14 bits, fréquence d'échantillonnage 32 MHz, National Instrument $\text{\textcircled{R}}$) et transféré à un ordinateur et analysé par le logiciel Labview $\text{\textcircled{R}}$.

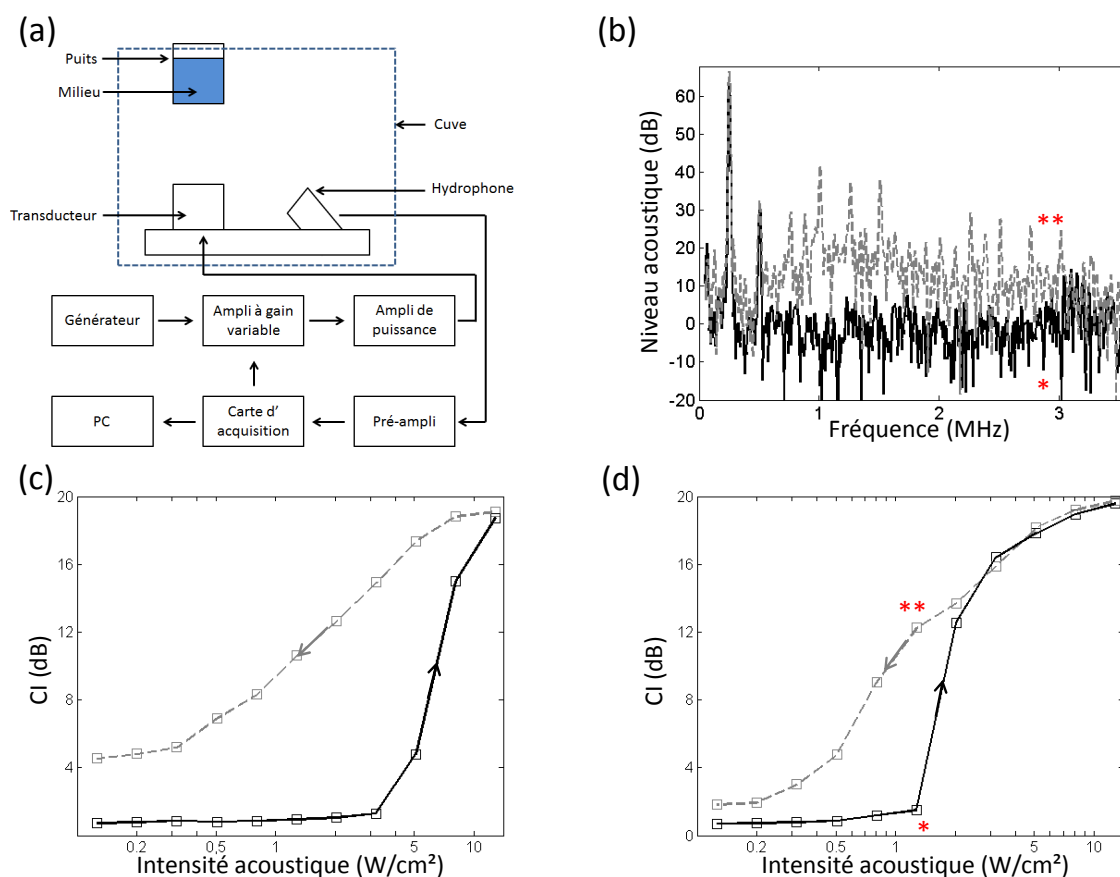


FIGURE 1.4 – Hystérésis de l'indice de cavitation inertielle en fonction de l'intensité acoustique : a/ schéma expérimental, b/ deux exemples de spectres obtenus pour la même intensité acoustique pour une intensité acoustique croissante et décroissante (série de mesure présentée en d/) et c/ et d/ deux exemples d'hystérésis mesurés.

Le niveau de cavitation inertielle correspond au niveau moyen des spectres instantanés en dB pour les fréquences entre 0,1 et 7,1 MHz auquel on a soustrait le niveau moyen de spectres instantanés obtenus sans excitation acoustique. Cette méthode est détaillée dans Sabraoui *et al.* (2011).

Le niveau est quantifié par l'indicateur CI, dont une description plus détaillée sera fournie au chapitre 2. Dans cette partie, seul l'aspect qualificatif de l'activité de cavitation inertielle (par l'intermédiaire du paramètre CI) est discuté.

Deux exemples de CI moyens obtenus pour des intensités acoustiques croissantes et décroissantes sont présentés sur les Figures 1.4c et d. Sur ces figures, lorsque l'intensité acoustique augmente, l'indice de cavitation inertielle augmente rapidement autour du seuil de cavitation inertielle autour de 5 W/cm² (Figure 1.4c) ou autour de 2 W/cm² (Figure 1.4d). Lorsque l'intensité acoustique diminue, il y a toujours de la cavitation inertielle pour des intensités acoustiques inférieures au seuil de cavitation inertielle (pour les intensités acoustiques croissantes). Il faut noter que la variation du seuil de cavitation inertielle est liée au comportement stochastique de la cavitation acoustique. Un exemple des spectres utilisés pour la mesure de l'indice de cavitation inertielle est présenté sur la Figure 1.4b. Ces spectres ont été mesurés pour la même intensité acoustique (1,27 W/cm²), l'une pour les intensités acoustiques croissantes et l'autre pour les décroissantes. Le niveau de bruit large bande pour l'intensité acoustique décroissante est bien plus élevé que celui pour l'intensité acoustique croissante (ces spectres correspondent à des CI mesurés sur la Figure 1.4d).

Modèle numérique de la vie et mort d'un nuage de bulles

La boucle d'hystérésis pourrait être interprétée par un effet mémoire du milieu et résulterait donc de la fluctuation dans la distribution de bulles au cours de l'expérience. Cette fluctuation est liée au cycle de vie et de mort du nuage de bulles durant l'excitation acoustique et entre les tirs.

Durant l'excitation acoustique, les mécanismes qui s'appliquent à la bulle dépendent de l'intensité acoustique (I_a) et du rayon de la bulle (R_0). En effet, pour une faible I_a , il y a seulement de la cavitation stable et seul le mécanisme de diffusion rectifiée s'applique sur les bulles. Pour des I_a (en fonction de R_0) plus importantes, la bulle peut être en régime de cavitation inertielle et donc imploser et se fragmenter en plusieurs bulles filles. Pour savoir, en fonction de I_a et R_0 , quel mécanisme s'applique à la bulle, la carte du seuil de cavitation inertielle (Figure 1.1) est utilisée : si la bulle est en dessous du seuil, la diffusion rectifiée s'applique et si elle est au-dessus, la bulle se fragmente.

En partant d'une distribution initiale de bulles pour de l'eau dégazée extrapolée de (Brennen, 1995) (Figure 1.5(a)) et pour une I_a donnée, les bulles en dessous du seuil de cavitation inertielle sont en régime de cavitation stable et la diffusion rectifiée s'applique. L'équation de diffusion rectifiée utilisée modélise l'évolution du rayon d'équilibre de la bulle au cours du temps (Crum, 1980).

$$\frac{dR_0}{dt} = \frac{Dd_1}{R_0} \left[\left\langle \frac{R}{R_0} \right\rangle \left(1 + \frac{4\sigma}{3P_h R_0} \right)^{-1} \left(\frac{c_i}{c_s} - \frac{\langle (R/R_0)^4 (P_g/P_h) \rangle}{\langle (R/R_0)^4 \rangle} \right) \right] \quad (1.15)$$

où D est le coefficient de diffusion du gaz, R_0 le rayon de la bulle à l'équilibre, σ la tension de surface, P_h la pression hydrostatique, c_i et c_s les concentrations initiale et saturée de gaz dissous dans le liquide (respectivement). Le paramètre d_1 et les termes moyennés sur une période acoustique ($\langle \rangle$)

sont donnés dans (Crum, 1980).

Après diffusion rectifiée et pour des I_a plus importantes, certaines bulles peuvent être au-dessus du seuil de cavitation inertielle et donc implosent violemment en se fragmentant en plusieurs bulles filles. Le phénomène de fragmentation n'est toujours pas clairement compris et le nombre de bulles filles générées reste une question ouverte (Lauterborn, 1982; Flynn, 1984). Dans notre étude, comme la fragmentation est un processus aléatoire, le nombre de bulles filles est déterminé par un nombre aléatoire entre 2 et 10. De plus, une condition de continuité du volume entre la bulle implosante et les bulles filles est appliquée.

Entre les excitations acoustiques, les bulles peuvent se dissoudre ou remonter à la surface (en fonction de R_0). En l'absence de champ acoustique, les bulles vont se dissoudre graduellement à cause de la pression interne du gaz requise pour équilibrer la pression $2\sigma/R$ due à la tension de surface (Leighton, 1995). La dissolution des bulles dépend fortement de la concentration en gaz dissous du milieu et est calculée en utilisant l'équation d'Epstein-Plesset (Epstein et Plesset, 1950) :

$$\frac{dR}{dt} = \frac{c_s D}{\rho_g} \left(\frac{c_i}{c_s} - 1 - \frac{2\sigma}{RP_h} \right) \left(\frac{1}{R} + \frac{1}{\sqrt{\pi D t}} \right) \quad (1.16)$$

où ρ_g est la densité du gaz, g l'accélération de la gravité et R le rayon instantané de la bulle.

Les deux principales forces s'exerçant sur la bulles sont la force de trainée, qui s'exerce vers le bas, et la force de poussée, qui s'exerce vers le haut. Puisque le liquide étudié présente une faible viscosité, ces forces ont été déterminées en considérant la bulle comme une sphère vide non oscillante (Lauterborn, 2010). Lorsque la force de poussée devient plus importante que la force de trainée, la bulle remonte. Pour un temps d'arrêt entre les tirs donné, t_{off} , les bulles de rayon supérieur au rayon critique remontent :

$$R_{critique} = \sqrt{\frac{-3\mu h}{g(\rho_g - \rho_l)t_{off}}} \quad (1.17)$$

où μ et ρ_l sont respectivement la viscosité dynamique du liquide et sa masse volumique et h la distance entre la bulle et la surface.

Ces mécanismes ont été implémentés dans un modèle numérique dans lequel des intensité acoustiques croissantes et décroissantes (avec un temps off entre chaque excitation) ont été appliquées en partant d'une distribution initiale de bulles. En fonction de leur rayon et de l'intensité acoustique, la diffusion rectifiée ou la fragmentation est appliquée durant l'excitation acoustique. Cette excitation est divisée en N cycles et donc pour une même intensité acoustique, les bulles peuvent grossir par diffusion rectifiée puis ensuite, si elles sont au-dessus du seuil de cavitation inertielle, se fragmenter. Après excitation, les bulles au-dessus du rayon critique sont enlevées de la distribution de bulles et la dissolution est appliquée aux bulles restantes. Un exemple de distribution de bulles obtenue est présentée sur la Figure 1.5a.

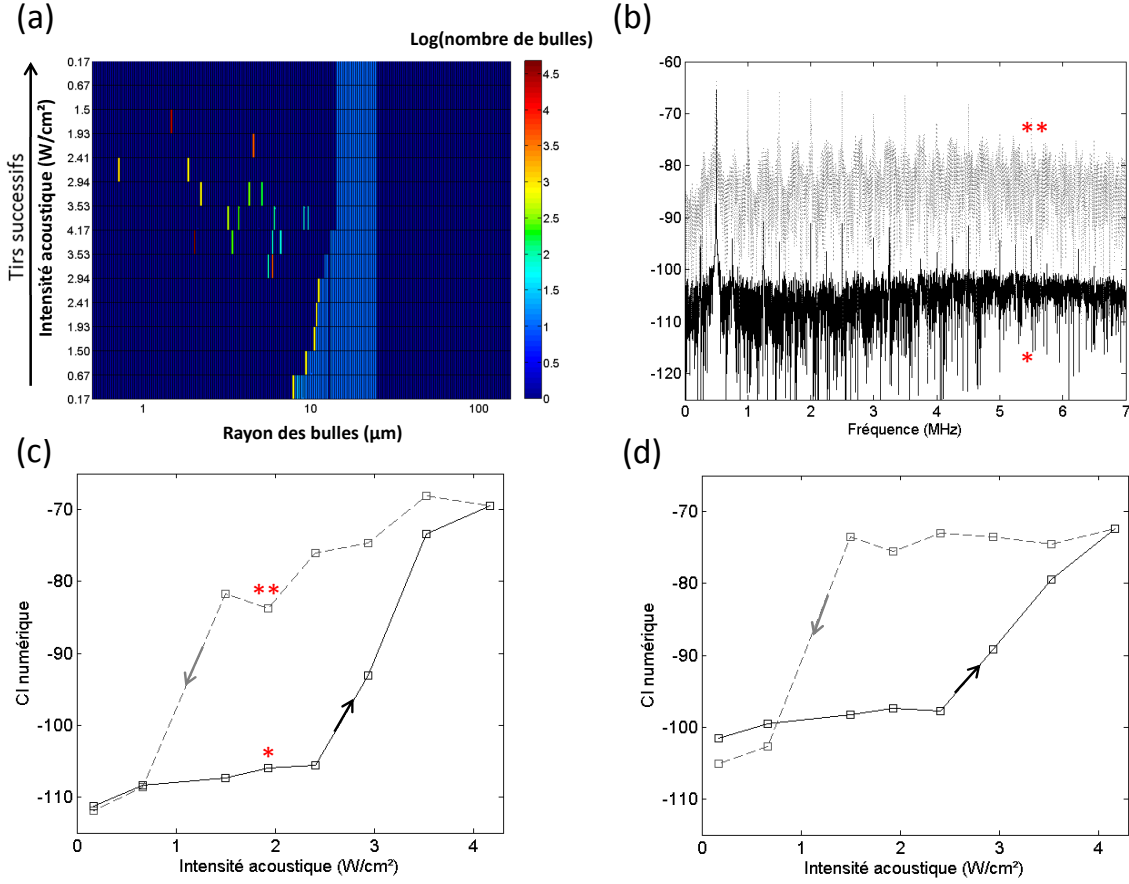


FIGURE 1.5 – a/ Exemple de l'évolution de la distribution de bulles à la fin de chaque tir pour des intensités acoustiques croissantes puis décroissantes, b/ exemples de spectres obtenus à partir de ces distributions de bulles pour une même intensité acoustique (croissante et décroissante) correspondant à deux points de (c), c/ et d/ deux exemples d'hystérésis du CI numérique en fonction de l'intensité acoustique (pour $N=1$).

Afin de déterminer un indice de cavitation inertielle numérique (CI numérique), les spectres des différentes excitations acoustiques doivent être calculés. Pour cela le modèle de Yasui *et al.* (2010) est utilisé. Ce modèle permet de retrouver la pression acoustique émise par le nuage de bulles. Dans ce modèle est considéré un nuage de bulles de même rayon et uniformément réparties.

En présence d'une seule bulle oscillante, la pression de l'onde acoustique émise est :

$$p = \frac{\rho}{r} \left(R^2 \ddot{R} + 2R\dot{R}^2 \right) \quad (1.18)$$

En généralisant à plusieurs bulles oscillant en phase :

$$P = S\rho(R^2 \ddot{R} + 2R\dot{R}^2) \quad (1.19)$$

Le terme S est un terme traduisant les interactions entre les bulles, et est inversement proportionnel à la distance entre les bulles.

$$S = \sum_{i=1}^N \frac{1}{r_i} \quad (1.20)$$

où r_i est la distance de la bulle i .

R et \dot{R} sont calculés avec l'équation de Keller-Miksis avec prise en compte des interactions. Un terme de couplage est ajouté dans le terme de gauche de l'équation de Keller-Miksis. Ce terme peut être vu comme une pression acoustique supplémentaire due au bruit de cavitation :

$$-S(R^2\ddot{R} + 2R\dot{R}^2) \quad (1.21)$$

Le terme S est calculé pour chaque cycle et correspond à $S = S_{moy} + \Delta S$ où S_{moy} désigne pour les N cycles, l'inverse de la distance moyenne entre les bulles et ΔS , la fluctuation de bulles au cours de ces N cycles.

Le passage du signal acoustique dans l'hydrophone est modélisé par un filtre passe-bas du deuxième ordre et la transformée de Fourier de ce signal est calculée pour obtenir le spectre numérique. Ainsi le CI numérique correspond à la moyenne arithmétique des amplitudes en dB du spectre pour des fréquences entre 0,1 et 7,1 MHz.

Un exemple de l'évolution de la distribution de bulles en fonction de l'intensité acoustique est présenté sur la Figure 1.5a. Sur les 5 premières intensités (croissante), il y a seulement de la diffusion rectifiée car il y a un décalage des bulles vers les rayons plus importants. Puis pour l'intensité acoustique 2.84 W/cm^2 , il y a fragmentation et des bulles avec des rayons plus petits sont présents. Lorsque l'intensité acoustique décroît, il y a de la fragmentation (et donc de la cavitation inertielle) jusqu'à 1.83 W/cm^2 . De ces distributions de bulles, les paramètres S et ΔS sont estimés et les spectres numériques résultants calculés. Un exemple des spectres obtenus pour une même intensité (croissante et décroissante) est présenté sur la Figure 1.5b. Ces spectres permettent de calculer le CI numérique (moyenne arithmétique du niveau acoustique du spectre) et deux exemples du CI numérique en fonction des intensités acoustiques croissantes puis décroissantes sont présentés sur les Figures 1.5c et d. Un effet d'hystérésis est retrouvé sur le CI numérique. Ceci montre que les mécanismes pris en compte dans le modèle sont suffisants pour décrire ce phénomène d'hystérésis.

Vers un contrôle de la cavitation acoustique...

Afin de pouvoir utiliser la cavitation acoustique dans des applications thérapeutiques par exemple, il est nécessaire de mieux la contrôler.

Pour cela, dans les expériences de sonoporation par exemple, des agents de contrastes (UCAs) peuvent être ajoutés dans le milieu. Les agents de contrastes sont des microbulles de gaz stabilisées par une paroi biocompatible (protéines, lipides ou polymères). Celles-ci ont un rayon inférieur à $4 \mu\text{m}$. Il existe différents agents de contrastes ultrasonores qui sont commercialisés pour l'imagerie ultrasonore : le Sonovue®, le Definity® ou Sonazoid® par exemple. Ceux-ci peuvent être utilisés comme nucléi de cavitation et permettent une initiation de la cavitation pour une pression acoustique moindre que sans UCAs. Cependant, si leur utilisation dans la sonoporation montre une augmentation des effets biologiques, à forte amplitude, ils augmentent les dommages des tissus et la mortalité des cellules (Chen *et al.*, 2004; Postema *et al.*, 2004). Quelques auteurs ont travaillé sur des processus de contrôle de la température durant des insonification d'Ultrasons Focalisés à Forte Intensité (HIFU) (Hockham *et al.*, 2010) ou sur le rapport cyclique optimal pour maintenir facilement une activité de cavitation

(Thomas *et al.*, 2005). En effet, particulièrement sous l'effet des bulles près du rayon de résonance en régime de cavitation inertielle ou des plus grosses bulles en régime de cavitation stable, il y a augmentation de la température. Celle-ci se traduit par une augmentation de la variance du signal du détecteur passif. Ce système de contrôle consiste à augmenter la pression dans la région focale pour atteindre la variance du signal du détecteur désiré.

Il est également possible d'utiliser le bruit large bande, marqueur de l'implosion des bulles (Frohly *et al.*, 2000), pour contrôler l'activité de cavitation inertielle. En effet, certaines applications thérapeutiques sont plutôt corrélées à la cavitation inertielle (Coussios et Roy, 2008). Pour cela, l'effet d'hystérésis sur le niveau de cavitation inertielle en fonction de l'intensité acoustique pourrait être exploité. En effet, en observant la boucle d'hystérésis ABCDEA présentée sur la Figure 1.6, une solution pour maintenir et contrôler un niveau de cavitation inertielle donné (CI 8 sur la ligne CE) est de moduler en temps-réel l'intensité acoustique appliquée. En partant d'une intensité acoustique initiale ($0,8 \text{ W/cm}^2$), l'obtention du CI 8 nécessite d'augmenter l'intensité acoustique appliquée sur la branche basse de l'hystérésis, jusqu'à dépasser le seuil d'initiation de la cavitation inertielle (point B). Une fois l'activité de cavitation inertielle initiée, le CI 8 est obtenu (point C), mais l'activité de cavitation inertielle peut facilement sauter sur l'autre branche de l'hystérésis à un état de cavitation supérieur (point D) à cause du comportement métastable de ce phénomène. En suivant la branche supérieur et donc en diminuant l'intensité acoustique appliquée, il est possible de retrouver le niveau de cavitation inertielle souhaité CI 8 (point E), avant de répéter ce processus pour des intensités acoustiques reliées aux points A et C. Cette modulation en temps-réel de l'intensité acoustique appliquée est la base d'une technique de contrôle de l'activité de cavitation inertielle par un processus de boucle rétroactive sur le niveau de cavitation inertielle pour des excitations acoustique continues (Sabraoui *et al.*, 2011) et pulsées (Desjouy *et al.*, 2013b).

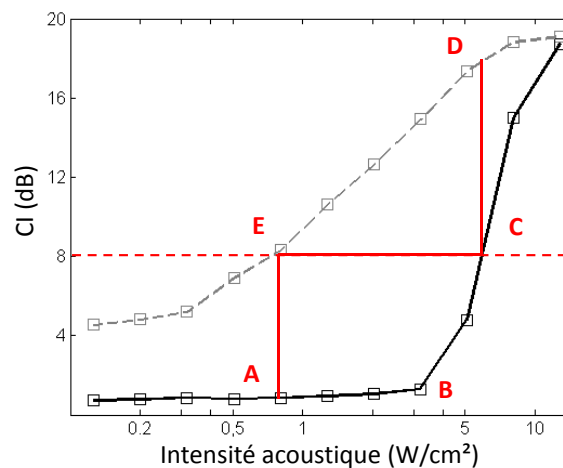


FIGURE 1.6 – Exemple de l'hystérésis du niveau de cavitation inertielle en fonction de l'intensité acoustique.

1.2 Sonoporation des cellules

La sonoporation, ou fragilisation de la membrane cellulaire et sa poration par action indirecte des ultrasons, est un phénomène complexe dont les mécanismes sous jacents ne sont pas encore clairement compris. L'implosion des bulles, mais aussi plus récemment les oscillations non linéaires de bulles, sont généralement admises comme étant les éléments clés générant la poration cellulaire. Différentes études ont été réalisées pour des types de cellules variées, en configuration adhérente ou en suspension. Une différence majeure entre ces deux configurations réside dans les variations morphologiques et mécaniques des cellules : en suspension, elles sont libres de mouvement dans le fluide et plutôt rondes, alors qu'en monocouche, elles adhèrent sur un substrat et s'y étalent plus ou moins. Dans une première partie, une description des propriétés mécaniques des cellules et de leur variation est abordée. Puis, dans une seconde partie, les mécanismes mis en avant dans la sonoporation pour différentes études sont présentés.

1.2.1 Les cellules biologiques

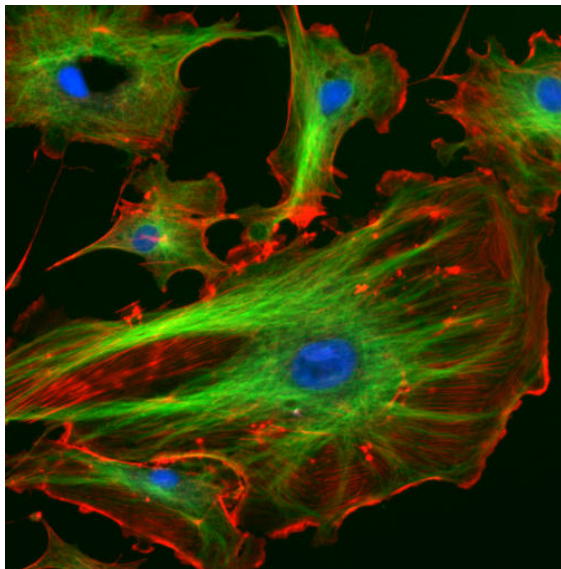


FIGURE 1.7 – Photo de cellules adhérentes en microscopie à fluorescence : le noyau des cellules est coloré en bleu, les microtubules en vert et les filaments d'actine en rouge (ImageJ-Programmpaket, 2010).

Une cellule est composée d'un noyau et d'un cytoplasme entourés d'une membrane cytoplasmique. Il existe des cellules qui par nature vont être adhérentes (et donc adhérer à un substrat comme les cellules épithéliales) et des cellules qui ne sont pas adhérentes mais en suspension (cellules sanguines par exemple). Les cellules adhérentes peuvent être artificiellement mises en suspension, en étant resuspendues à l'aide de produits chimique (la trypsine la plupart du temps) ou alors suite à la mort cellulaire (la cellule va s'arrondir et se détacher). Les travaux présents portent sur les cellules adhérentes en monocouche sur un substrat et dans la littérature citée dans la suite, les cellules en suspension sont des cellules adhérentes resuspendues. Les cellules adhérentes et en suspension

présentent des morphologies ainsi que des propriétés mécaniques très différentes. Ainsi, si les cellules peuvent être considérées soit comme un liquide entouré d'une coque élastique ou comme un solide élastique (Hochmuth, 2000), la cellule adhérente est plutôt considérée comme un solide et la cellule en suspension comme un liquide (Canadas, 2003).

En fait, les propriétés mécaniques de la cellule lui sont essentiellement conférées par son cytosquelette. Celui-ci est un ensemble de polymères biologiques : les filaments d'actines, les microtubules et les filaments intermédiaires. Les composantes du cytosquelette sont renouvelées en permanence par polymérisation et sont à l'origine de la plupart des forces exercées par la cellule pour se déplacer et se nourrir. Il s'apparente donc plus à un ensemble de "muscles" plutôt qu'au "squelette" (Kramer et Tramu, 2003). Ces polymères ont différents rôles. Les filaments d'actine sont par exemple impliqués dans l'adhésion entre les cellules, le maintien de la structure interne de la cellule ou la division cellulaire. Les microtubules jouent un rôle dans la régulation de la forme de la cellule, la migration, la division cellulaire et le transport de composants d'un endroit à l'autre de la cellule. Les filaments intermédiaires, quant à eux, interviennent dans la régulation de la forme de la cellule ainsi que dans son adhérence au substrat (Kramer et Tramu, 2003). Une photo de cellules mettant en évidence les filaments d'actine et les microtubules par microscopie à fluorescence est présentée sur la Figure 1.7.

Il semble exister un lien entre l'organisation architecturale des filaments du cytosquelette et la réponse mécanique cellulaire. Lorsqu'une cellule eucaryote n'adhère pas à un substrat, elle prend une forme arrondie et son cytosquelette s'organise essentiellement au niveau du cortex cellulaire, sans réelle structure définie dans la partie profonde du cytoplasme (Canadas, 2003).

Il existe plusieurs méthodes pour remonter aux propriétés élastiques des cellules : le microscope à force atomique (AFM), le laser à pinces et la micropipette (Hochmuth, 2000). Elles ont chacune leur domaine de mesures : l'AFM ne mesure pas les forces inférieures à 15 pN qui vont être masquées par les fluctuations thermiques, le laser à pinces est limité à 50 pN et la micropipette est valide pour des forces comprises entre 10pN et 1nN. L'AFM présente l'avantage d'avoir une évaluation simultanée des propriétés mécaniques locales et de la topographie des cellules vivantes avec une haute résolution spatiale (Kuznetsova *et al.*, 2007). Les résultats des mesures de propriétés viscoélastiques des cellules sont très variables. Cela est dû à la méthode utilisée ainsi que les conditions expérimentales, le type de cellule, le taux de contraintes ou de déformation appliquée et la taille de la sonde (Canadas, 2003).

Selon Saez *et al.* (2007), le module d'Young (module d'élasticité longitudinal) d'une cellule vivante est en moyenne 10k Pa. Sous changements de conditions extérieures, l'élasticité de la membrane des cellules change plus que leur morphologie. La membrane des cellules au-dessus du noyau est plus souple (2-3 kPa) qu'ailleurs à cause de la rigidité des filaments d'actine (10-20 kPa). Pour des cellules adhérentes à un substrat, l'élasticité est plutôt uniforme (200-700 kPa) (Kuznetsova *et al.*, 2007). Il y a une relation entre la raideur locale et la migration de la cellule. La raideur est plutôt constante pour une cellule immobile mais lorsque la cellule commence à bouger la raideur dans la région du noyau décroît fortement. La raideur d'une cellule est différente en fonction du substrat sur lequel elle adhère. Si la cellule adhère à des protéines extracellulaires, elle remodèle l'actine du cytosquelette et donc module sa raideur à la différence de si elle adhère au verre constituant le fond du puits. L'élasticité va aussi dépendre de la période de culture (et donc du cycle cellulaire) (Kuznetsova *et al.*, 2007).

Pour les cellules épithéliales par exemple, les valeurs de rigidité et de viscosité varient grandement en fonction de l'adhésion. Les mêmes cellules non adhérentes (mesures avec pipette) montrent une rigidité et une viscosité respectivement 10 et 40 fois plus grande que lorsqu'elles sont testées en monocouches adhérentes à un substrat par magnétocytométrie (Canadas, 2003).

Les cellules adhérentes forment des tas dans lesquels les interactions entre les cellules et leur substrat et aussi les interactions entre cellules contribuent à l'adhésion (Peel et DiMilla, 1999). La cellule n'adhère pas de manière continue sur l'ensemble de sa surface en contact avec le substrat mais de façon discrète en des points focaux d'adhérence. L'extension de la membrane est gouvernée par la dynamique du cytosquelette, et plus principalement par les filaments d'actine (Saez *et al.*, 2007). Selon la rigidité du substrat, les points focaux d'adhérence sont différents : ils sont ponctuels, diffus et très dynamiques sur un substrat mou ($E \sim 1$ kPa) alors qu'ils forment des structures stables et allongées sur des substrats plus rigides ($E \sim 100$ kPa) (Saez *et al.*, 2007). Si la rigidité du substrat change, les interactions entre la cellule et le substrat évoluent ce qui induit une réorganisation interne de l'architecture cellulaire et donc éventuellement une évolution de la rigidité de la cellule. La force d'adhésion de cellules et donc la contrainte de cisaillement maximum à appliquer pour ne pas détacher les cellules a été mesurée ou utilisée dans différentes études. Ces valeurs sont présentées dans le Tableau 1.1.

TABLE 1.1 – Exemple de la force d'adhésion ou de la contrainte de cisaillement relevées dans différentes études.

Auteur	cellules	force d'adhésion ou de détachement	aire d'adhésion	contrainte de cisaillement ou de détachement
Yamamoto <i>et al.</i> (1998)	fibroblaste murin L929	350-580 nN	530-860 μm^2	530-750 Pa
Peel et DiMilla (1999)	M210B4 (souris)			22-60 Pa (selon confluence)
Lee <i>et al.</i> (2004)	fibroblaste NIH/3T3 L929	369 nN		
Athanasiou <i>et al.</i> (1999)	chondrocyte (œil lapin)	550 \pm 240 nN		
Sagvolden <i>et al.</i> (1999)	human cervical carcinoma	204 nN		
Francis <i>et al.</i> (1987)	red blood cell	0.5-15 nN	0.2-3.7 μm^2	2500-7000 Pa

La confluence des cellules traduit leur occupation de l'espace. Si dans le puits de culture, tout l'espace est occupé par des cellules alors celles-ci sont à confluence (soit 100% de confluence). La confluence fait varier la contrainte de cisaillement critique de détachement des cellules car elle fait varier les interactions entre cellules. Les cellules isolées se détachent sans affecter leurs voisines car il n'y a pas d'interactions physiques ou chimiques significatives entre elles. Les résultats à très faible et forte confluence en termes de contrainte de cisaillement critique sont du même ordre. Les résultats présentant les plus faibles détachements de cellules correspondent à 10-40% de confluence (Peel et DiMilla, 1999).

La formation de pores est associée à la déformation de la membrane. En effet, la déformation de la membrane induit une augmentation de la tension de la membrane qui peut causer la poration de celle-ci. Les pores créés dans la membrane cellulaire ont des diamètres de l'ordre de 20 à 100 nm (Zhou *et al.*, 2009). Pour d'importantes déformation, une déchirure de la membrane est observée (Zhou *et al.*, 2012). Brayman *et al.* (1999) suggère que la structure de la cellule peut influencer le degré de poration de la membrane et la capacité des cellules insonifiées à survivre. De plus, la réduction de la

température, en réduisant la fluidité des membranes réduit la formation de pores (Mehier-Humbert *et al.*, 2005b).

1.2.2 Mécanismes mis en avant dans les expériences de sonoporation

S'il est généralement admis que la cavitation acoustique est le principal phénomène physique impliqué dans la sonoporation, le mécanisme sous-jacent mis en avant est très différents selon les études. Certains auteurs mettent en avant des phénomènes liés à la cavitation stable et impliquent les oscillations linéaires ou non linéaires des bulles ou bien le microstreaming qui y est associé (Marmottant et Hilgenfeldt, 2003; Chen *et al.*, 2004; Postema *et al.*, 2004; van Wamel *et al.*, 2004, 2006; Kudo *et al.*, 2009; Nejad *et al.*, 2011), alors que pour d'autres la poration des cellules résulte de mécanismes liés à la cavitation inertielle, comme les micro-jets ou les ondes de chocs générés durant l'implosion des bulles (Wolfrum *et al.*, 2002; Ohl et Ikink, 2003; Ohl et Wolfrum, 2003; Sundaram *et al.*, 2003; Deng *et al.*, 2004; Prentice *et al.*, 2005; Ohl *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2008, 2009; Doinikov et Bouakaz, 2010; Zhou *et al.*, 2012). Ces études ont été réalisées sur différents types cellulaires et différents types de bulles (UCAs, bulles naturelles ou créées par un laser). Un résumé des mécanismes proposés ainsi que les types cellulaires et de bulles utilisés est présenté sur le Tableau 1.2.

Cavitation stable

Il y a deux mécanismes principaux mis en avant pour une possible sonoporation de cellules par la cavitation stable. Les bulles près ou sur les cellules les déforment en oscillant et le microstreaming généré par l'oscillation des bulles impose une contrainte de cisaillement à la cellule causant des pores nanométriques dans la membrane.

Les oscillations linéaires des bulles seraient suffisantes pour arriver à la rupture de lipides de la membrane cytoplasmique (Marmottant et Hilgenfeldt, 2003; Postema *et al.*, 2004) et ceci dans un régime où la dynamique des bulles peut être contrôlée. En effet, à faible intensité, le mouvement des bulles et les oscillations linéaires en contact proche de la membrane des cellules peuvent causer des déformations locales et des pores éphémères dans la membrane sans la rompre (Nejad *et al.*, 2011). van Wamel *et al.* (2006) ont observé une corrélation entre la déformation des cellules et la perméabilité de la membrane. Les cellules qui subissent une déformation due à des vibrations de microbulles deviennent localement perméables à de petites molécules extracellulaires. La perméabilité ne dure que sur la courte période de vibration de la bulle (van Wamel *et al.*, 2006). Ces effets ne sont observés que quand les bulles adhèrent à la surface de la cellule (Nejad *et al.*, 2011). De même, Kudo *et al.* (2009) n'observent des pores que là où étaient les bulles.

Il y a un lien entre le taux de transfection induit par des ultrasons à faible intensité et la contrainte de cisaillement associée au microstreaming des microbulles (Qiu *et al.*, 2012). Wolfrum *et al.* (2002) observent que la sonoporation/transfection augmente avec l'augmentation de l'amplitude de pression négative. La contrainte de cisaillement générée par une bulle près d'une cellule peut être calculée comme la contrainte de cisaillement associée à une bulle oscillante près d'une paroi solide. La contrainte augmente de manière monotone avec l'augmentation du pic de pression négative. Il y a sonoporation réversible si la contrainte est inférieure à 100 Pa.

TABLE 1.2 – Mécanismes sous-jacents à la sonoporation/transfection.

Auteur	Type de cellules	dimension (μm)	Type de bulles	Rayon des UCAs / R_{res} (μm)	mécanisme proposé
Marmottant et Hilgenfeldt (2003)	vesicle	10-100	BR14	15-16	oscillations linéaires
Chen <i>et al.</i> (2004)	HeLa		Definity	1-3	microstreaming et contrainte de cisaillement induit
van Wamel <i>et al.</i> (2004, 2006)	endothelial	10-50	BR14	1-12	oscillations bulles proche des cellules
Okada <i>et al.</i> (2005)	endothelial	10-50	Levovist	1	oscillations des bulles
Forbes <i>et al.</i> (2008)	CHO (ovaires d'hamster)		Optison	3-4	microstreaming dû oscillation linéaires des UCAs
Yang <i>et al.</i> (2008)	MCF7		Microbulles encapsulées		contrainte cisaillement UCAs près cellules ou stimulation endocytose par UCA
Kudo <i>et al.</i> (2009)	endothelial	10-50	Levovist	1	sonoporation quand bulle attachées cellules oscillations et petits jets
Nejad <i>et al.</i> (2011)	lymphome hystiocityque	15	Sonazoid	2-3	oscillations linéaires proche cellule
Qiu <i>et al.</i> (2012)	MCF7		UCAs		correlation contrainte cisaillement dû au microstreaming / transfection
Wolfrum <i>et al.</i> (2002)	fibroblaste (rat)	10	Levovist	1	cavitation inertielle, jets
Ohl et Wolfrum (2003)	HeLa			250	ondes de chocs
Sundaram <i>et al.</i> (2003)	3T3 (souris)			150, 50, 40, 32	corrélation bruit large bande / transfection
Deng <i>et al.</i> (2004)	xenopus	800-1000	Optison	3-4	cavitation des nucléi créés
Prentice <i>et al.</i> (2005)	MCF7		UCAs	4	après implosion agent de contraste
Ohl <i>et al.</i> (2006)	HeLa			1000	jet / projection de coque des UCAs
Zhou <i>et al.</i> (2008)	xenopus	800-1000	Definity	2	formation de jet
Qiu <i>et al.</i> (2010)	MCF7		UCAs		corrélation bruit large bande / transfection
Zhou <i>et al.</i> (2012)	xenopus	800-1000	Laser	5-12	corrélation transfection cavitation inertielle
Sabraoui (2012)	RL / MDA231	10	bulles naturelles	6	implosion des bulles cavitation inertielle

D'après Forbes *et al.* (2008), des études théoriques et expérimentales ont montré que le microstreaming près de la paroi d'une cellule affecte de manière importante la membrane. Lors des oscillations stables de la bulle, il y a génération d'un flux stationnaire local appelé microstreaming (Van Bavel, 2007). Le microstreaming résultant des oscillations linéaires des UCAs pourrait jouer un rôle dans la sonoporation (Forbes *et al.*, 2008). A plus fortes amplitudes de pression, les UCAs présentent des oscillations non linéaires (grossissement lent durant la raréfaction et contraction rapide durant la compression mais sans implosion), produisant du microstreaming et des microjets. Les jets liquides formés sont le résultat du comportement asymétrique des UCAs en présence de grands gradients de pression près d'une paroi (comme une cellule). Les jets liquides augmentent le transport de chaleur et de gaz et ont la capacité de perforer la membrane produisant des ouvertures permettant le transport de matériel extracellulaire dans la cellule (Prentice *et al.*, 2005). Pour Chen *et al.* (2004), de même, le microstreaming et les contraintes de cisaillement durant les oscillations non linéaires de la bulles sont responsables de la perméabilisation de la membrane cellulaire.

Pour Doinikov et Bouakaz (2010), les forces de cisaillements produites à la surface de la cellule par des microbulles induites par ultrasons augmentent les micropores dans la membrane de la cellule et laissent donc passer des macromolécules à l'intérieur du cytoplasme.

Selon Yang *et al.* (2008), une autre hypothèse est que les microbulles (UCAs) excitées par les ultrasons pourraient stimuler l'endocytose (mécanisme de pénétration des molécules dans la cellule sans intervention extérieure). En effet, (Lee *et al.*, 2014) ont montré que les ultrasons augmentent la sonoporation en augmentant un type d'endocytose.

En résumé, les deux principaux mécanismes mis en avant dans la sonoporation induite par des bulles en régime de cavitation stable sont les oscillations linéaires ou non linéaires des bulles très proches des cellules qui vont déformer les cellules et ainsi créer des pores sur la membrane et la contrainte de cisaillement induite par le microstreaming généré par les microbulles près de la membrane cellulaire.

Cavitation inertielle

La cavitation inertielle est caractérisée par l'apparition d'un bruit large bande sur le spectre. Sundaram *et al.* (2003); Zhou *et al.* (2008, 2012) ont remarqué que la viabilité et la transfection ou la perméabilité de la membrane sont corrélées avec le bruit large bande mais pas avec l'apparition de la fréquence subharmonique qui est liée à la cavitation stable. De même, Qiu *et al.* (2010) observent une augmentation linéaire de la transfection avec la dose de cavitation inertielle (dose calculée comme l'aire sous la courbe de la moyenne du bruit large bande entre les harmoniques 2 et 3 en fonction du temps d'exposition) puis une saturation. Il y a également corrélation de ce paramètre avec la taille des pores et la viabilité cellulaire.

D'après Forbes *et al.* (2008), lorsque l'amplitude de pression acoustique augmente, le ratio entre le diamètre maximale atteint par la bulle et son diamètre initial dépasse 2, ce qui est un critère commun pour l'implosion des UCAs (Church, 2005; Flynn, 1975). Lors de l'implosion, le mouvement des UCAs est contrôlé par l'inertie du liquide. Pour des UCAs avec coque, cette implosion violente génère la fragmentation de la coque, la libération du gaz et la génération de bulles filles de gaz qui oscilleront aussi. Cette implosion produit des effets mécaniques (ondes de chocs, augmentation de la

température (4300 à 5000°K)) (Didenko *et al.*, 1999) (et Suslick2001) et chimiques (production de radicaux libres) pouvant avoir des effets sur les cellules. Cependant Lawrie *et al.* (2003) ont montré que la production de radicaux libres n'est pas requise pour la transfection. Dans le cas d'utilisation d'UCAs avec coques, Prentice *et al.* (2005) suggèrent que la perméabilisation de la membrane pourrait être due à la propulsion des coques vers les cellules qui comprimeraient les cellules sur leur chemin. Deng *et al.* (2004), quant à eux, ont observé un délai entre l'activation des ultrasons et la sonoporation, qu'ils expliquent par l'implication des bulles générées après implosion des UCAs.

Selon Doinikov et Bouakaz (2010), des ondes de chocs causées par les bulles implosantes quand elles sont en régime de cavitation inertielle et des microjets pourraient générer des forces de cisaillements à la surface de la cellule par des microbulles qui augmenteraient les micropores dans la membrane de la cellule. L'amplitude de la contrainte de cisaillement décroît rapidement quand la distance bulle-cellule augmente suggérant que pour que la sonoporation soit efficace les bulles doivent être très proches des cellules. Ceci rejoint Zhou *et al.* (2012) qui ont également noté que l'effet des bulles implosantes diminue rapidement quand la bulle est plus loin de la membrane cellulaire.

Pour certains, ce sont clairement les jets créés lors de l'implosion non sphérique d'une bulle près d'une surface qui sont responsables de la poration de la membrane (Ohl *et al.*, 2006; Wolfrum *et al.*, 2002; Prentice *et al.*, 2005). Wolfrum *et al.* (2002) ont observé que même à amplitude modérée, les agents de contraste grossissent jusqu'à plus de 30 fois leur rayon initial et percent la membrane cellulaire en implosant. Ils ont observé des jets dans presque toutes les implosions. Dijkink *et al.* (2008) observent qu'il y a de la transfection cellulaire si une bulle créée près d'une paroi implose, ce qui va générer un jet de liquide.

Les ondes de chocs sont également avancées comme responsables de la sonoporation par (Ohl et Ikin, 2003; Lokhandwalla *et al.*, 2001). Ohl et Ikin (2003) précisent que la perméabilisation est due à des interactions directes entre la membrane et ondes de chocs.

En résumé, le taux de sonoporation semble corrélé à l'énergie du bruit large bande et donc à la cavitation inertielle. Les principaux mécanismes mis en avant sont la formation de jet et les ondes de choc induites par l'implosion des bulles.

Quelques ordres de grandeurs

La déformation de l'aire d'une cellule est définie par $\frac{\Delta A}{A}$ (Lokhandwalla *et al.*, 2001). Celle-ci correspond à $\frac{\Delta A}{A} = \frac{Aire_{pore(s)}}{Aire_{cellule}}$ dans le cas de la sonoporation et correspond à un excès d'aire de la cellule. Dans le cas de la rupture de la membrane $\frac{\Delta A}{A} \sim 2.5 \cdot 10^{-2}$, alors que dans le cas d'un pore sur la membrane cellulaire (entre 1-10 nm) cette valeur est de l'ordre de $\frac{\Delta A}{A} \sim 10^{-7} - 10^{-5}$.

Dans le cas d'un flux dont la vitesse radiale augmente linéairement entre 0 et k en un temps τ ($U_r = kr$), l'excès d'aire peut être approximé d'après (Lokhandwalla *et al.*, 2001) par :

$$\frac{\Delta A}{A} \sim k\tau \quad (1.22)$$

où U_r est la vitesse radiale du flux, r la distance bulle-cellule et τ la durée d'exposition.

Dans le cas d'oscillations de la bulle, $U_r = U_b \left(\frac{R_b}{r}\right)^2$, ce qui permet de retrouver l'excès d'aire d'une cellule généré par les oscillations d'une bulle :

$$\frac{\Delta A}{A} \sim \frac{U_b R_b^2}{r^3} \tau, \quad (1.23)$$

Avec $U_b \sim \frac{R_{max}}{\tau_a/2}$ et $R_b \sim R_{max}/2$ (Sundaram *et al.*, 2003). En considérant que la bulle atteint son rayon maximum en une demie-période acoustique ($\tau \sim \tau_a/2$), l'excès d'aire généré par une bulle oscillant à une distance r de la cellule est :

$$\frac{\Delta A}{A} \sim \frac{R_{max}^3 \tau_a}{4r^3} \quad (1.24)$$

où r est la distance bulle-cellule, R_b le rayon de la bulle, U_b la vitesse radiale, τ le temps d'exposition et τ_a la période acoustique.

Les dommages sur la membrane cellulaire induits par une onde de choc peuvent être dus entre autre à un déplacement relatif de la cellule induit par l'onde de choc (Sundaram *et al.*, 2003). Les dommages potentiels de l'onde de choc dépendent du gradient spatial de pression et de la durée du pulse (Lokhandwalla *et al.*, 2001). L'allongement ϵ dans la section de cellule, d'une cellule exposée à une onde de choc, dont l'amplitude décroît en $1/r$ durant sa propagation sphérique, est approximée selon (Lokhandwalla *et al.*, 2001; Sundaram *et al.*, 2003) par :

$$\epsilon \sim \frac{P_0 R_{min}}{r \rho c^2} \quad (1.25)$$

où P_0 est l'amplitude de l'onde de choc à son origine $r = R_{min}$ et R_{min} est le rayon de la bulle après implosion, avant le premier rebond. R_{min} est estimé en implémentant l'équation de Rayleigh-Plesset (rayon quand la paroi de la bulle dépasse la vitesse du son dans l'eau). Les différents paramètres de cette équation sont $P_0 = P_i \left(\frac{R_{max}}{R_{min}}\right)^{3\gamma}$ avec $R_{max} = \frac{3000}{f} \left[\frac{(P_a - 1)}{\sqrt{P_a}} \left(1 + \frac{2(P_a - 1)}{3}\right)^{1/3} \right]$ et $P_i = (P_{stat} + \frac{2\sigma}{R_0}) \frac{R_0^3}{R_{max}^3}$ où γ est le ratio des chaleurs spécifiques, P_a la pression acoustique (en bars), f la fréquence acoustique (en kHz), R_{max} le rayon maximum atteint par la bulle (en μm), P_{stat} la pression hydrostatique (1 bar), σ la tension de surface et R_0 le rayon initial de la bulle.

Des exemples d'excès d'aire générés par ces deux mécanismes sont présentés sur la Figure 1.8.

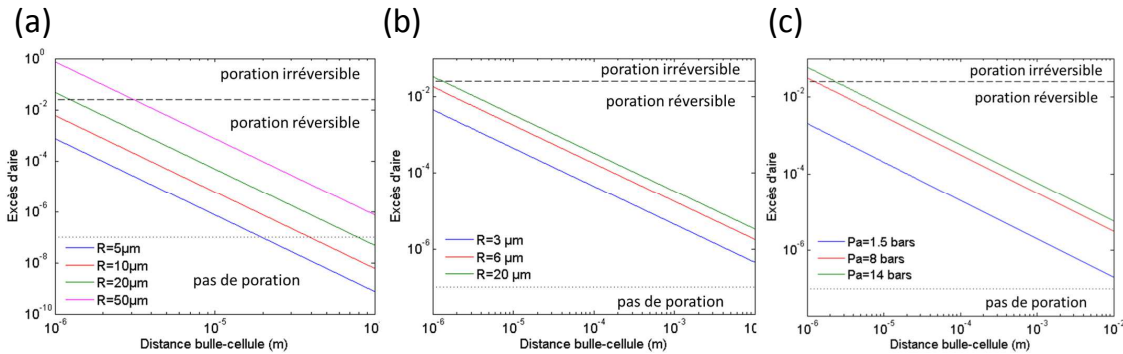


FIGURE 1.8 – Estimation de la déformation d'aire des cellules (excès d'aire) dans le cas a/ d'une bulle oscillant à proximité d'une cellule et b/ et c/ dans le cas d'une bulle implosant à proximité d'une cellule en générant une onde de choc pour un pression acoustique de 5 bars (b/) et un rayon de la bulle de $6\mu\text{m}$ (c/).

Dans le cas d'une bulle oscillant près d'une cellule (Figure 1.8a), il y a poration si la bulle est suffisamment près de la cellule. En effet, pour une bulle de $10\ \mu\text{m}$ (dont $R_{max} = 2, 3 R_0$) à 500 kHz, il y aurait poration réversible si la distance bulle-cellule est inférieure à $30\ \mu\text{m}$. Dans le cas d'une onde de choc (Figure 1.8b et c), la gamme de distance bulle-cellule pour la poration réversible est plus large (jusqu'à quelques cm). De plus, si la bulle est trop près de la cellule, il y a poration irréversible de la membrane. A une pression acoustique de 5 bars une bulle de $20\ \mu\text{m}$ à une distance d'environ $1\ \mu\text{m}$ d'une cellule induit de la poration irréversible (Figure 1.8b). De même, une bulle de $6\ \mu\text{m}$ pour la même distance bulle-cellule induit de la poration irréversible pour des pressions acoustiques à partir de 8 bars (Figure 1.8c).

1.2.3 Observations de la poration des cellules

Différentes études sur les interactions bulles-cellules ont été réalisées afin de mieux appréhender les mécanismes sous-jacents à la sonoporation pour divers systèmes d'études qui ont souvent pour point commun des observations sous microscope. Une cellule isolée en configuration adhérente (Zhou *et al.*, 2012; Sankin *et al.*, 2010; Marmottant et Hilgenfeldt, 2003) ou en suspension (Le Gac *et al.*, 2007) a été étudié avec une bulle unique créée et piégée à l'aide d'un laser (Zhou *et al.*, 2012; Sankin *et al.*, 2010; Le Gac *et al.*, 2007), créée par injection d'air et accrochée à une paroi (Marmottant et Hilgenfeldt, 2003) ou alors nucléée dans un système microfluidique (Nejad *et al.*, 2011). L'utilisation d'une cellule seule est cependant assez loin d'une expérience de sonoporation classique. D'autres études portent sur des monocouches de cellules adhérentes en présence de bulles multiples (des agents de contrastes dans la plupart des cas) près des cellules (van Wamel *et al.*, 2004, 2006; Wolfrum *et al.*, 2002; Okada *et al.*, 2005) ou attachées aux cellules (Kudo *et al.*, 2009). Ces systèmes permettent l'observation de la déformation de la membrane de la cellule sous l'effet des oscillation des bulles (van Wamel *et al.*, 2004, 2006), liée aux phases de contraction/expansion de la bulle (Okada *et al.*, 2005), apparaissant là où les bulles étaient attachées (Kudo *et al.*, 2009) ou bien causée par microstreaming (Marmottant et Hilgenfeldt, 2003; Sankin *et al.*, 2010), micro-jet (Okada *et al.*, 2005; Sankin *et al.*, 2010) ou implosion d'une bulle (Zhou *et al.*, 2012). Pour une bulle près d'une cellule, ces déformations peuvent atteindre $2.85\ \mu\text{m}$ (Nejad *et al.*, 2011) et peuvent mener à la création de pores sur les cellules (Zhou *et al.*, 2012; Kudo *et al.*, 2009; Sankin *et al.*, 2010). Les pores à la surface des cellules peuvent être mis en évidence par la mesure du courant transmembranaire. En effet, d'après Deng *et al.* (2004), une augmentation du courant transmembranaire correspond à une diminution de la résistance de la membrane due à la formation de pores. Celui-ci permet donc de remonter à des information sur l'augmentation de la perméabilité de la membrane (Zhou *et al.*, 2008, 2012). De plus, il ne dépend que de la taille des pores (Deng *et al.*, 2004) car il est proportionnel à leur rayon (Zhou *et al.*, 2009). Comme la plupart du temps il y a génération de pores multiples, les variations d'amplitudes du courant transmembranaire suggèrent une variation du nombre et de la taille des pores (Zhou *et al.*, 2008). En cas d'observation sous microscope, certaines études s'intéressent à l'observation des pores dans la membrane cellulaire sous microscope électronique (Qiu *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012), alors que d'autres études porte sur l'entrée de produit fluorescent (propidium iodine (PI)) dans la cellule pour étudier les dommages et réparations ou bien la mort des cellules (Kudo *et al.*, 2009; Okada *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2011; Nejad

et al., 2011; Tamosiunas *et al.*, 2012; Qiu *et al.*, 2010). En effet, lorsque qu'une cellule est porée, le PI va commencer à entrer, si celle-ci se referme il y aura une entrée limitée sinon la cellule se videra de son milieu intérieur. Une augmentation limitée et transitoire du PI indique la formation d'un pore et sa fermeture, et les cellules sont donc viables (Park *et al.*, 2011). D'après Tamosiunas *et al.* (2012), les cellules restent perméables au PI 10 min après exposition. Il y a aussi possibilité de caractériser la taille des pores ainsi que leur durée d'ouverture via une investigation moléculaire indirecte et des observations sous microscope (Mehier-Humbert *et al.*, 2005a).

1.3 Conclusion

La cavitation acoustique est un phénomène complexe. Les bulles de cavitation en régime de cavitation stable oscillent radialement de manière linéaire ou faiblement non linéaire. Ces oscillations sont à l'origine de la diffusion rectifiée qui tend à amener la population de bulles autour du rayon résonant. Dans le cas où le champs acoustique est composé d'ondes stationnaires, les bulles vont également se translater pour se positionner à des positions particulières ou à plus forte amplitude, osciller autour de leur positions d'équilibres stables. Les oscillations radiales et de surface des bulles ainsi que les translations induisent du microstreaming. A plus fortes amplitudes, les bulles passent au dessus du seuil de cavitation inertielle et vont imploser et se fragmenter en plusieurs bulles filles. L'implosion des bulles est à l'origine de la formation d'ondes de choc et de microjets.

Le principal facteur impliqué dans la sonoporation est la cavitation acoustique, les mécanismes sous-jacents mis en avant dans la littérature sont variés. En effet, sont impliqués des mécanismes liés à la cavitation stable comme le microstreaming principalement ou à la cavitation inertielle comme les microjets ou les ondes de chocs par exemple. Il a cependant été mis en avant une corrélation entre l'énergie du bruit large bande (lié à la cavitation inertielle) et la transfection.

Une des possibilités pour avoir des informations sur ces mécanismes est d'observer les interactions bulles-cellules-milieu environnant en temps réel sous microscope durant l'excitation acoustique. Pour cela, nous avons développé un système de sonoporation avec visualisation en temps réel sous microscope et dédié aux cellules adhérentes. Afin de s'affranchir du caractère stochastique de la cavitation acoustique et espérer des effets biologiques plus reproductibles, un système de régulation de l'activité de cavitation inertielle a été mis en place.

Dans le chapitre 2, le système de sonoporation développé est présenté, ainsi que le processus de contrôle de la cavitation inertielle. Celui-ci est également caractérisé en termes de champ acoustique, de quantification de l'activité d'implosion des bulles et de dynamique de bulles.

Puis, dans le chapitre 3, le système est validé pour la sonoporation de cellules adhérentes HT-29. L'amélioration des résultats par l'utilisation de la régulation de l'activité de cavitation est évaluée ainsi que l'effet de la sonoporation à moyen terme sur la reprise de croissance des cellules.

Finalement dans le chapitre 4, des observations sous microscope des interactions bulles-membranes modèles dans un premier temps puis bulles-cellules sont réalisées.

Chapitre 2

Système de sonoporation de cellules adhérentes en cavitation régulée

Même si la cavitation acoustique est impliquée dans la sonoporation, les mécanismes sous-jacents à ce phénomène ne sont pas encore bien définis. Afin de différencier les phénomènes physiques mis en jeu, une des possibilités est de visualiser en temps-réel sous microscope et pendant l'excitation acoustique les interactions entre les bulles, les cellules et le milieu environnant. L'observation de ces interactions nécessite alors soit de fixer les bulles de cavitation (générées et piégées par un laser par exemple) soit de fixer les cellules (cellules adhérentes). Dans le cadre de ce travail, le choix s'est porté sur l'utilisation de cellules adhérentes, qui constituaient, par la même occasion, un challenge supplémentaire pour les applications de transfection ultrasonore. Pour s'assurer des effets biologiques reproductibles, un meilleur contrôle de la cavitation acoustique est nécessaire pour pallier au caractère aléatoire de ce phénomène. Un système de régulation de la cavitation inertielle a ainsi été implémenté. Dans ce chapitre, le système de sonoporation développé est présenté, ainsi que le processus de contrôle de la cavitation. Ensuite, une caractérisation acoustique est réalisée et la quantification de l'activité d'implosion des bulles effectuée. Enfin, des observations de dynamique de bulles dans le milieu sont analysées.

2.1 Système de sonoporation

2.1.1 Le dispositif technologique

La principale particularité de notre système de sonoporation est sa possible utilisation sous microscope en temps réel. En effet, les transducteurs sont placés sur les côtés afin de laisser l'axe optique libre. Il y a eu deux prototypes (Figure 2.1a et b) de ce système de sonoporation avec les mêmes transducteurs (Ferroperm PZ 28 (Ferroperm, Kvissgaard, Denmark); fréquence de résonance 426,5 kHz; dimensions : 18 x 3 mm²) et puits de culture cellulaire (Labtek; Thermo Scientific Nunc; dimensions : 20 x 20 mm², volume : 2 mL) (Figure 2.1c). Ces puits de culture cellulaire sont particulièrement bien adaptés à la visualisation sous microscope car leur fond est composé d'une lamelle en verre.

Un premier prototype a été réalisé afin de vérifier s’il est possible de générer de la cavitation acoustique ainsi que si l’on peut espérer sonoporer les cellules adhérentes avec un tel dispositif (Sabraoui, 2012) (Figure 2.1a). Dans ce prototype, les transducteurs sont montés sur un support en PVC. Ceux-ci sont reliés par deux ressorts de traction en inox pour garder un serrage reproductible et prendre en compte l’inclinaison des parois du puits de culture, et par deux tiges en inox pour garder l’axe acoustique des transducteurs dans la même zone d’intérêt. Ce système a montré son efficacité en terme de sonoporation mais n’est pas très pratique à utiliser sous microscope. De plus, le système de maintien de l’hydrophone n’est pas très reproductible en terme de repositionnement. Un deuxième prototype a donc été réalisé (Figure 2.1b). Dans celui-ci, le système de sonoporation est placé dans une platine de microscope (16 x 11 cm) contenant : le puits de culture au centre, un double jeu de transducteurs et leur adaptation d’impédance électrique.

Pour ces deux prototypes, un hydrophone (pinducer VP 1093 (Valpey Fisher), et HNR 500 (Onda)) permettant d’écouter le bruit de cavitation est plaqué contre un autre côté du puits (Figure 2.1b).

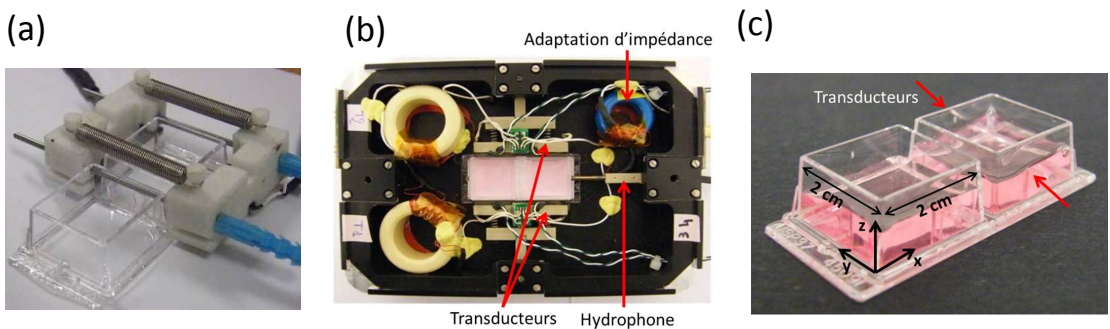


FIGURE 2.1 – Dispositifs expérimentaux et puits de culture cellulaire : a/ photo du premier prototype d’insonification positionné sur le puits de culture cellulaire, b/ photo du deuxième prototype : le système d’insonification est placé dans une platine de microscope et c/ photo du puits de culture cellulaire avec les axes utilisés dans la suite du document (les flèches rouges montrent les côtés où sont appliqués les transducteurs).

2.1.2 Les transducteurs

Les transducteurs utilisés sont des barrettes piézoélectriques PZ 28 de surface $18 \times 3 \text{ mm}^2$. Ces barrettes ont été choisies tout d’abord pour leurs dimensions car celles-ci vont venir se plaquer contre le puits et donc pouvoir insonifier sur toute la largeur du puits (car celui-ci mesure 20 mm). De plus, le puits de culture cellulaire est prévu pour contenir 2 mL et donc le niveau de liquide arrive juste au dessus des transducteurs. Les transducteurs ont une fréquence de résonance autour de 500 kHz. En général dans les expériences de sonoporation, les fréquences utilisées sont dans la gamme [0,5-3] MHz, comme présenté dans la compilation de Liu *et al.* (2012) qui compare les résultats de 26 études. En effet, il faut faire un compromis entre le niveau de pression acoustique nécessaire pour générer la cavitation acoustique et le rayon des bulles générées (par rapport à la taille des cellules). En effet, initier la cavitation acoustique nécessite un niveau de pression acoustique moins élevé pour les fréquences moins élevées. Cependant, plus la fréquence d’excitation est basse, plus les bulles de

cavitation auront un rayon important. Par exemple, à 500 kHz, les bulles de cavitation ont un rayon de résonance d'environ $6 \mu\text{m}$ contre $150 \mu\text{m}$ à 20 kHz ou seulement $1 \mu\text{m}$ à 3 MHz. Les cellules, classiquement, ont une taille d'une dizaine de micromètres. Nous avons donc choisi de travailler à 500 kHz pour initier la cavitation acoustique facilement tout en ne générant pas des bulles de rayons trop grands devant les cellules.

Cependant, afin d'utiliser ces transducteurs dans le dispositif de sonoporation, ceux-ci sont montés sur des supports en plastique. Une contrainte est donc appliquée sur les transducteurs par ce montage et de ceci résulte un décalage de la fréquence de résonance des transducteurs, qui est maintenant autour de 420 kHz. Des photos des transducteurs sont présentés sur la Figure 2.2. Des fils sont soudés sur les barrettes (un sur la face arrière et l'autre sur le côté), ces transducteurs sont ensuite insérés par deux dans des barrettes en plastique (Figure 2.2b). Un thermocouple est soudé sur chaque transducteur afin de suivre l'évolution de sa température (Figure 2.2c). Ils sont ensuite montés sur la platine, où un système avec des ressorts permet de faire reculer les transducteurs pour pouvoir insérer ou retirer le puits de culture cellulaire et les plaquer contre le puits les transducteurs (Figure 2.2d). Du gel échographique est appliqué sur les puits afin d'assurer un bon couplage (Aquasonic 100, Parker). Ces transducteurs sont adaptés électriquement à 50Ω en parallèle à l'aide d'un impédancemètre (Precision LCR meter, HP 4285A). L'impédance électrique a été mesurée avec les transducteurs montés dans la platine et plaqués contre le puits de culture cellulaire contenant 2 mL d'eau. Les courbes d'impédances électriques des transducteurs avant et après adaptation sont présentées sur les Figures 2.2e et f. Avant adaptation, l'impédance réelle présente un maximum d'amplitude d'environ 1500Ω autour de 420 kHz. L'adaptation d'impédance des transducteurs consiste à ramener l'impédance réelle autour de 50Ω et l'impédance imaginaire à 0Ω (afin de limiter la puissance réfléchiée dans le système) (Figure 2.2f). L'ensemble des transducteurs a ainsi été adapté à la fréquence 426,5 kHz par un système de ferrite-bobine inclus directement dans la platine (Figure 2.1b).

Le champ acoustique dans le puits a été mesuré à l'aide d'un hydrophone optique (Precision acoustic LTD). Des cartographies en (x, y) du fond du puits ainsi qu'en (y, z) au milieu du puits ont été réalisées à environ $0,6 \text{ W/cm}^2$ pour une excitation continue afin de ne pas avoir de cavitation acoustique susceptible de modifier aléatoirement la mesure du champ de pression acoustique. Un banc de déplacement (Owis PS35) contrôlé par un programme Labview a été utilisé pour déplacer l'hydrophone. Chaque mesure d'amplitude de pression acoustique, issue de 20 moyennages, a été réalisée avec un espacement de $0,5 \text{ mm}$ dans les deux directions de chaque plan étudié. La valeur de la pression acoustique est retrouvée après calibration de l'hydrophone optique à l'aide d'un hydrophone (Müller-plate needle probe, Müller Instrument, Oberursel, Germany) dont la sensibilité est connue. Le champ acoustique est composé d'ondes quasi-stationnaires comme attendu à la vue de la géométrie du puits. Deux exemples de cartographies en (y, z) pour une position x au milieu du puits et en (x, y) pour une position z à $0,5 \text{ mm}$ du fond du puits sont présentés sur la Figure 2.3.

Dans la direction verticale z , le champ acoustique présente un mode en $\lambda_z = \frac{4}{3}L_z$, avec une pression maximale à la paroi $z=0$ et une pression nulle à l'interface libre eau/air. Suivant les directions x et y , le champ acoustique s'apparente à un champ unidimensionnel entre les transducteurs, et correspond à une forme de pression typique des cavités parallélépipédiques :

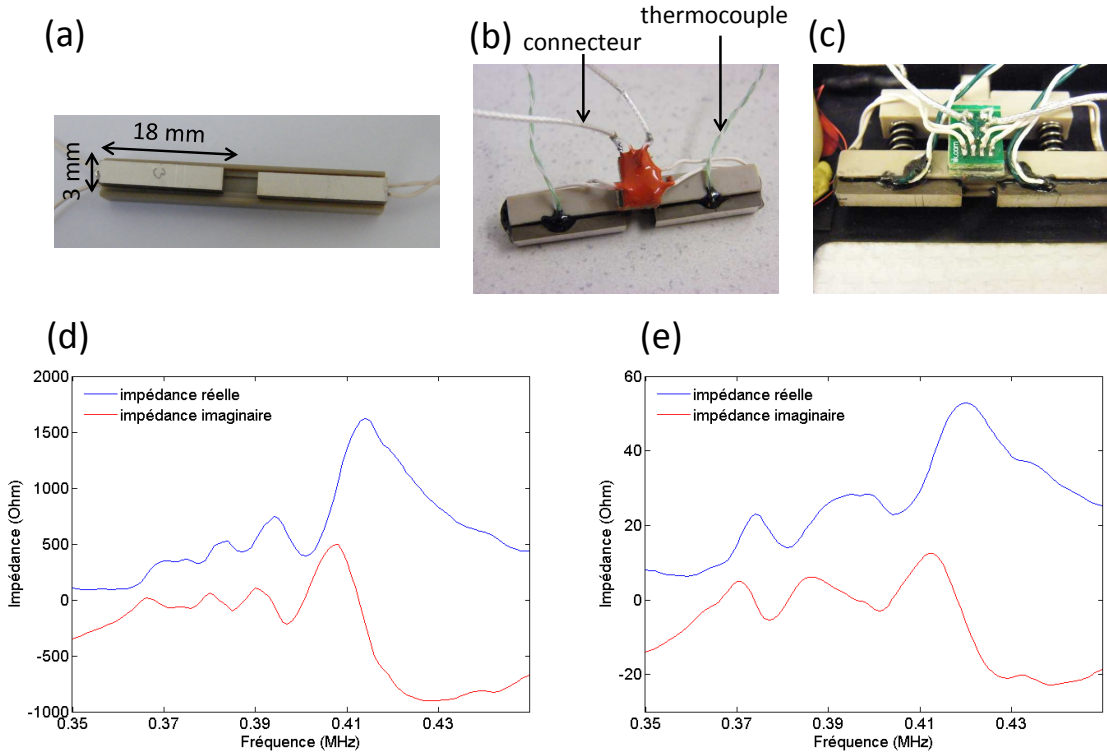


FIGURE 2.2 – Les transducteurs : a/ deux transducteurs connectés insérés dans leur support, b/ ces mêmes transducteurs après soudure des thermocouples, c/ les transducteurs insérés dans la platine et d/ et e/ un exemple de courbe d'impédance électrique du système respectivement avant et après adaptation électrique.

$$p(x, y, z, t) = A \cos(k_x x) \cos(k_y y) \cos(k_z z) e^{j\omega t} \tag{2.1}$$

avec, $k_x = \frac{m\pi}{L_x}$, $k_y = \frac{n\pi}{L_y}$ et $k_z = \frac{3\pi}{2L_z}$. Ici, les valeurs de L_x et L_y sont 2,08 cm et L_z environ 4 mm. Les fréquences de résonance pour les modes indicés (m, n, 3/2) sont alors $f_{mn} = \frac{c}{2\pi} \sqrt{(\frac{m\pi}{L_x})^2 + (\frac{n\pi}{L_y})^2 + (\frac{3\pi}{2L_z})^2}$, où c est la célérité du son dans l'eau, ici ≈ 1500 m/s. Dans ce cas, on vérifie qu'il y a résonance du puits pour le mode (4, 8, 1) autour de 426,5 kHz.

A haute fréquence, la densité spectrale est très élevée. Bien que la gamme de fréquence d'excitation soit limitée, il est certainement possible d'exciter d'autres modes avec notre système. Il est intéressant de savoir quels autres modes peuvent être excités avec l'adaptation d'impédance qui a été faite à 426,5 kHz.

Les fréquences d'excitation sont choisies autour du maxima de puissance transmise en fonction de la fréquence (Figure 2.4a) et les fréquences de résonances sont relevées. Pour chaque fréquence de résonance, la pression acoustique le long de y a été relevée afin de déterminer le mode acoustique excité. Cette mesure est réalisée 2 fois afin de vérifier si le même mode est excité les deux fois. Un exemple de la pression acoustique mesurée le long de y à la fréquence 426,5 kHz est présentée sur la Figure 2.4b ainsi que la pression théorique dans cette même direction pour le mode (4, 8, 1). Les résultats de ces mesures sont synthétisés dans la Table 2.1. Dans ce tableau, pour chaque fréquence de résonance, les

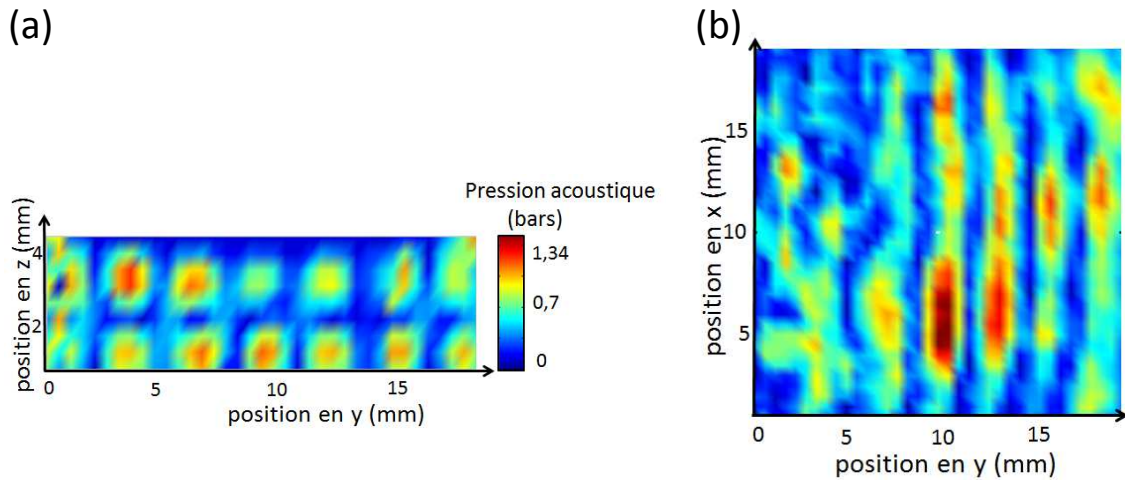


FIGURE 2.3 – Champ acoustique mesuré dans le puits. a/ coupe en (y, z) mesuré à $x=10$ mm et b/ plan en (x, y) mesuré à $z=0,5$ mm.

paramètres n du mode acoustique $(m, n, 3/2)$ mesurés pour les 2 mesures sont indiqués ainsi que les modes théoriques correspondants pour ces valeurs de n . Ainsi, à la fréquence 417,5 kHz, les mesures de la pression suivant y montrent une valeur du paramètre n de 7 lors de la première mesure et de 8 lors de la seconde. En ce qui concerne les modes acoustiques théoriques correspondants, le mode $(5, 7, 3/2)$ est excité à 419 kHz et le mode $(3, 8, 3/2)$ à 417 kHz.

La possibilité de pouvoir exciter d'autres modes acoustique sera utilisée pour vérifier la dépendance spatiale de la sonoporation dans le chapitre 3.

Fréquence expérimentale (kHz)	n exp 1	n exp 2	m et n théorique 1	m et n théorique 2
383,5	6	6	383kHz m=4 n=6	
386,5	6	6	383kHz m=4 n=6	
398,5	6	8	398kHz m=5 n=6	404kHz m=1 n=8
407,5	6	8	416kHz m=6 n=6	409kHz m=2 n=8
417,5	7	8	419kHz m=5 n=7	417kHz m=3 n=8
426,5	8	8	428kHz m=4 n=8	
430,5	7	8	435kHz m=6 n=7	428kHz m=4 n=8
440,5	8	8	441kHz m=5 n=8	

TABLE 2.1 – Comparaison entre les modes suivant y obtenus pour les différentes fréquences de résonance et mesurés avec l'hydrophone optique et les modes théoriques suivant x et y .

2.1.3 L'hydrophone

L'hydrophone utilisé est un hydrophone aiguille (HNR 500, Onda) (Figure 2.5a). Cet hydrophone a été choisi car sa courbe de réponse en fréquence (donnée par le constructeur) est plate sur les fréquences qui nous intéressent (au moins jusqu'à 5 MHz pour la mesure du bruit large bande sur le

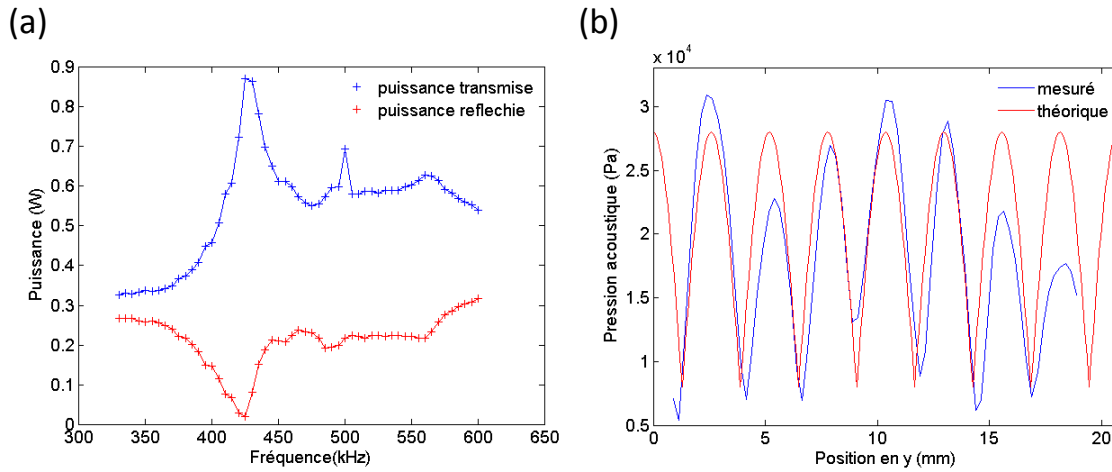


FIGURE 2.4 – a/ Puissance acoustique transmise et réfléchie par les transducteurs en fonction de la fréquence et b/ pression acoustique mesurée le long de y ($x=10$ mm et $z=0,5$ mm) comparée à la pression acoustique théorique 1D à 426,5 kHz.)

spectre) d’après les données du constructeur présentées sur la Figure 2.5c. De plus, cet hydrophone n’est pas très directif (contrairement au HNR 1000 d’après les données du constructeur présentées sur la Figure 2.5d) ce qui permet une mesure du bruit de cavitation dans tout le puits. A noter, que dans cette configuration la mesure est en champ proche et donc non omnidirectionnelle.

Cet hydrophone est monté dans la platine. Pour cela, il est inséré dans une pièce en plastique, pour qu’il garde la même position et un ressort permet de le décaler afin de retirer ou mettre en place le puits de culture cellulaire et de le plaquer toujours à la même position sur le puits de culture cellulaire (Figure 2.5b). Afin d’assurer un bon couplage entre l’hydrophone et le puits, du gel échographique (Aquasonic 100, Parker) est appliqué sur le puits.

2.2 Contrôle de l’activité de cavitation inertielle

La sonoporation et les effets biologiques sont liés à la cavitation acoustique. Sundaram *et al.* (2003) et Zhou *et al.* (2008) ont montré une corrélation entre les effets biologiques et l’énergie du bruit large bande (généralisé par l’implosion des microbulles de cavitation dans le régime de cavitation inertielle).

Il est bien connu que la cavitation acoustique, inertielle ou non, est un processus aléatoire. Expérimentalement, ceci induit, pour des tirs ultrasonores à intensité acoustique fixée, des variabilités en terme d’activité de cavitation générée, d’initiation ou de stabilité temporelle de ce phénomène. Afin de s’assurer d’effets biologiques plus reproductibles, il est donc important de "contrôler" l’activité de cavitation inertielle lors de l’excitation acoustique et donc de réguler le niveau de cavitation inertielle au cours du temps.

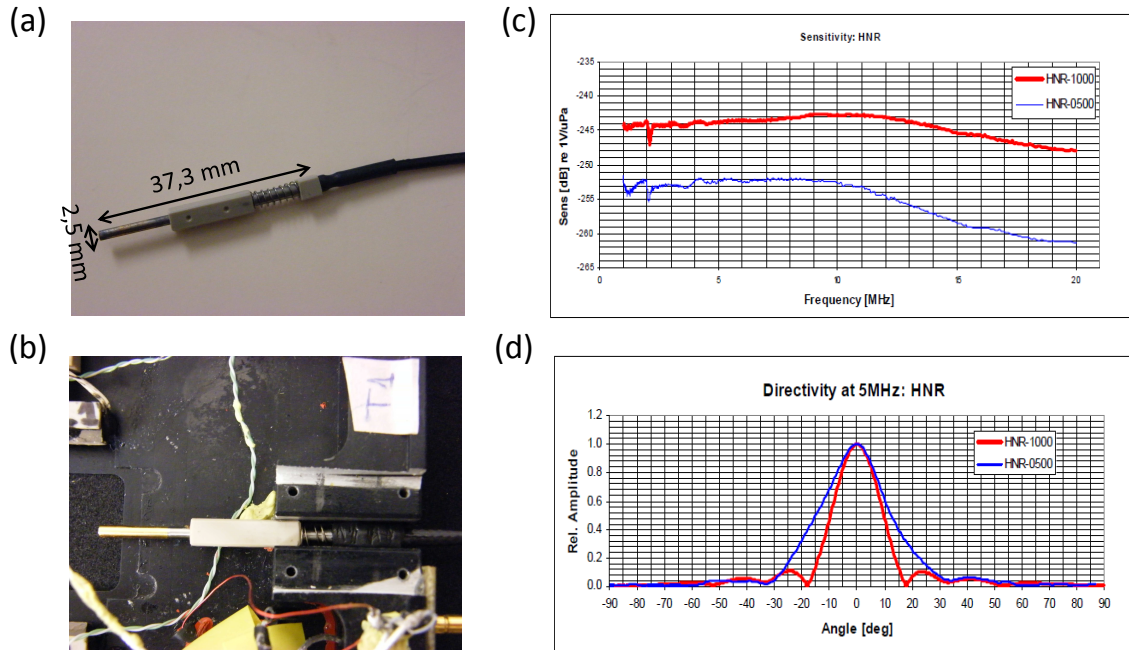


FIGURE 2.5 – L'hydrophone : a/ une photo de l'hydrophone aiguille HNR 500 avec la pièce avec le montage permettant le bon repositionnement de l'hydrophone, b/ photo de l'hydrophone monté dans la platine, c/ sensibilité des hydrophones HNR 500 et 1000 (données du constructeur) et d/ directivité des hydrophones HNR 500 et 1000 (données du constructeur).

2.2.1 Le principe

L'idée principale consiste à contrôler, le plus rapidement possible, l'activité de cavitation inertielle au cours d'un tir ultrasonore afin d'assurer une initiation rapide du phénomène, une bonne stabilité temporelle et des niveaux de cavitation reproductibles en moyenne. Comme présenté sur les courbes d'hystérésis du niveau de cavitation inertielle au chapitre 1, une des possibilités d'action pour maintenir une activité de cavitation donnée est de moduler l'intensité acoustique délivrée par les transducteurs. Au lieu d'imposer (classiquement) une tension fixée (ou I_a fixée) aux bornes du transducteur, on souhaite imposer une activité de cavitation inertielle donnée sur un tir ultrasonore. Pour cela, un indice de cavitation inertielle, $CI(t)$, est utilisé pour quantifier l'augmentation du signal large bande spectral (lié à l'implosion des bulles de cavitation) au cours du tir ultrasonore. Le spectre du bruit de cavitation (issu du signal de l'hydrophone après transformée de Fourier dans la gamme [0,09- 5] MHz) est calculé, et le $CI(t)$ correspond à la moyenne arithmétique du niveau acoustique en dB sur cet intervalle de fréquences. L'influence des fréquences harmoniques, sub-harmonique et ultra-harmoniques est limitée par l'utilisation de l'échelle logarithmique. Avant insonification, un seuil d'initialisation (niveau du bruit électronique), est mesuré comme la valeur moyenne sur le spectre pour une acquisition de 10 secondes quand il n'y a pas d'excitation acoustique. Ce seuil d'initialisation est soustrait aux spectres mesurés lors des excitations acoustiques afin de supprimer les valeurs divergentes du $CI(t)$ causées par l'échelle logarithmique sur le niveau acoustique du spectre. Un exemple des spectres avant et pendant excitation acoustique est présenté sur la Figure 2.6. Dans le cas où l'activité de cavitation

inertielle est régulée, un CI consigne est choisi et la tension $u(t)$ appliquée aux transducteurs au temps t est une fonction de la tension appliquée au temps $t - t_b$ où t_b est le temps d'une boucle de régulation (acquisition et traitement du signal) :

$$u(t) = u(t - t_b) + \alpha \Delta CI \quad (2.2)$$

avec $\Delta CI = CI_{consigne} - CI(t - t_b)$ où $CI(t - t_b)$ correspond au CI obtenu lors de la boucle précédente et α est un facteur proportionnel qui correspond dans notre cas à 0,02 (gain proportionnel).

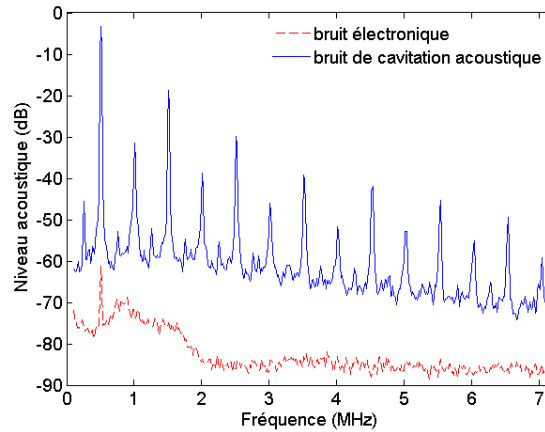


FIGURE 2.6 – Spectre du signal acoustique obtenu lors de l'initiation (le bruit électronique) et lors de l'insonification en cas de cavitation inertielle.

2.2.2 L'implémentation du contrôle

Le contrôle de l'activité de cavitation inertielle a déjà été implémenté au laboratoire par l'intermédiaire d'un contrôle Labview avec des temps de rétroaction de 5 ms (Sabraoui *et al.*, 2011). Ce contrôle a démontré son efficacité pour des excitations ultrasonores continues, et il était nécessaire de diminuer le temps de calcul afin de pouvoir réguler le processus pour des excitations pulsées, et ce au sein même d'un pulse. Cette adaptation a été réalisée à l'aide d'un système FPGA (circuit logique programmable, carte PXIe-7965R, NI) avec lequel des temps de rétroaction de l'ordre de 300 à 400 μ s ont été atteints (Desjouy *et al.*, 2013b). Outre le temps de calcul, un autre avantage de ce système était de synthétiser le signal délivré aux transducteurs en modulant son amplitude au cours du tir (en s'affranchissant ainsi d'un générateur de fonction et d'un amplificateur à gain variable). C'est ce système que j'ai utilisé durant la thèse et que je présente maintenant.

Lors d'une insonification, les caractéristiques du signal acoustique sont déterminées (fréquence, excitation continue ou pulsée, rapport cyclique) et le mode d'insonification choisi (intensité acoustique fixée ou CI consigne fixé). Puis lors de l'irradiation, ce signal est synthétisé dans le système FPGA (circuit logique programmable, carte PXIe-7965R, NI) puis amplifié par le module amplificateur à gain variable du FPGA (résolution 16 bits, fréquence d'échantillonnage 100 MHz, module NI-5781R) et par un amplificateur de puissance (24 V, 4,8 A, 50 MHz, Kalmus) avant d'être transmis aux transducteurs.

L'hydrophone (HNR 500, Onda) placé perpendiculairement aux transducteurs permet d'écouter le bruit de cavitation. Ce signal est amplifié par un pré-amplificateur (Müller Voltage Amplifier, +18dB) avant d'être acquis dans le module de conversion Analogique-Numérique du FPGA (résolution 14 bits, fréquence d'échantillonnage 100 MHz, module NI-5781R). Le spectre du signal est alors calculé ainsi que l'indice de cavitation inertielle (moyenne sur le spectre du niveau acoustique à laquelle est soustrait le seuil d'initialisation). L'algorithme de régulation est alors appliqué (dans le cas où un indice de cavitation inertielle a été choisi) et la nouvelle tension transmise aux transducteurs est calculée. Cette boucle est répétée avec un temps de rétroaction d'environ 0,3 ms. Un résumé du principe du programme d'insonification et de régulation de la cavitation est présenté Figure 2.7 et le dispositif expérimental est présenté sur la Figure 2.8.

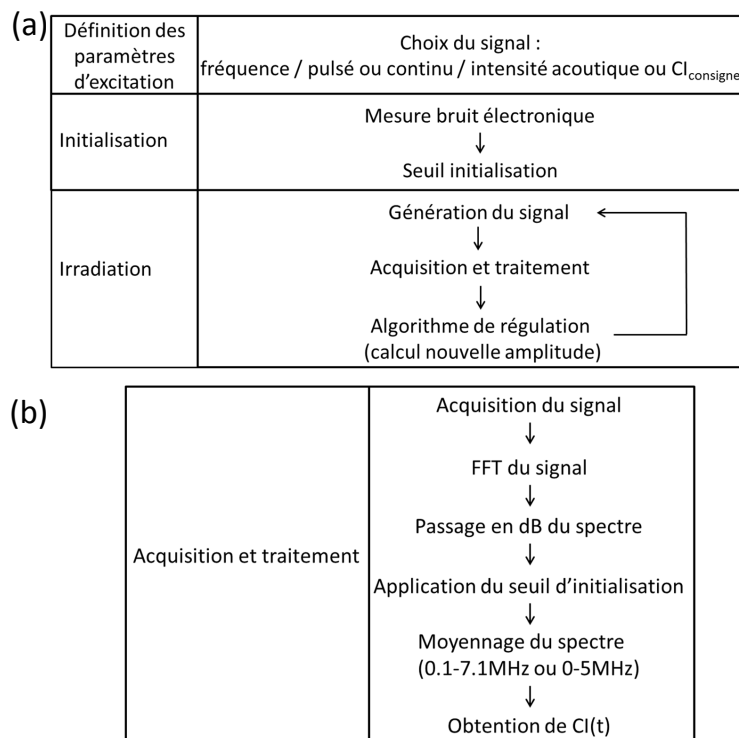


FIGURE 2.7 – Schémas montrant les principales étapes du processus d'insonification et de régulation de l'indice de cavitation inertielle. a/ Les étapes lors d'une insonification et b/ Les détails de l'étape Acquisition et traitement.

2.2.3 Effet de la régulation sur la stabilité temporelle et l'initiation de la cavitation inertielle

Outre le caractère aléatoire de la cavitation acoustique en ce qui concerne l'indice de cavitation inertielle obtenu pour une même intensité acoustique, la cavitation acoustique non régulée peut parfois présenter une mauvaise stabilité temporelle ou bien une initiation plus ou moins tardive. La régulation de l'activité de cavitation inertielle permet de s'en affranchir.

Pour une insonification non régulée (intensité acoustique fixée), la mauvaise stabilité temporelle

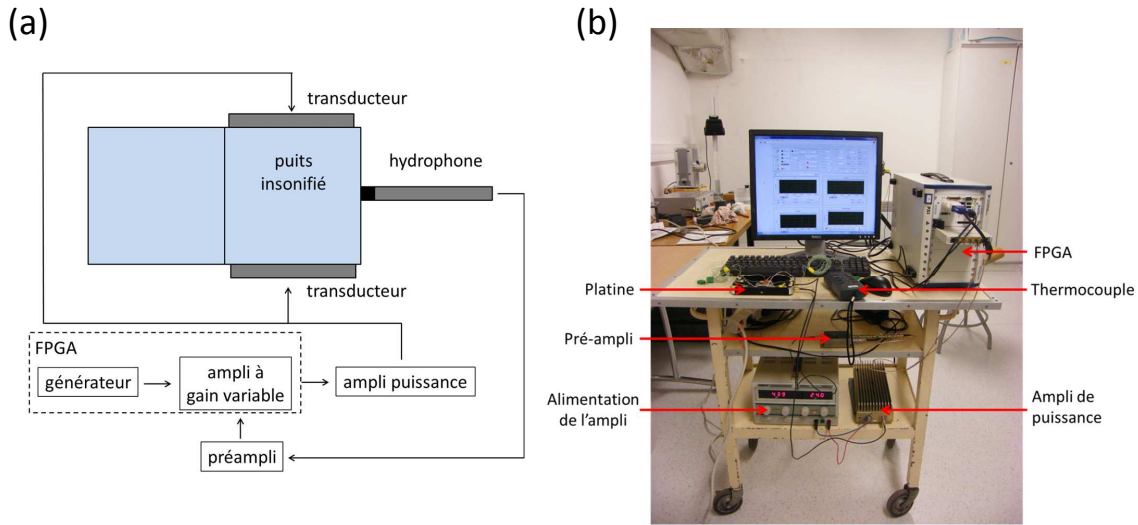


FIGURE 2.8 – Dispositif expérimental. a/ schéma et b/ photo du dispositif expérimental.

du $CI(t)$ en fonction du temps est présentée sur les Figures 2.9a et d. A droite de ces figures sont représentées les distributions de $CI(t)$ atteints au cours d'un tir. Ces distributions très étalées remettent clairement en cause la notion d'activité de cavitation moyenne au vu des valeurs extrêmes de CI atteintes. En utilisant maintenant, les valeurs moyennes de CI obtenues pour ces 2 tirs comme consigne pour le mode régulé, les Figures 2.9b et e présentent l'amélioration induite par le contrôle sur la stabilité temporelle. De plus, les distributions de $CI(t)$ sont proches d'une gaussienne centrée sur le CI consigne et les valeurs extrêmes de CI (pas de cavitation ou très fort CI) sont supprimées. Enfin sur les Figures 2.9c et f, les intensités acoustiques imposées par le contrôle en fonction du temps sont présentées.

De la même façon, des exemples de l'indice de cavitation inertielle en fonction du temps en intensité acoustique fixée présentant une mauvaise initiation de la cavitation acoustique sont présentés sur les Figures 2.10a et d. Les histogrammes de la répartition de l'indice de cavitation inertielle pour ces deux exemples montrent une gaussienne et un pic pour des indices de cavitation inertielle plus faibles correspondant au début du tir, où il n'y avait pas encore eu initiation de la cavitation inertielle. Lorsque la régulation est utilisée (Figure 2.10b et e), l'initiation de la cavitation inertielle est beaucoup plus rapide et une seule gaussienne est observée sur chaque histogramme.

2.2.4 Calibration du CI par dosimétrie

Un défaut de la définition de l'indice de cavitation inertielle est qu'il est système-dépendant. En effet, la quantification du bruit large bande dépend de l'hydrophone, de la position de l'hydrophone ainsi que du gain du pré-amplificateur. Afin de s'assurer de pouvoir comparer notre indice de cavitation inertielle avec celui mesuré pour d'autres systèmes ou même le notre en cas de changement d'hydrophone par exemple, il est nécessaire de quantifier la cavitation inertielle d'une autre façon. C'est la sonolyse de l'eau qui est évaluée dans ce cas, par la dosimétrie des radicaux hydroxydes formés (OH^\bullet). En effet, l'implosion des bulles lors de la cavitation inertielle mène à la production

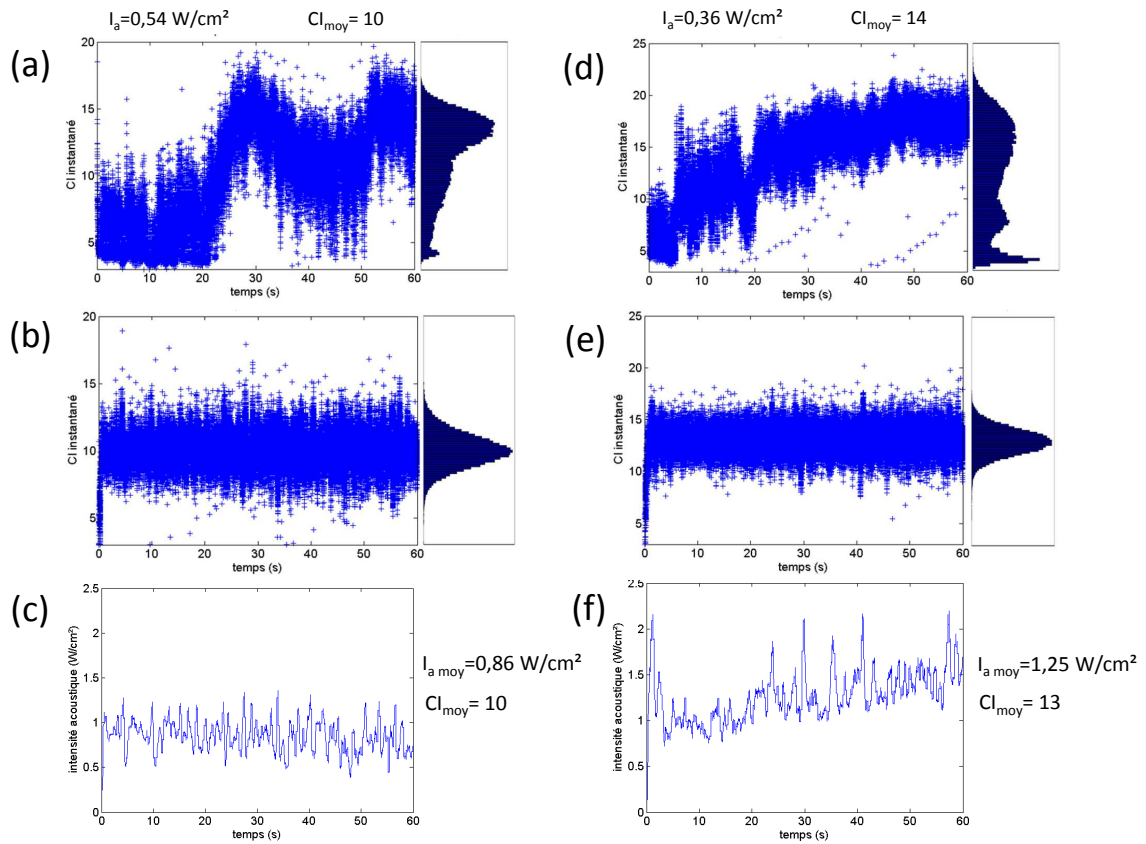


FIGURE 2.9 – 2 exemples montrant le problème de l'instabilité temporelle lorsque la régulation sur l'indice de cavitation inertielle n'est pas utilisée (a et d). Pour ces deux exemples l'évolution temporelle en cas de cavitation régulée pour un CI du même ordre est présenté en b et e, et enfin l'évolution de l'intensité acoustique en fonction du temps pour ces mêmes tirs est présentée en c et f. Pour les figures a, b, d et e, en plus de l'évolution temporelle du CI est tracé à droite de chaque figure l'histogramme de distribution des CI obtenus lors des tirs.

de radicaux OH^\bullet (hydroxyde) selon l'équation suivante : $\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{H}^\bullet + \text{OH}^\bullet$. Il existe différentes techniques pour quantifier les radicaux libres générés par la cavitation inertielle, comme le dosimètre iodure (Kratovich et Mornstein, 2007), le dosimètre de Fricke (Pricz et Lenz, 1993) ou le dosimètre acide téréphtalique (TA) (Villeneuve *et al.*, 2009). C'est ce dernier qui est utilisé car il est connu pour être le plus sensible (Iida *et al.*, 2005). En effet, le TA réagit chimiquement rapidement avec les radicaux OH^\bullet et il en résulte la formation d'acide hydroxytéréphtalique fluorescent (HTA, ex/em : 315/425 nm). La quantité de radicaux libre est donc déterminée par spectrofluorimétrie.

La solution d'acide téréphtalique (2 mM) a été préparée selon la méthode de Mason *et al.* (1994). Cette solution a été insonifiée avec le système de sonoporation pour des intensités fixées entre 0,10 et 2,82 W/cm^2 pour des excitations ultrasonores continues de 60 secondes. Les mesures de fluorescence ont été réalisées avec le spectrofluorimètre (FluoroMax, Horiba) et les mesures pour chaque intensité acoustique ont été réalisées 6 fois (sur différents jours).

Les concentrations de HTA obtenues en fonction de l'intensité acoustique et du CI moyen sont présentées sur la Figure 2.11. Les concentrations de HTA pour une même intensité acoustique sont

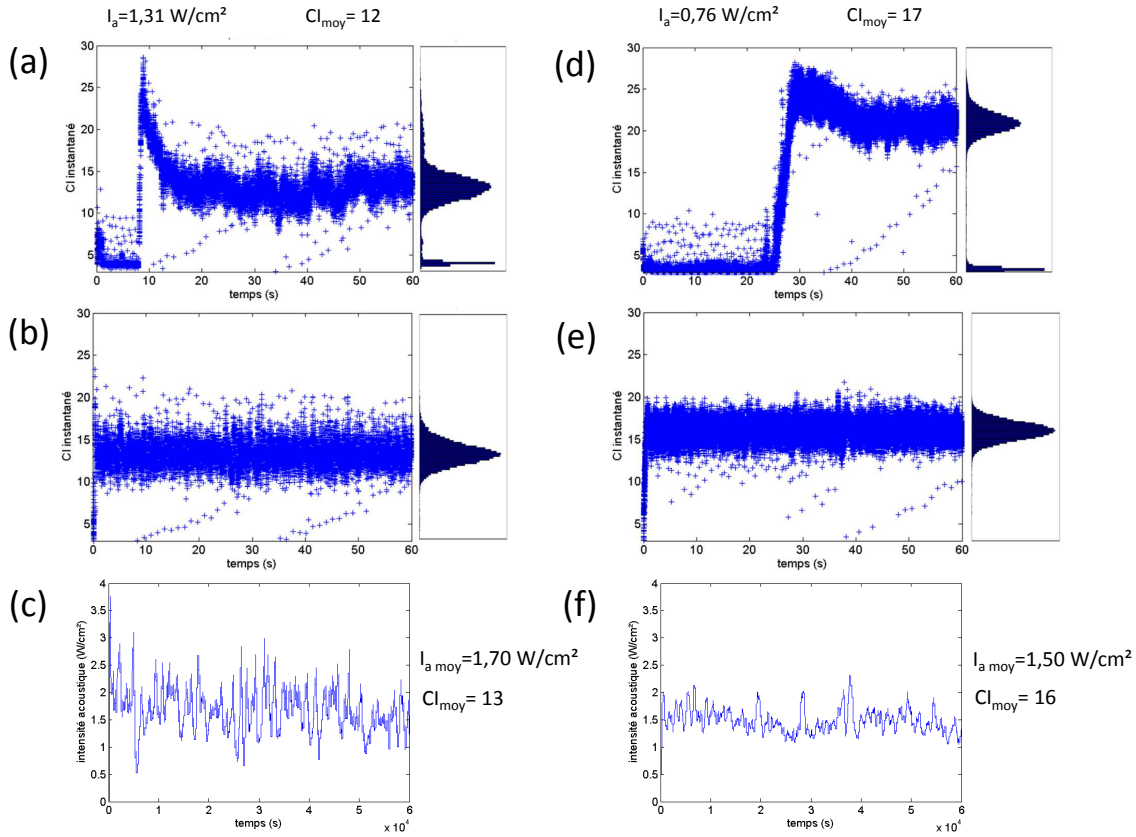


FIGURE 2.10 – 2 exemples montrant le problème de l’initiation de la cavitation acoustique lorsque la régulation sur l’indice de cavitation inertielle n’est pas utilisée (a et d). Pour ces deux exemples l’évolution temporelle en cas de cavitation régulée pour un CI du même ordre est présenté en b et e, et enfin l’évolution de l’intensité acoustique en fonction du temps pour ces mêmes tirs est présentée en c et f. Pour les figures a, b, d et e, en plus de l’évolution temporelle du CI est tracé à droite de chaque figure l’histogramme de distribution des CI obtenus lors des tirs.

très variables, : à $I_a=2 \text{ W/cm}^2$ par exemple les concentrations de HTA varient entre 0,4 et 0,9 μM , alors que la gamme de HTA varie elle entre 0 et 1,4 μM . Les concentrations de HTA sont cependant bien corrélées au CI moyen et peuvent être interpolées par une droite $0,0957CI - 2,0465$ (coefficient de corrélation de 0,92). Il est à noter que le spectrofluorimètre n’est pas assez sensible pour mesurer les concentration de HTA pour des CI moyens inférieurs à 20 (pour des tirs de 60 secondes). Il y a donc une très bonne corrélation entre la concentration de HTA et le CI moyen car les excitations acoustiques ont été réalisées en intensité acoustique fixée (afin de s’assurer un maximum de CI moyens différents) avec les problèmes de stabilité temporelle et d’initiation que cela peut impliquer. La concentration de HTA pour des indices de cavitation fixés de 26, 28, 30 et 32 sont respectivement 0,44 μM , 0,63 μM , 0,82 μM et 1,02 μM .

Cette mesure permet également de recalibrer la mesure de l’indice de cavitation inertielle en cas de changement d’hydrophone. En effet, deux hydrophones ont été utilisés durant les différentes études présentées et donc un CI 32 avec le système de mesure 1 (hydrophone1 (pinducer VP 1093,

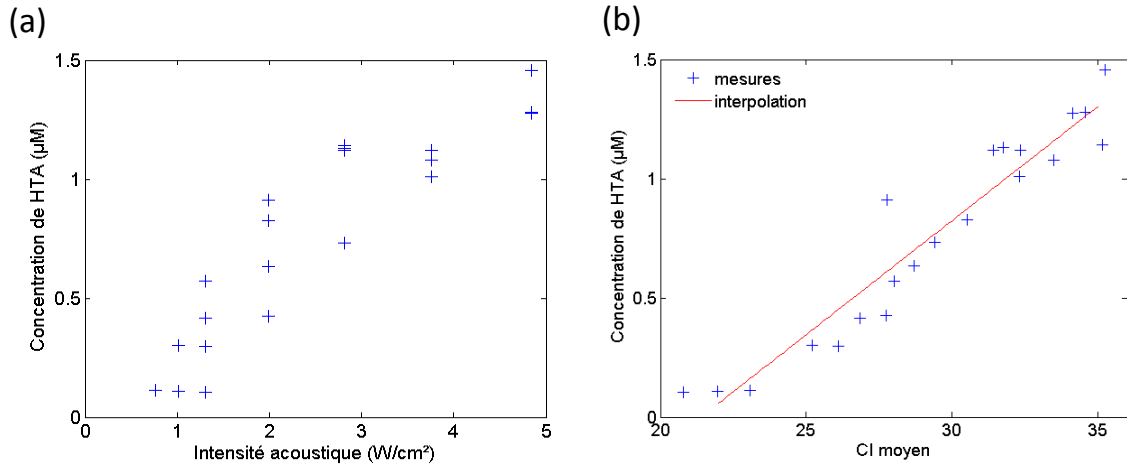


FIGURE 2.11 – Concentration de HTA obtenue en fonction de l'intensité acoustique (a/) et du CI moyen (b/) pour des tirs continus effectués en intensité acoustique fixée de 60 secondes.

Valpey Fisher) + préamplificateur (+ 18 dB)) correspond à un CI 24,5 avec le système de mesure 2 (hydrophone2 (HNR 500, Onda) + préamplificateur (+ 14 dB)) car tous deux génèrent $1,02 \mu\text{M}$ de HTA pour une insonification de 60 secondes en temps de tir total cumulé.

2.2.5 Caractérisation dans de l'eau et du milieu cellulaire

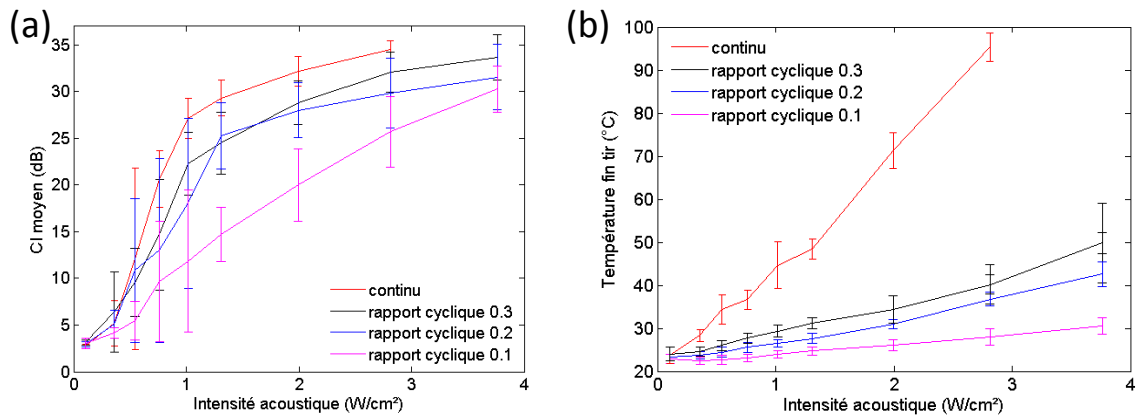


FIGURE 2.12 – Caractérisation du système d'insonification et de régulation de la cavitation inertielle pour des tirs de temps on cumulé de 60 secondes, en intensité acoustique fixée, en excitation continue ou pulsée, pour différents rapports cycliques (0,1, 0,2 et 0,3) et une durée de cycle de 250 ms (temps d'insonification de 60 secondes en continu, 600 secondes pour un rapport cyclique de 0,1, 300 secondes pour 0,2 et 200 secondes pour 0,3). a/ CI moyens et écarts-types obtenus pour différentes intensités acoustiques fixées et b/ température moyenne d'un des deux transducteurs en fin de tir et écarts-types pour différentes intensités acoustiques.

Le but de ces mesures est de déterminer les indices de cavitation inertielle obtenus pour des intensités acoustiques fixées ou des indices de cavitation consignés fixés, pour des excitation continues ou pulsées et pour différents rapports cycliques. En effet, puisque les transducteurs ne sont pas

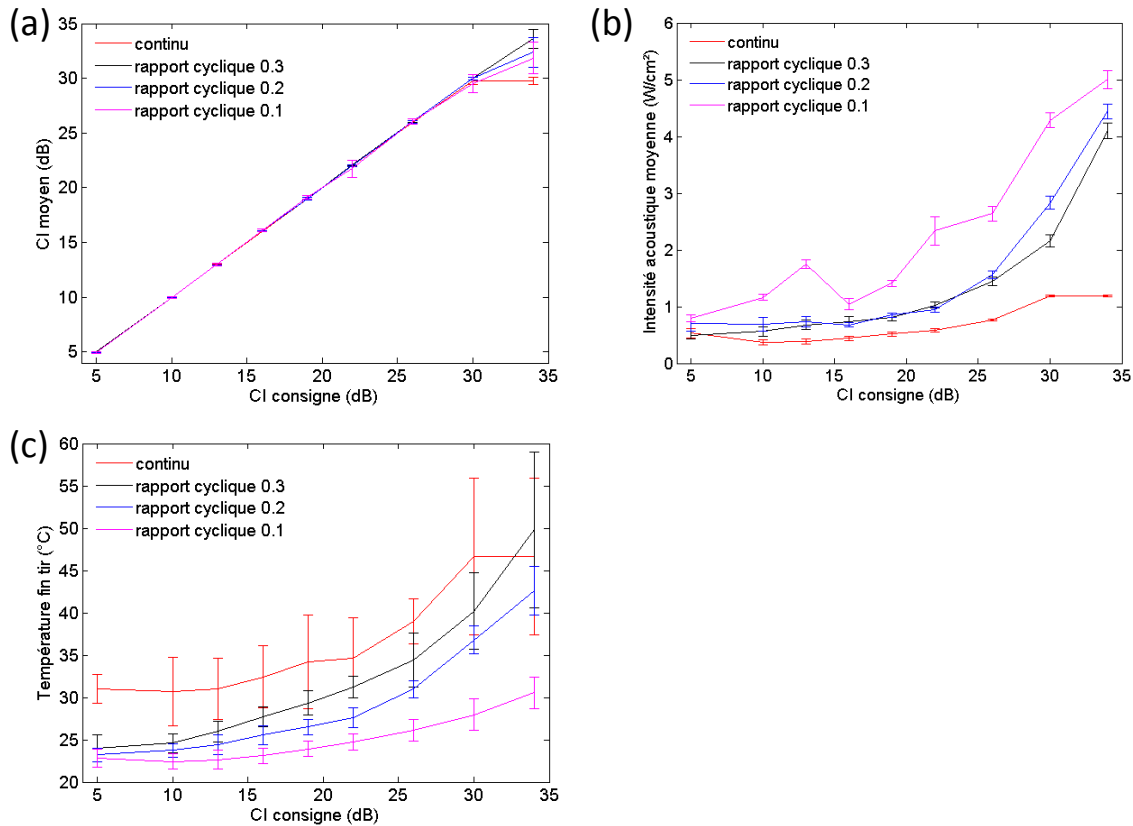


FIGURE 2.13 – Caractérisation du système d'insonification et de régulation de la cavitation inertielle pour des tirs de temps on cumulé de 60 secondes en niveau de cavitation inertielle fixé, en excitation continue ou pulsée, pour différents rapports cycliques (0,1, 0,2 et 0,3) et une durée de cycle de 250 ms (temps d'insonification de 60 secondes en continu, 600 secondes pour un rapport cyclique de 0,1, 300 secondes pour 0,2 et 200 secondes pour 0,3). a/ CI moyens et écarts-types obtenus pour différentes CI consignes, b/ intensités acoustiques moyennes et écarts-types obtenus pour différentes CI consignes et c/ températures moyennes d'un des deux transducteurs en fin de tir et écarts-types pour différentes CI consignes.

immergés dans l'eau ou refroidis pendant les tirs, ils peuvent chauffer. Une excitation pulsée permet aux transducteurs de limiter leur élévation de température, cependant il faut s'assurer que les indices de cavitation inertielle obtenus en excitation continue soient toujours accessibles. Pour cela, des insonifications en excitation continue durant 60 secondes, ou pulsée avec des rapports cycliques de 0,1, 0,2 et 0,3 et des temps d'insonification respectifs de 600 (10 minutes), 300 (5 minutes) et 200 secondes (afin d'assurer le même temps de tir cumulé) ont été réalisées pour des intensités acoustiques fixées (Figure 2.12) et des indices de cavitation inertielle fixés (Figure 2.13) dans de l'eau minérale. Les moyennes et écarts-types sont le résultats de 5 mesures par condition, effectuées sur différents jours. Pour chaque mesure, la température d'un des deux transducteurs (toujours le même) a été relevée à la fin du tir. En théorie la température de Curie de ces transducteurs est de 330°C mais comme la mesure de température est locale, une température maximale de 100°C est tolérée afin de ne pas les endommager. Avant chaque nouveau tir, la température des transducteurs est descendue à moins de 28°C.

D'après la Figure 2.12a, pour des insonification à intensité acoustique fixée, il est clair que les activités de cavitation inertielle moyennes sont plus élevées et plus reproductibles en excitation continue comparé au mode pulsé. En excitation pulsée, l'influence du rapport cyclique montre qu'un rapport cyclique de 0,1 ne permet pas d'atteindre des CI moyens aussi élevés que des rapports cycliques 0,2 et 0,3. En comparant maintenant ces excitations pulsées (rapports cycliques de 0,2 et 0,3) aux excitations continues, on observe un décalage vers la droite des CI moyens atteints. Par exemple, pour obtenir un CI moyen de 26, il suffira d'appliquer une intensité acoustique de 1 W/cm^2 en excitation continue contre près de 2 W/cm^2 pour une excitation pulsée.

Les températures des transducteurs en fin de tir ultrasonore sont bien inférieures dans le cas d'une excitation pulsée par rapport à une excitation continue (Figure 2.12b). En effet, pour une intensité acoustique de $2,81 \text{ W/cm}^2$ en excitation continue, la température des transducteurs en fin de tir est en moyenne de 95°C , contre 42°C pour une excitation pulsée avec un rapport cyclique de 0,3, 40°C pour un rapport cyclique de 0,2 et de 29°C pour un rapport cyclique de 0,1. Il y a une bonne corrélation entre l'intensité acoustique appliquée et la température de fin de tir des transducteurs.

Pour des insonifications en mode régulé, l'indice de cavitation inertielle moyen est très bien corrélé à l'indice de cavitation inertielle consigne (Figure 2.13a). Seule la valeur de consigne CI 34 n'est pas atteinte puisque le système y approche ses limites : une limite imposée (borne max) en tension délivrée aux transducteurs (pour limiter leur élévation de température) empêche le système de réguler efficacement pour ces fortes valeurs d'activité de cavitation. En moyenne, les intensités acoustiques délivrées pour une même consigne sont inférieures en excitation continue comparées aux excitations pulsées (Figure 2.13b). Les intensités acoustiques délivrées sont du même ordre de grandeur pour les rapports cyclique 0,2 et 0,3 et sont inférieures à celles obtenues pour un rapport cyclique de 0,1. La température des transducteurs augmente avec le CI consigne (Figure 2.13c) mais cela est dû au fait que l'intensité acoustique a tendance à augmenter avec le CI consigne également (Figure 2.13b). En effet, on retrouve la même tendance des courbes d'évolution des température en fonction du CI consigne que celle de l'intensité acoustique pour un même rapport cyclique.

Afin de se rapprocher des conditions expérimentales d'une expérience de sonoporation, la même expérience a été réalisée dans du milieu cellulaire. Le milieu, utilisé pour les tirs avec des cellules au chapitre 3, est du RPMI 1640 complet (complété avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 200 UI/ml de pénicilline et $200 \mu\text{g/mL}$ de streptomycine). Les mesures de l'indice de cavitation inertielle ont été réalisées pour des intensités acoustiques fixées (entre 0,10 et $6,07 \text{ W/cm}^2$) et en cavitation régulée (consignes entre CI 5 et CI 34) en excitation pulsée avec un rapport cyclique de 0,2 pendant 60 secondes (6 mesures par conditions sur différents jours). Ces mesures ont pour but de vérifier si les mêmes indices de cavitation inertielle peuvent être obtenus dans le milieu cellulaire par rapport à l'eau. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 2.14. Le CI moyen pour une intensité acoustique fixée ainsi que l'intensité acoustique moyenne pour un CI consigne obtenu dans le milieu cellulaire y sont tracés.

Les résultats obtenus dans le milieu cellulaire sont proches de ceux obtenus dans l'eau pour le même rapport cyclique. Par exemple pour l'intensité acoustique $2,81 \text{ W/cm}^2$, le CI moyen obtenu dans l'eau est de 30 contre 28 dans le milieu cellulaire, et cette différence se retrouve dans les écarts-types des mesures.

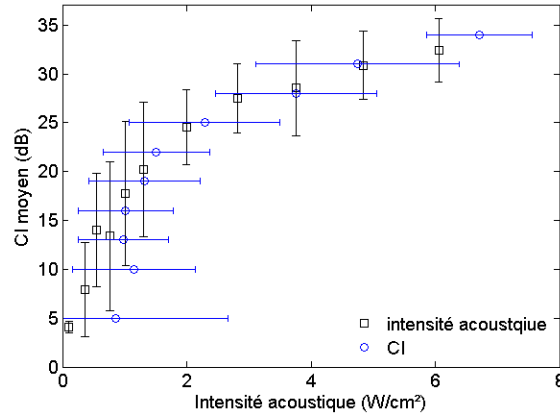


FIGURE 2.14 – CI moyens pour des excitations non régulées et amplitudes moyennes pour des excitations régulées dans du milieu cellulaire RPMI pour des excitations pulsées de 60 secondes.

Dans la suite, pour les expériences de sonoporation du chapitre 3 par exemple, les excitations acoustiques seront des excitation pulsées avec un rapport cyclique de 0,2. En effet, ce paramètre permet une élévation de température des transducteurs bien inférieure à une excitation continue tout en garantissant presque la même gamme d'indice de cavitation inertielle.

2.2.6 Régulation vs UCAs ?

Pour réduire le comportement aléatoire de la cavitation acoustique et plus principalement son initiation et le maintien de la cavitation durant l'insonification, il est possible d'ajouter des agents de contrastes ultrasonores (UCAs) dans le milieu. Ceux-ci agissent comme des nuclei de cavitation et vont assurer une initiation rapide de la cavitation acoustique et permettre de plus faibles intensités acoustiques pour générer de la cavitation. Comme vu auparavant, la régulation de la cavitation inertielle permet également d'assurer une initiation rapide de la cavitation inertielle ainsi qu'une bonne stabilité temporelle du niveau de cavitation inertielle. L'utilisation d'UCAs et le processus de régulation de cavitation sont donc comparés en terme d'activité de cavitation inertielle (initiation, activité moyenne, intensité acoustique moyenne délivrée) pour déterminer si le contrôle de cavitation pourrait compenser l'utilisation d'UCAs pour des applications thérapeutiques, au moins in vitro. Des insonifications de 60 secondes pour une excitation pulsée (rapport cyclique de 0,2 et une durée du cycle de 250 ms) sont testées pour des intensités acoustiques fixées (entre 0,11 et 6,05 W/cm²) et pour des indices de cavitation inertielle consignés (entre CI consigne 5 et 34), avec et sans ajout d'agents de contrastes dans le milieu cellulaire. Les agents de contrastes utilisés sont du SonoVue (Bracco International Imaging, Milan, Italy). Ce sont des microbulles de soufre hexafluorure dans une coque de phospholipides de taille moyenne de 2,5 μm (Schneider, 1999). Le SonoVue est dissout dans 5 mL de solution de NaCl 0,9% et 10 μL de cette solution est ajouté dans chaque puits avant insonification. Pour chaque condition étudiée, les mesures sont effectuées 6 fois sur 2 jours différents. Les résultats sont présentés sur la Figure 2.15.

Pour une intensité acoustique fixée, les CI moyens obtenus avec et sans UCAs sont plutôt variables

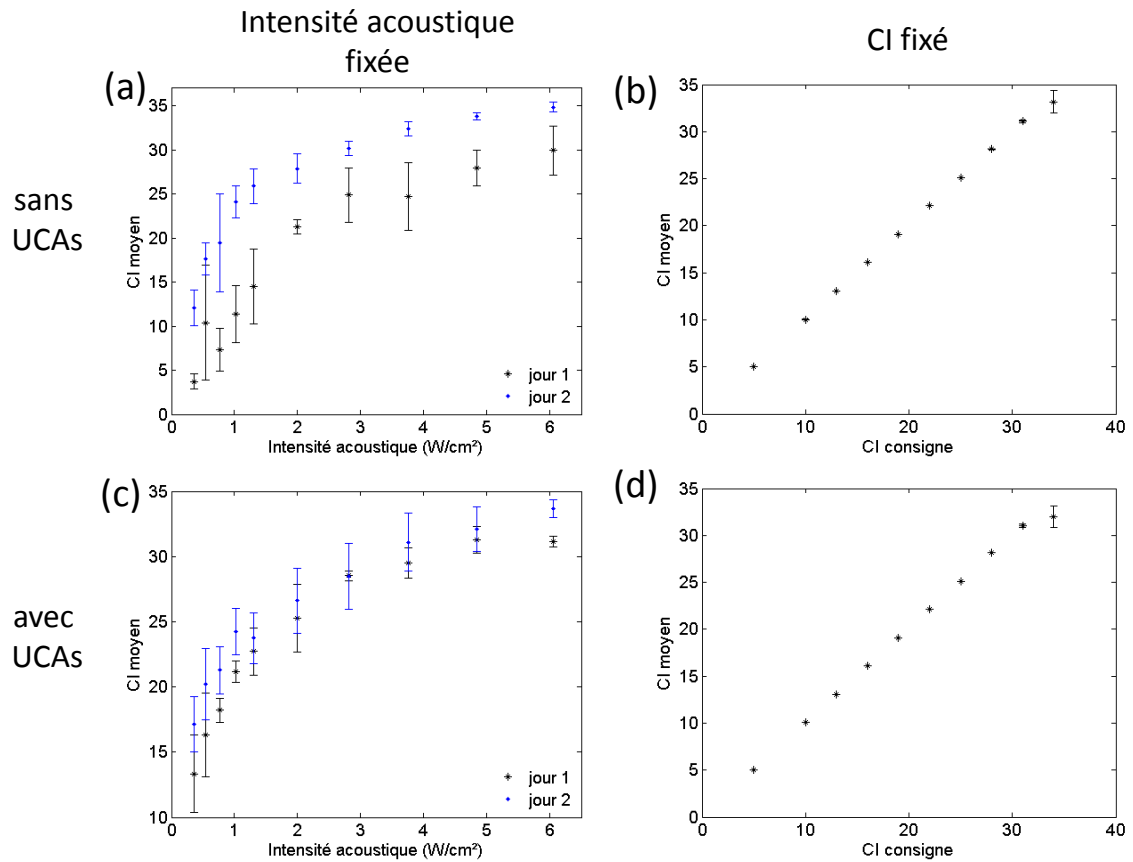


FIGURE 2.15 – Mesures du CI moyen dans les différents cas : a/ sans UCAs et sans régulation, b/ sans UCAs et avec régulation, c/ avec UCAs et sans régulation et d/ avec UCAs et avec régulation.

(Figure 2.15a et c). En l'absence d'UCAs, il y a des différences significatives sur les CI moyens obtenus pour les 2 jours de mesures ($p < 0,05$ pour toutes les intensités acoustiques) (Figure 2.15a). De plus, pour le même jour de mesure, les écarts-types sur les CI moyens varient entre 3 et 62% pour le jour 1 et entre 1 et 28% pour le jour 2. En présence d'UCAs, la variabilité entre les jours de mesures est moins importante : il n'y a de différences significatives sur les 2 jours de mesures que pour 3 intensités acoustiques ($p = 0,049$ pour $I_a = 0,76, 1,02$ et $6,05 \text{ W/cm}^2$) (Figure 2.15c). De plus, la variabilité des résultats sur un même jour de mesure est également plus faible : les écarts-types obtenus ne varient qu'entre 1 et 22% pour le jour 1 et entre 2 et 13% pour le jour 2. Dans le cas où l'activité de cavitation inertielle est régulée, le CI moyen évolue de manière linéaire avec le CI consigne, avec et sans UCAs (Figure 2.15b et d). L'écart-type n'excède pas 0,4% du CI moyen pour les CI consignés entre 5 et 31 et est de l'ordre de 3,5% pour le CI consigné 34. Pour les CI consignés 5 à 31, ces variations sont inférieures à 0,1 dB et sont liées à des incertitudes de mesures. Il n'y a pas d'effets significatifs de la présence d'UCAs lorsqu'il y a régulation de la cavitation inertielle.

Des exemples de l'évolution de l'intensité acoustique appliquée aux transducteurs pour différents CI consignés en présence ou non d'UCAs sont présentés sur la Figure 2.16. Pour un CI consigné de 5 (Figure 2.16a), l'intensité acoustique reste constante au cours du temps lorsqu'il y a des UCAs dans

le milieu cellulaire alors que celle-ci est plus importante et présente de larges oscillations en l'absence d'UCAs. Pour un CI consigne de 13 (Figure 2.16b), en l'absence d'UCAs, l'intensité acoustique oscille autour de 1 W/cm^2 . Le système a besoin de moins d'énergie en présence d'UCAs : l'intensité acoustique délivrée varie entre 0,2 (au début du tir) et $0,6 \text{ W/cm}^2$ (à la fin du tir). Pour un CI consigne plus élevé (CI 28) (Figure 2.16c), l'intensité acoustique délivrée en l'absence d'UCAs oscille autour de $4,3 \text{ W/cm}^2$, alors qu'en présence d'UCAs, l'intensité acoustique nécessaire au début du tir est plus faible (autour de $2,1 \text{ W/cm}^2$) mais augmente jusqu'à atteindre une valeur stable autour de $3,6 \text{ W/cm}^2$ à 28 secondes. Cette remontée de l'intensité acoustique s'expliquerait par la destruction progressive des agents de contrastes au cours du tir. Les intensités acoustiques moyennes obtenues pour les différents CI consignés sont tracées sur la Figure 2.16d. Pour les CI consignés entre 5 et 28, l'intensité acoustique appliquée pour atteindre le CI consigne est inférieure lorsqu'il y a des agents de contraste dans le milieu. Cependant, pour les CI 31 et 34, l'inverse est observé. En conclusion, l'ajout d'agents de contrastes pour une intensité acoustique fixée réduit la variabilité au sein d'une même journée et entre les différents jours de mesures. Dans le cas où l'activité de cavitation inertielle est régulée, il n'y a pas de différences sur le CI moyen en présence ou non d'agents de contrastes. Cependant, leur utilisation en cas de régulation (pour des CI entre 5 et 28) permet de limiter l'intensité acoustique appliquée aux transducteurs pour un même CI consigne.

2.3 Dynamique de bulles

Pour rappel, le dispositif conçu est dédié à la sonoporation de cellules adhérentes et donc présentes sur le fond du puits de culture cellulaire. Maintenant que son efficacité a été démontrée en termes de génération et de maintien de cavitation ultrasonore grâce au contrôle implémenté, il est judicieux de s'assurer que les bulles de cavitation acoustique apparaissent dans le voisinage des cellules à sonoporer (donc au fond du puits) et donc que la cavitation ne soit pas uniquement volumique (ce qui limiterait les interactions bulles-cellules).

2.3.1 Positions d'équilibre des bulles

Tout d'abord, au vu du champ acoustique décrit en section 2.1.2, il est intéressant de vérifier les positions théoriques d'équilibre des bulles. Les positions d'équilibre des bulles sont déterminées par la force de Bjerknes primaire dans un champ d'onde stationnaire et celles-ci correspondent aux zéros de la force de Bjerknes.

Pour rappel, la force de Bjerknes primaire correspond à :

$$\vec{F}_{Bj} = -\frac{4}{3}\pi R^3(t)\vec{\nabla}P_a \quad (2.3)$$

Par linéarisation de l'équation de Rayleigh-Plesset, le rayon $R(t)$ est approximé par :

$$R(t) = R_0 \left[1 - \frac{P_a(y, z, t)}{\rho R_0^2 (\omega_0^2 - \omega^2)} \right] \quad (2.4)$$

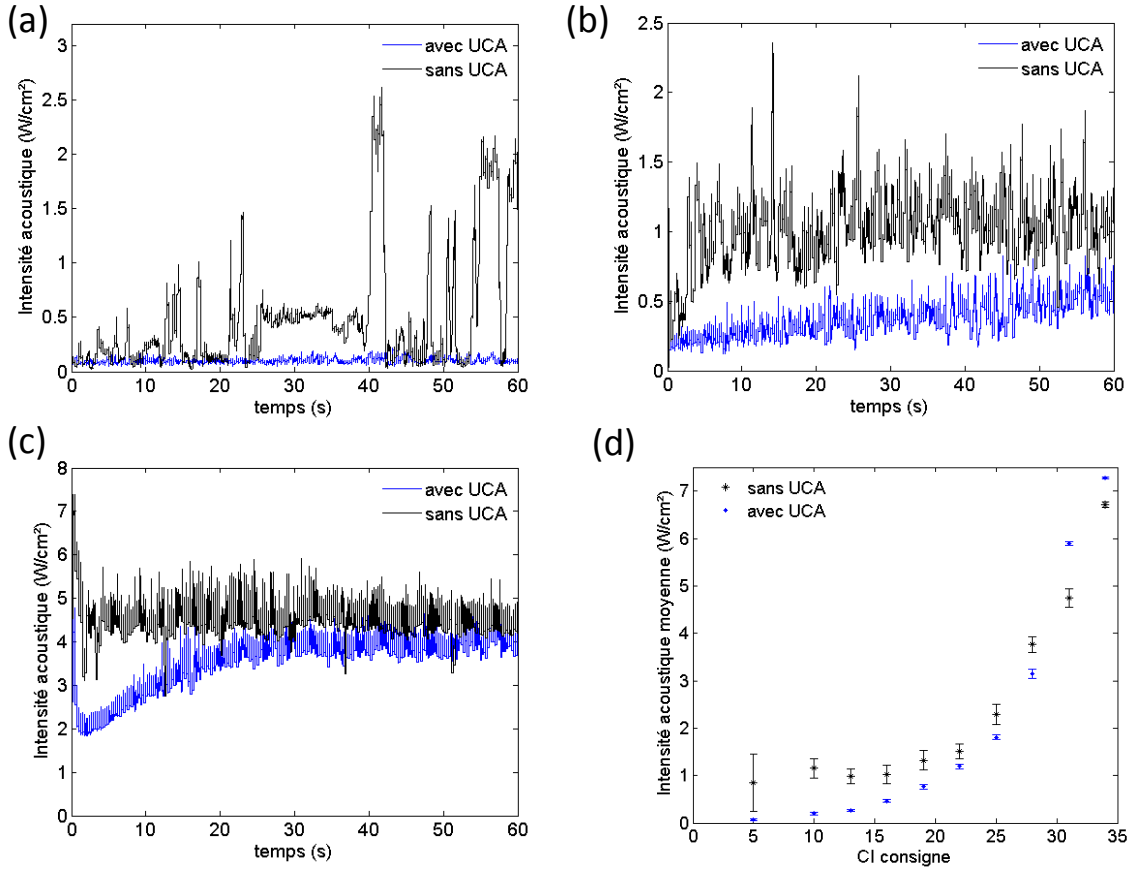


FIGURE 2.16 – Exemples d'évolution de l'intensité acoustique appliquée aux transducteurs en fonction du temps pour des CI consignes de 5 (a/), 13 (b/) et 28 (c/) avec et sans UCAs. d/ intensité acoustique moyenne appliquée pour les différents CI consignes avec et sans UCAs.

où le champ acoustique est celui obtenu en section 2.1.2. Celui-ci est plutôt homogène selon x et est choisi seulement dépendant de y et de z ici :

$$P_a(y, z, t) = -P_a \cos\left(\frac{8\pi y}{L_y}\right) \cos\left(\frac{3\pi z}{2L_z}\right) \sin(\omega t) \quad (2.5)$$

En reportant dans l'expression de la force de Bjerknes primaire (2.3) :

$$\overrightarrow{F_{Bj}} = -\frac{4}{3}R_0^3 \left[1 + \frac{3P_a \cos\left(\frac{8\pi y}{L_y}\right) \cos\left(\frac{3\pi z}{2L_z}\right) \sin(\omega t)}{\rho R_0^2 (\omega_0^2 - \omega^2)} \right] \begin{Bmatrix} P_a \frac{8\pi}{L_y} \sin\left(\frac{8\pi y}{L_y}\right) \cos\left(\frac{3\pi z}{2L_z}\right) \sin(\omega t) \\ P_a \frac{3\pi}{2L_z} \cos\left(\frac{8\pi y}{L_y}\right) \sin\left(\frac{3\pi z}{2L_z}\right) \sin(\omega t) \end{Bmatrix} \quad (2.6)$$

En prenant la moyenne sur une période acoustique $\langle \cdot \rangle_T$:

$$\langle \overrightarrow{F_{Bj}} \rangle_T = \frac{-4\pi R_0^3 3P_a^2}{3\rho R_0^2 (\omega_0^2 - \omega^2)} \begin{Bmatrix} \frac{4\pi}{L_y} \sin\left(\frac{16\pi y}{L_y}\right) \cos^2\left(\frac{3\pi z}{2L_z}\right) \\ \frac{3\pi}{4L_z} \cos^2\left(\frac{8\pi y}{L_y}\right) \sin\left(\frac{3\pi z}{2L_z}\right) \end{Bmatrix} \quad (2.7)$$

Les positions d'équilibre de bulles résultent de l'annulation des forces de radiations acoustiques primaires exercées (2.7), et sont données par :

$$\sin\left(\frac{16\pi y}{L_y}\right) = 0 \rightarrow \frac{16\pi y}{L_y} = n\pi \rightarrow y = \frac{nL_y}{16} \quad (2.8)$$

$$\cos^2\left(\frac{3\pi z}{2L_z}\right) = 0 \rightarrow \frac{3\pi z}{2L_z} = (m + 1/2)\pi \rightarrow z = \frac{2mL_z}{3} + \frac{L_z}{3} \quad (2.9)$$

$$\cos^2\left(\frac{8\pi y}{L_y}\right) = 0 \rightarrow \frac{8\pi y}{L_y} = (p + 1/2)\pi \rightarrow y = \frac{pL_y}{8} + \frac{L_y}{16} \quad (2.10)$$

$$\sin\left(\frac{3\pi z}{L_z}\right) = 0 \rightarrow \frac{3\pi z}{L_z} = q\pi \rightarrow z = \frac{qL_z}{3} \quad (2.11)$$

L'amplitude de la force de Bjerknes primaire dans le puits est présentée sur la Figure 2.17a. Les positions d'équilibre des bulles correspondent aux nœuds et aux ventres du champ de pression acoustique (2.17b). Les petites bulles (dont le rayon est inférieur au rayon de résonance $R < R_{res}$) sont attirées vers les ventres de pression acoustique alors que les grosses bulles ($R > R_{res}$) sont attirées vers les nœuds de pression acoustique d'après la première force de Bjerknes (Eller, 1968). Le rayon de résonance dans l'eau est approximé par $R_{res} = 3/f$ où f est la fréquence d'excitation, et donc dans notre cas $R_{res} \sim 7 \mu\text{m}$.

Il y a donc des positions d'équilibres stables au fond du puits, où se trouvent les cellules, ainsi que dans le volume.

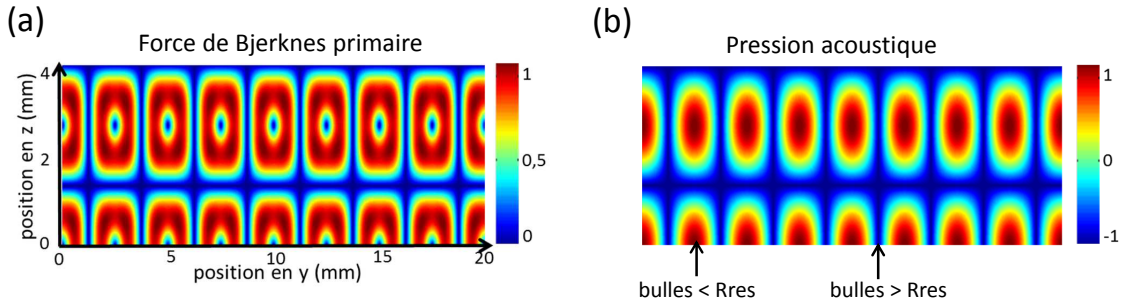


FIGURE 2.17 – Force de Bjerknes primaire dans le puits pour un champ de pression acoustique $P_a(y, z) = -P_a \cos\left(\frac{8\pi y}{L_y}\right) \cos\left(\frac{3\pi z}{2L_z}\right)$: a/ force de Bjerknes primaire et b/ champ de pression acoustique.

2.3.2 Observations de bulles

En théorie, d'après le calcul de la force de Bjerknes primaire il y a des positions d'équilibre stables pour les bulles à la fois au fond du puits et dans le milieu. Afin de vérifier la présence de bulles à ces positions, des observations sous microscope et macroscopie sont réalisées.

Tout d'abord la présence de bulles au fond du puits est attestée par des observations sous microscope confocal (Leica TCS SP5) pour des excitations acoustiques continues. Des nuages de bulles près du fond du puits et qui se déplacent sont observés. Quelques images sont présentées sur la Figure 2.18. On y voit des bulles de différentes tailles : à $t=26$ s le rayon des bulles est compris entre 4 et 18 μm , tandis qu'à $t=40$ s ceux-ci sont de 2 à 10 μm . Les bulles de cavitation présentes au fond du puits

sont posées au fond pour certaines alors que d'autres présentent un comportement particulier qui sera décrit plus en détail dans le chapitre 4.

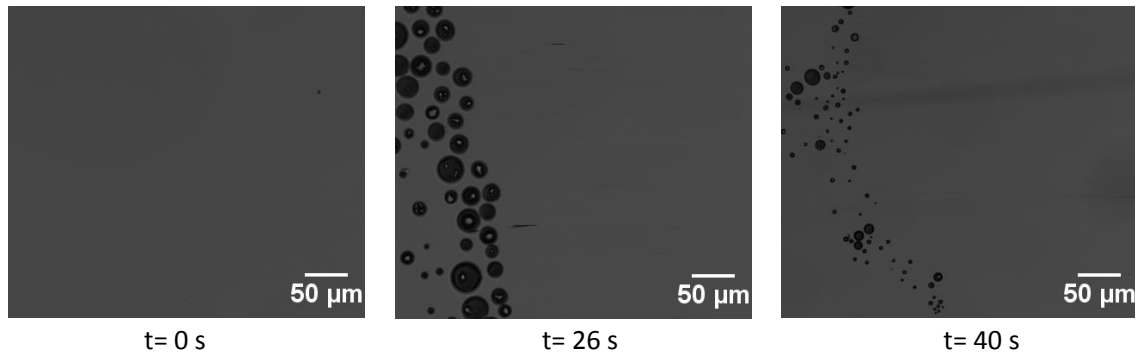


FIGURE 2.18 – Observation de bulles de cavitation au fond du puits pendant un tir ultrasonore continu à CI 20.

La présence de bulles de cavitation a également été attestée dans le milieu par des observations sous microscope pour des excitations acoustiques continues. Les bulles observées montrent un comportement particulier : elles se translatent le long des lignes nodales du champ de pression acoustique. Tout d'abord, elles se trouvent sur les lignes nodales car leur rayon est largement supérieur au rayon de résonance (Cf paragraphe 2.3.1) : un exemple de la position des bulles dans le puits en fonction du temps est présenté sur la Figure 2.19a. Mais de plus, les bulles ont donc tendance à se déplacer dans la direction x alors que le champ acoustique d'onde stationnaire est dans la direction y . Un exemple du déplacement d'une bulle en x et y en fonction du temps est présenté sur la Figure 2.19b. La bulle se déplace très peu dans la direction y et a une amplitude de déplacement plus importante en x avec une période de déplacement de l'ordre de 0,3 seconde.

Le fait que les bulles, observées en Figure 2.19, réalisent des translations quasi-périodiques le long des lignes nodales fait intuitivement référence aux instabilités de translations que subissent des bulles dans un champ de pression acoustique suffisamment important (où le couplage oscillations radiales-translations est pris en compte, voir chapitre 1). En effet, dans ce cas, des bulles peuvent se déplacer de leur position d'équilibre stable à une position d'équilibre instable, voire se translater (Doinikov, 2002) ou orbiter (Desjoux *et al.*, 2013a), autour de ces positions d'équilibre instables. Au vu de la cartographie du champ de pression acoustique expérimental (Figure 2.3) et du champ de Bjerknes primaire théorique (Figure 2.17a), le champ de pression est principalement unidimensionnel selon la direction y , même si un mode acoustique selon x existe (identification du champ de pression au mode (4, 8, 1) pour rappel). Par conséquent, si la bulle subissait une instabilité de translation liée au champ acoustique, le gradient de pression plus élevé selon la direction y devrait favoriser les instabilités de translation selon cette direction au détriment de la direction transverse (selon x). Puisque l'ensemble des bulles décrivant les translations observées en Figure 2.19 (et ce pour l'ensemble des acquisitions) se translatent le long des lignes nodales (selon x), et jamais selon y , alors l'effet du champ acoustique seul ne suffit pas à expliquer ce déplacement. Ce comportement atypique peut être lié à la présence d'un champ hydrodynamique dans le puits et à son couplage avec le champ acoustique. En effet, des bulles

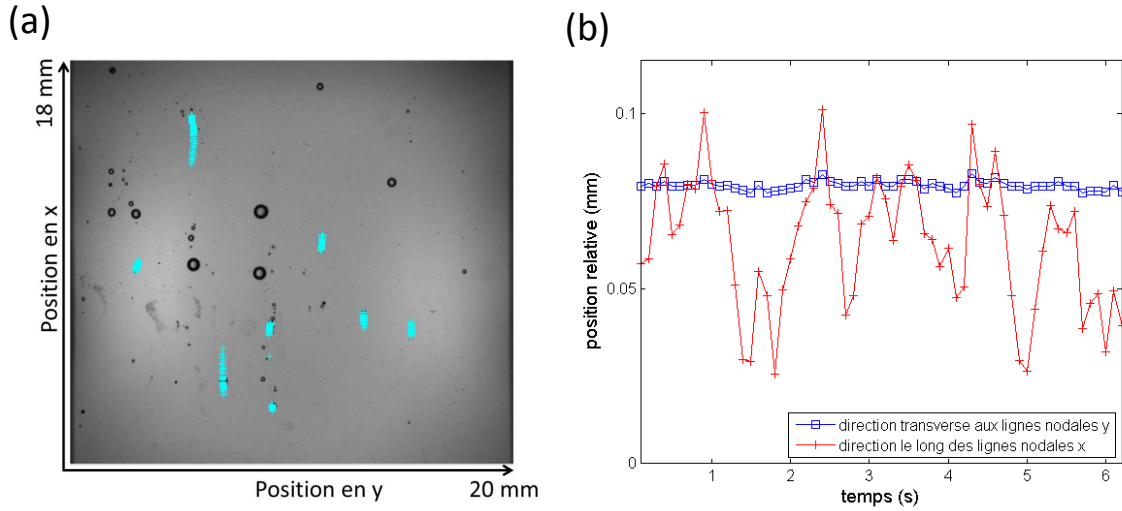


FIGURE 2.19 – Translations de bulles le long des lignes nodales pour une excitation continue : a/ positions des bulles dans le puits de culture observé au microscope au cours du temps (acquisition d’image toutes les 0,1 secondes et relevé des positions sur 60 images) et b/ déplacement d’une bulle dans la direction des lignes nodales et dans la direction transverse en fonction du temps.

non oscillantes (généralement le cas dans les études en milieux diphasique ou multiphasique) et leur interaction avec un vortex (tourbillon) sont étudiées intensivement dans le contexte des systèmes de propulsion marins, de la turbulence des jets ou des bioréacteurs, entre autres (Milenkovic *et al.*, 2007). Le déplacement d’une bulle dans un vortex idéal résulte, suivant la vitesse de rotation de celui-ci, en un cycle limite pour la position de la bulle autour du centre du vortex, ou le piégeage de la bulle au centre de celui-ci (Oweis *et al.*, 2005; Milenkovic *et al.*, 2007; Rastello *et al.*, 2011). Dans le cas où un champ acoustique axisymétrique a été localement ajouté à un écoulement fluide (Rensen *et al.*, 2001), une bulle peut décrire une trajectoire spiralante par compétition entre les forces acoustique (de pression de radiation) et hydrodynamique. Puisque dans l’étude de Rensen *et al.* (2001), la trajectoire spiralante des bulles est induite par un champ acoustique axisymétrique, notre postulat de départ est de considérer qu’un champ acoustique à symétrie cartésienne, couplé à un champ hydrodynamique (s’il existe), pourrait induire les translations observées.

2.3.3 Écoulement hydrodynamique

Afin d’avoir une idée de l’écoulement macroscopique dans le puits et donc du champ hydrodynamique lors de l’insonification, celui-ci a été observé sous microscope (MacroFluo, Leica) en utilisant des microparticules de $2 \mu\text{m}$ (concentration= 10^{-2} g.L^{-1} , $\lambda_{excitation} = 505 \text{ nm}$ et $\lambda_{émission} = 515 \text{ nm}$, Invitrogen). Des insonifications de 30 secondes pour une excitation acoustique continue et pour différents CI et intensités acoustiques ont été réalisées. Sur les vidéos, il apparaît que l’écoulement macroscopique est composé de tourbillons à grande échelle (4 tourbillons la plupart du temps). Des exemples de ces écoulements sont présentés sur la Figure 2.20. Cette figure présente l’image cumulée de toutes les images d’une vidéo. La présence de 4 tourbillons est observée sur les Figures 2.20a, b et c mais sur

la Figure 2.20d seuls 3 tourbillons sont observés.

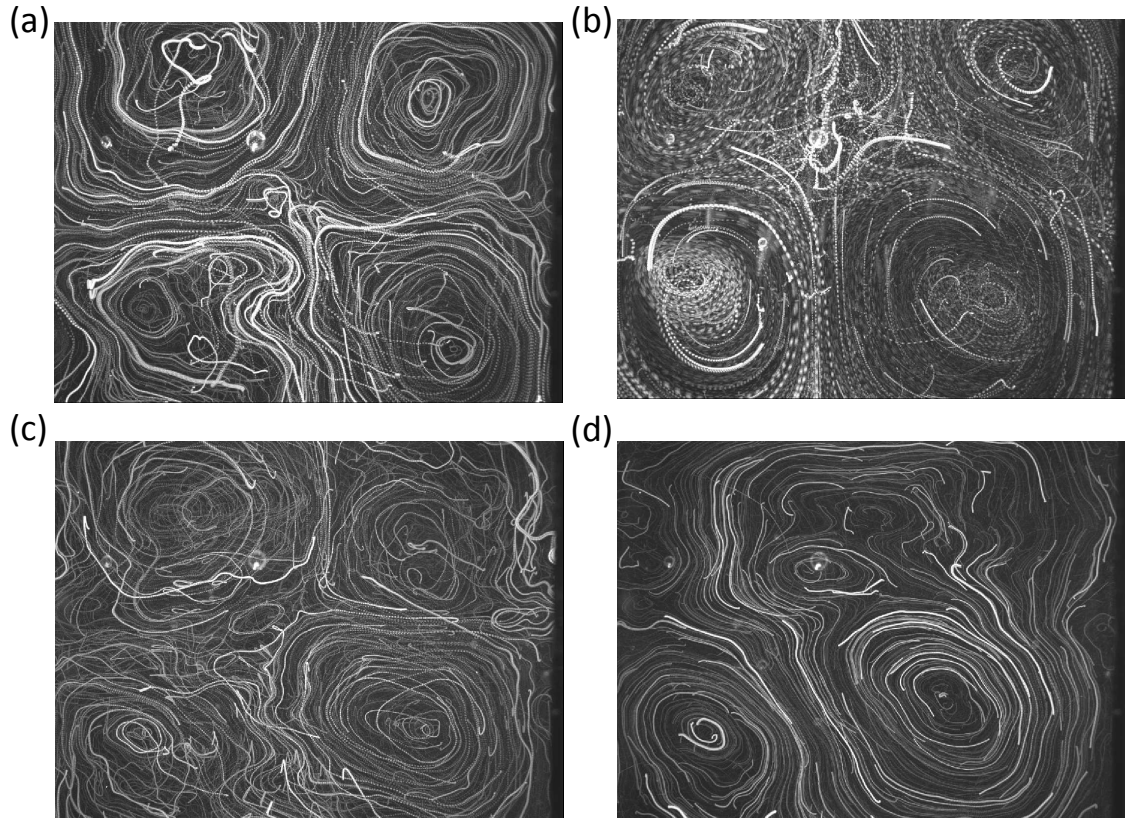


FIGURE 2.20 – Exemple d’écoulements macroscopiques observés dans le puits : projection des images de vidéos de 30 secondes pour des CI consignes 10 (a/) et 18 (b/) et des intensités acoustiques fixées $0,35 \text{ W.cm}^2$ (c/) et $0,06 \text{ W.cm}^2$ (d/).

Ces tourbillons semblent liés à du streaming acoustique. Le streaming acoustique désigne un écoulement induit par une onde acoustique. Il existe différents type de streaming (Debesse, 2008). Celui-ci peut être piloté par les effets visqueux, c’est le cas du streaming de Rayleigh. Ce type de streaming est caractérisé par des cellules de recirculation du fluide de dimension $\lambda/4$. Lorsque le streaming est induit par la dissipation de l’énergie acoustique d’une onde se propageant dans un fluide, on parle de streaming d’Eckart. Ce streaming est piloté par des jets dans des cavités fermées (Botton *et al.*, 2014) et nécessite la présence d’ondes progressives dans le milieu. Il est caractérisé par des cellules de recirculation dont les dimensions sont caractéristiques des dimensions de la cavité. Dans notre configuration, les écoulements observés ont une dimension caractéristique de la moitié de la largeur du puits, très grande devant la longueur acoustique, et semble donc correspondre à du streaming d’Eckart. Le fait que les cellules de recirculation observées soient asymétriques ou de nombres différents pourrait résulter des différences de puissances acoustiques délivrées par chaque transducteur au cours du temps, entre autre, et ce à fortiori, de manière plus prononcée en configuration CI imposé puisque l’intensité acoustique est modulée au cours du temps.

Le suivi des microbilles au cours de chaque acquisition a été réalisée par méthode PIV (Particle

Image Velocimetry) grâce au logiciel PIVlab. A partir d'une acquisition vidéo (Figure 2.21a), l'analyse des déplacements image par image des microbilles permet d'obtenir des cartographies du champ vectoriel de vitesse (Figure 2.21b). La vitesse moyenne des écoulements est ainsi de l'ordre du mm/s, vitesse estimée à environ 200-300 μm du fond du puits (car la mise au point sur une acquisition a été effectuée par l'intermédiaire d'une grosse bulle ($R \sim 300 \mu\text{m}$)). Il apparait que la vitesse des tourbillons est corrélée au CI moyen plutôt qu'à l'intensité acoustique moyenne comme on aurait pu s'y attendre (Figure 2.21c et d). Il est plutôt étonnant que la vitesse de l'écoulement soit corrélée à l'indice de cavitation inertielle, cela pourrait être dû à un effet d'entraînement du fluide par les bulles de cavitation.

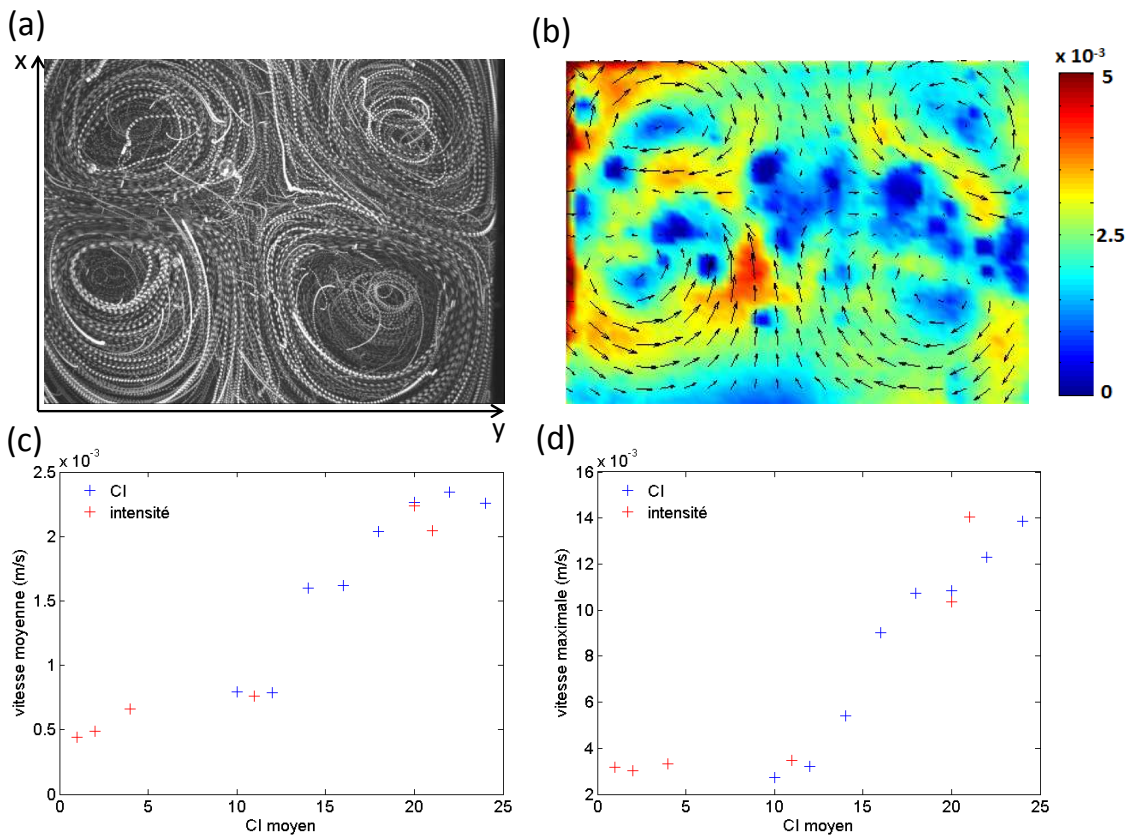


FIGURE 2.21 – Mesure de l'écoulement macroscopique : a/ projection de toutes les images d'une vidéo de l'écoulement macroscopique dans le puits entier pour un CI consigne 14 (vu du dessus, les transducteurs sont placés à droite et à gauche de l'image), b/ champ de vitesse moyenne (les flèches indiquent la direction et la couleur la norme en m/s) sur le puits pour la même vidéo ainsi que sa direction obtenu avec le logiciel PIVlab, c/ et d/ vitesse moyenne et maximale des tourbillons respectivement en fonction du CI moyen obtenu au cours des tirs.

Puisque l'existence d'écoulement hydrodynamique a été montrée, il est maintenant intéressant d'étudier son influence sur le déplacement des bulles dans le puits, avec prise en compte du champ acoustique. Une étude numérique est proposée, avec les hypothèses simplificatrices suivantes :

- Le problème est plan (dans le plan (x, y) du puits) et la cellule élémentaire d'étude ne contient

qu'un seul tourbillon (l'équivalent d'un quart de notre puits).

- Le champ acoustique est unidimensionnel selon y et s'écrit $P_{ac}(x, y) = P_0 \sin(k_x x)$ avec $k_x = 4\pi/L_x$.
- L'écoulement ou tourbillon étudié est un tourbillon de Burgers. Ces tourbillons sont des solutions exactes des équations de Navier-Stokes, et décrivent des écoulements stationnaires. Son champ de vitesse (u, v) dans la cellule élémentaire s'écrit :

$$u = -Ax - \frac{y}{2\pi r^2} \left[1 - \exp\left(-\frac{r^2}{2}\right) \right]$$

$$v = -Ay + \frac{x}{2\pi r^2} \left[1 - \exp\left(-\frac{r^2}{2}\right) \right]$$

$$r^2 = x^2 + y^2$$

$$A = \nu/\Gamma$$

où u est la composante de la vitesse du tourbillon dans la direction x , v celle dans la direction y , ν est la diffusion visqueuse et Γ la circulation du tourbillon.

- La bulle étudiée est une bulle de 100 μm de rayon, et les couplages entre ses oscillations radiales et sa translation ne sont pas pris en compte.

En réalisant un bilan des forces agissant sur la bulle, son mouvement est régi par le Principe Fondamental de la Dynamique :

$$\frac{d\vec{u}_b}{dt} = \frac{1}{\rho_b V_b} (\vec{F}_I + \vec{F}_D + \vec{F}_L + \vec{F}_{Bj}) \quad (2.12)$$

où ρ_b , V_b et u_b désignent respectivement la masse volumique, le volume et la vitesse de la bulle et les forces \vec{F}_I , \vec{F}_D , \vec{F}_L , \vec{F}_{Bj} représentent respectivement la force d'inertie, de trainée, de portance et la force de Bjerknes primaire. Celles-ci s'écrivent :

$$\vec{F}_D = -\frac{3}{8d} |\vec{W}| \cdot \vec{W} \quad (2.13)$$

$$\vec{F}_L = -\frac{1}{2} \cdot [\vec{W} \wedge (\vec{\nabla} \wedge \vec{u}_l)] \quad (2.14)$$

$$\vec{F}_I = \left(1 + \frac{1}{2}\right) \cdot \frac{D_l \vec{u}_l}{D_t} \quad (2.15)$$

$$\vec{F}_{Bj} = -V_b \vec{\nabla} P_{ac} \quad (2.16)$$

où d désigne le diamètre de la bulle, \vec{u}_l et $\vec{W} = \vec{u}_b - \vec{u}_l$ désignent la vitesse du liquide et la vitesse relative entre la bulle et le liquide, et $\frac{D_l}{D_t}$ représente la dérivée particulière $\frac{D_l}{D_t} = \frac{\partial}{\partial t} + \vec{u}_l \cdot \nabla$ (\cdot).

Un schéma présentant ces différentes forces s'appliquant sur une bulle est présenté sur la Figure 2.22. L'équation (2.12) est une équation différentielle résolue sous Matlab à partir des conditions initiales de position donnée pour la bulle et de vitesse nulle.

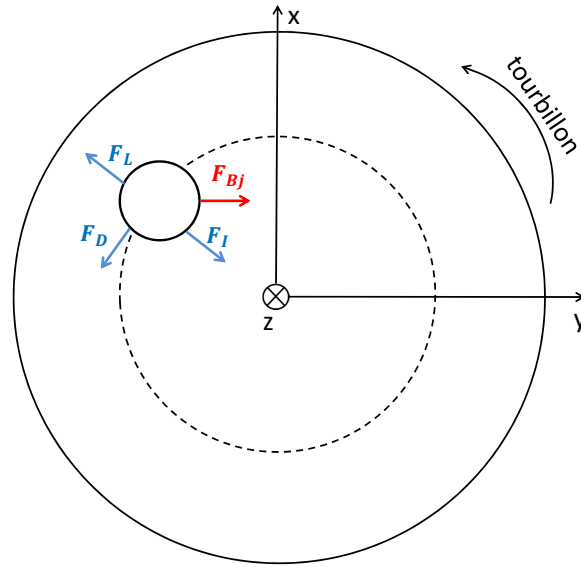


FIGURE 2.22 – Schéma récapitulatif des forces qui s’appliquent sur une bulle dans un tourbillon de Burger et en présence d’un champ acoustique stationnaire 1D.

Dans le cas où la bulle se trouve en présence du champ acoustique seul, la bulle se déplace jusqu’à la ligne nodale la plus proche et la bulle se retrouve piégée à cette position. La position de la bulle en présence du champ acoustique est présentée sur la Figure 2.23. Le champ de vitesse acoustique est tracé sur la Figure 2.23a, et la bulle qui avait pour position initiale (0,2, 0,2) se translate vers un maximum du champ de vitesse (1, 0,2) donc un nœud de pression acoustique (position d’équilibre stable pour les bulles de rayon supérieur au rayon résonant). Le déplacement de la bulle au cours du temps dans les directions x et y est tracé sur la Figure 2.23b. Pour cette simulation test où seul le champ acoustique existe, une force de trainée de Stokes $F_d = -12\pi\mu R_b(u_{ac} - ub)$ avec μ la viscosité dynamique du liquide et u_{ac} la vitesse acoustique, a été prise en compte.

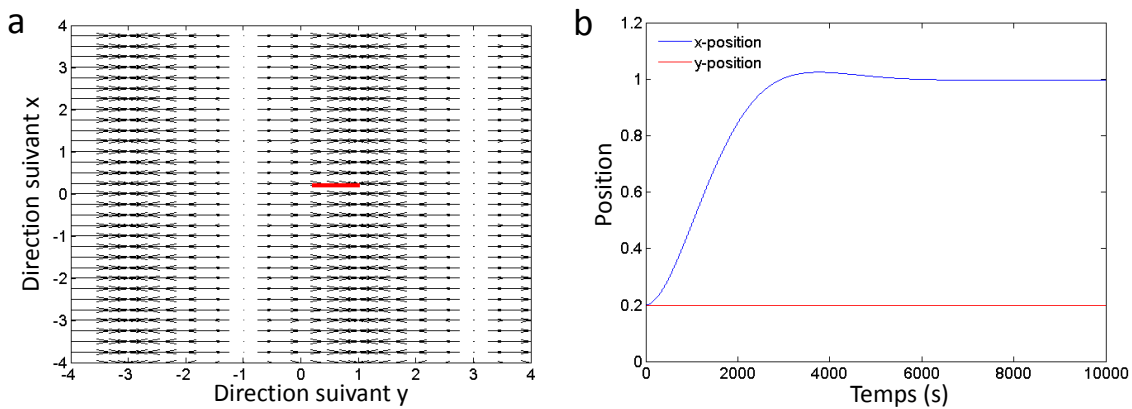


FIGURE 2.23 – Déplacement de la bulle (100 μm de rayon) en présence du champ acoustique seul : a/déplacement en (x, y) dans le champ de vitesse et b/ déplacement dans ces 2 directions en fonction du temps.

Dans le cas où seul le champ hydrodynamique est présent, deux cas de figure sont possibles en fonction de l'amplitude de A , liée à la circulation du tourbillon. Dans le cas où A est de faible amplitude, il y a équilibre entre la force de portance et d'inertie et la bulle est piégée le long d'un cycle limite (Figure 2.24a et b). Pour une amplitude A plus importante, la bulle est piégée au centre du tourbillon (Figure 2.24c et d). Les résultats sont en accord avec les études bibliographiques en milieux diphasiques (Oweis *et al.*, 2005; Milenkovic *et al.*, 2007; Rastello *et al.*, 2011).

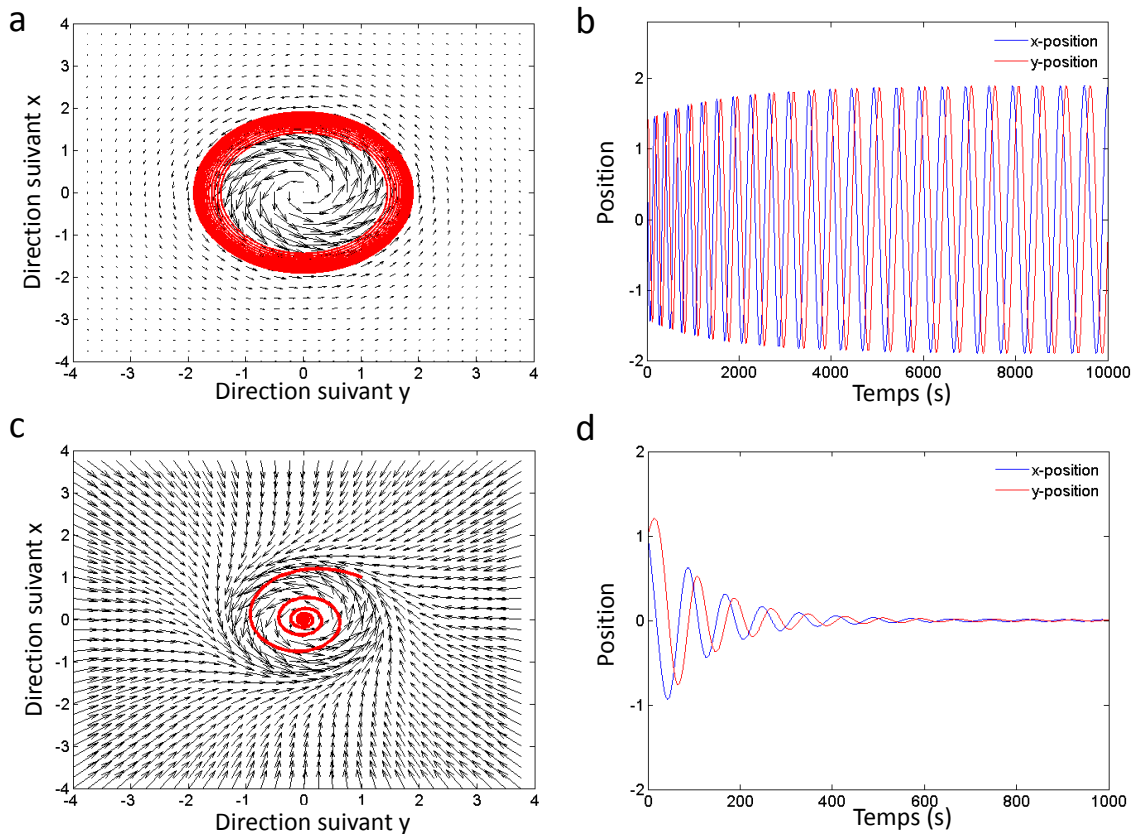


FIGURE 2.24 – Déplacement de la bulle ($100 \mu\text{m}$ de rayon) en présence du champ hydrodynamique seul : deux cas sont possibles en fonction de l'amplitude de A : a/déplacement en (x, y) dans le champ de vitesse et b/ déplacement dans ces 2 directions en fonction du temps pour A de faible amplitude et c/déplacement en (x, y) dans le champ de vitesse et d/ déplacement dans ces 2 direction en fonction du temps pour A d'amplitude plus importante.

Lorsque le champ acoustique est maintenant superposé au tourbillon, il est possible, pour un champ acoustique suffisamment intense, de piéger une bulle sur la ligne nodale avant déplacement le long de celle-ci (induit par la composante verticale de vitesse du champ hydrodynamique) jusqu'à atteindre une nouvelle position d'équilibre (Figure 2.25a et b). Ce résultat, intuitivement évident, ne permet pas d'obtenir les translations quasi-périodiques de bulles observées, et ce à cause du caractère stationnaire à la fois de l'écoulement et du champ acoustique considérés. Il semble alors nécessaire de prendre en compte des instabilités dans le modèle, et des instabilités temporelles sur la circulation du tourbillon (observées expérimentalement) sont donc ajoutées. Pour cela, le paramètre A , lié à la circulation du

tourbillon, est défini comme $A = \langle A \rangle + \delta A f(\Omega t)$, avec $\langle A \rangle$ sa valeur moyenne et δA sa fluctuation se déroulant sur une période en $1/\Omega$.

L'ordre de grandeur de ces paramètres est retrouvé par la mesure de la composante en y de la vitesse le long d'une ligne $x = 0$. En effet, dans ce cas, la vitesse du tourbillon de Burgers est :

$$u = -\frac{y}{2\pi r^2} \left[1 - \exp\left(-\frac{r^2}{2}\right) \right]$$

$$v = -Ay$$

et donc la pente de la vitesse en y de le long d'une ligne en $x = 0$ permet de mesurer le paramètre A expérimental. Cette mesure est effectuée pour 60 images (soit 6 secondes) et pour chaque mesure de la vitesse en y , le coefficient directeur de la droite est déterminé par interpolation linéaire. La valeur moyenne de A_{exp} est ainsi $\sim 0,3$, l'amplitude des variations de A est calculé et est de l'ordre de $\delta_{exp} A \sim -0,9 < A_{exp} >$. La période des translations étant de l'ordre de 0,3 seconde, le paramètre Ω_{exp} vaut environ 21 rad/s. Pour la simulation, la fonction $f(\Omega t)$ est choisie comme étant $\cos(\Omega t)$.

En présence de ces deux champs et dans le cas où il y a des fluctuations temporelles dans la vitesse du tourbillon, la bulle se déplace jusqu'à la ligne nodale puis se translate le long de la ligne nodale autour de la position d'équilibre observée dans le cas sans fluctuations temporelles du tourbillon (Figure 2.25c et d).

En résumé, les translations de bulles le long des lignes nodales sont non seulement dues à la présence simultanée des champs acoustique stationnaire et hydrodynamique composé de tourbillons, mais également aux fluctuations temporelles des tourbillons. Cet effet original pourrait être utilisé comme marqueur de la présence d'écoulements hydrodynamiques importants dans les réacteurs acoustiques. A terme, il serait intéressant de poursuivre cette étude par une analyse théorique plus poussée des positions d'équilibre de bulles en fonction des champs en présence, et ce en fonction aussi du rayon des bulles considérées.

2.4 Conclusion

Un système de sonoporation dédié aux cellules adhérentes a été développé. Le système d'insonification (composé de deux transducteurs piézoélectriques adaptés à la fréquence 426,5 kHz et inclus dans une platine de microscope), permet la visualisation en temps-réel sous microscope. Ces deux transducteurs, placés en vis à vis contre un puits de culture cellulaire parallélépipédique, produisent un champ d'onde quasi-stationnaire à l'intérieur de celui-ci.

Un hydrophone aiguille, placé contre un autre côté du puits, permet d'écouter le bruit de cavitation acoustique et est utilisé pour réguler l'activité de cavitation inertielle. La régulation de l'activité de cavitation inertielle consiste à obtenir un indice de cavitation inertielle consigne, correspondant à un niveau du bruit large bande sur le spectre du signal mesuré par l'hydrophone, en modulant l'intensité acoustique appliquée. Celle-ci permet de s'affranchir d'effets non désirés comme des problèmes de stabilité temporelle du niveau de cavitation ou d'initiation de la cavitation, et cela sans utiliser d'agents de contrastes ultrasonores.

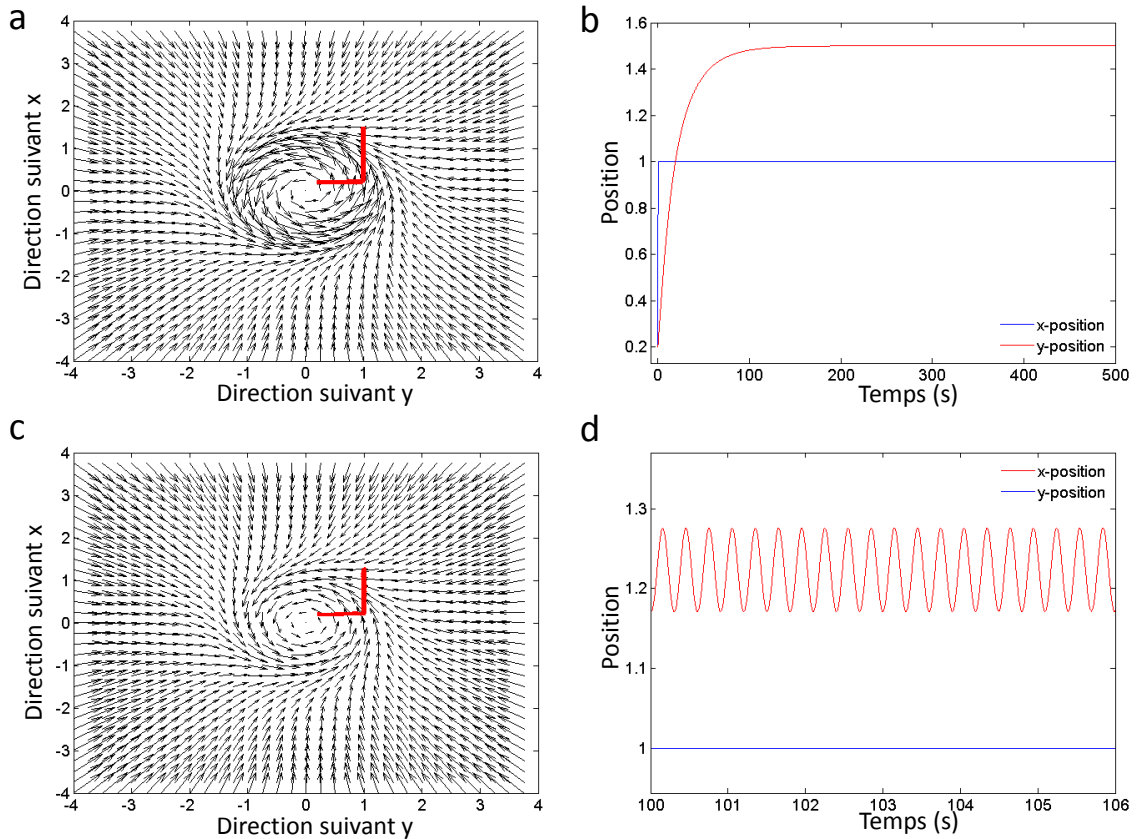


FIGURE 2.25 – Déplacement de la bulle ($100 \mu\text{m}$ de rayon) en présence des champs hydrodynamique et acoustique : a/déplacement en (x, y) dans le champ de vitesse et b/ déplacement dans ces 2 direction en fonction du temps c/déplacement en (x, y) dans le champ de vitesse et d/ déplacement dans ces 2 directions en fonction du temps lorsque des instabilités temporelles du tourbillon sont rajoutés.

La présence du champ acoustique d'ondes quasi-stationnaires résulte en des positions d'équilibre pour les bulles. Ces positions sont soit au fond, donc des bulles qui interagiraient certainement avec les cellules également au fond du puits, ou dans le milieu, où certaines bulles exhibent des comportements particuliers en se translatant le long des lignes nodales. Ce comportement n'est pas induit seulement par le champ acoustique mais par la présence simultanée des ondes stationnaires et d'un champ hydrodynamique composé de tourbillons à grande échelle qui présentent des fluctuations temporelles. Une caractérisation acoustique et hydrodynamique du dispositif a ainsi été réalisée, confirmant la possibilité de caviter, en particulier au fond du puits.

Chapitre 3

Mise en oeuvre du système de cavitation régulée sur les cellules adhérentes.

Le système de sonoporation présenté au chapitre 2 a pour objectif la visualisation en temps réel sous microscope afin d'obtenir des informations sur les interactions bulles-cellules-milieu environnant. Pour cela, des cellules adhérentes sont utilisées. La sonoporation de cellules adhérentes est un challenge en soi car si dans la littérature de nombreuses études sur la sonoporation ont portées sur des cellules en suspension, très peu l'ont été sur les cellules adhérentes (chapitre 1). Sonoporer des cellules sans les détacher auparavant (sans les remettre en suspension) est particulièrement intéressant pour les cellules fragiles, comme les cellules primaires, qui ne sont utilisables que sur un petit nombre de passages¹ après lesquels les cellules vont dégénérer. L'utilisation de la régulation de l'activité de cavitation inertielle permet une meilleure reproductibilité des résultats de sonoporation dans le cas de cellules en suspension (Lo *et al.*, 2014) car il y a une corrélation entre l'énergie du bruit large bande et la sonoporation (Sundaram *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2008). Dans notre système d'insonification, l'activité de cavitation inertielle est régulée dans le volume du puits et les cellules à sonoporer sont situées au fond du puits. Il faut donc vérifier si dans notre cas la régulation de l'activité de cavitation inertielle permet bien une augmentation de la reproductibilité des résultats de sonoporation. De plus, l'utilisation de la régulation pourrait permettre de s'affranchir de paramètres extérieurs comme la température du milieu. En effet, la plupart des expériences de sonoporation sont réalisées à température physiologique ce qui est plus contraignant, en terme de préparation de l'expérience, que de travailler à température ambiante.

Dans une première partie de ce chapitre, des mesures de sonoporation de cellules adhérentes sont réalisées. Dans un premier temps la sonoporation, le détachement et la mortalité induits pour des insonifications à intensité acoustique fixée ou à activité de cavitation inertielle fixée sont comparées. Puis différents paramètres biologique, environnemental et acoustiques ont été étudiés : la configuration

1. Un passage correspond au détachement des cellules par ajout de trypsine lorsque la culture est à confluence.

cellules détachées et cellules adhérentes, l'effet de la température du milieu, la durée des pulses et l'utilisation de tirs ultrasonores fragmentés dans le temps. Enfin, la caractère spatial de la sonoporation est investigué en excitant différents modes acoustiques de la cavité.

Dans une deuxième partie, l'effet des ultrasons et de la sonoporation est étudié sur la reprise de croissance des cellules après insonification. En effet il a été remarqué que la sonoporation pouvait mener à des effets d'anti-prolifération (Zhong *et al.*, 2011) par exemple. Une première expérience porte sur l'effet des ultrasons seuls, de la cavitation stable et de la cavitation inertielle sur la reprise de croissance, alors qu'une deuxième étude s'intéresse aux cellules insonifiées sonoporées ou non.

3.1 Sonoporation de cellules adhérentes

Tout d'abord, la possibilité de sonoporer des cellules adhérentes avec notre système d'insonification doit être montrée. Pour cela, une première expérience consiste à comparer les résultats de sonoporation de cellules adhérentes, de détachement et de mortalité pour des excitations acoustiques en intensité acoustique fixée ou en indice de cavitation inertielle fixé et différentes durées d'insonification.

Puis, est testée, pour comparaison, la possibilité de sonoporer des cellules soit adhérentes soit en suspension : en effet, dans la littérature la plupart des expériences de sonoporation sont réalisées en configuration resuspendue. Ensuite est évaluée l'influence de la température du milieu (température ambiante vs température physiologique) : dans la littérature, lorsque ces deux températures ont été testées, il n'y a que peu de sonoporation/transfection à température ambiante en condition cavitation inertielle non régulée par rapport aux résultats à température physiologique. Finalement, afin de déterminer le meilleur compromis sonoporation/détachement/mortalité, l'effet de la durée des pulses d'excitation et de la fragmentation de l'excitation acoustique (pauses de 10 ou 30 secondes toutes les minutes) a été considéré.

Enfin, la dépendance spatiale des paramètres biologiques a été évaluée en variant la fréquence d'excitation et donc la présence de différents modes acoustiques.

3.1.1 Méthode de mesure de la sonoporation

La cavitation inertielle va générer des pores transitoires à la surface des cellules. L'utilisation de molécules fluorescentes, pénétrant faiblement dans les témoins, permet de quantifier les cellules sonoporées par cytométrie en flux.

Principe de la cytométrie

La cytométrie est une technique qualitative et quantitative de caractérisation individuelle de particules en suspension. L'analyse d'informations physiques (fluorescence et diffusion lumineuse) est permise par l'utilisation de divers lasers. Un schéma des optiques d'un cytomètres de flux est présenté sur la Figure 3.1. Par exemple, si une cellule contenant le fluorochrome AlexaFluor 488 passe devant le laser bleu (488 nm), l'AlexaFluor 488 va être excité et émettre de la fluorescence autour de 530 nm (dans le vert), signal qui sera capté dans le photomultiplicateur correspondant (Figure 3.1).

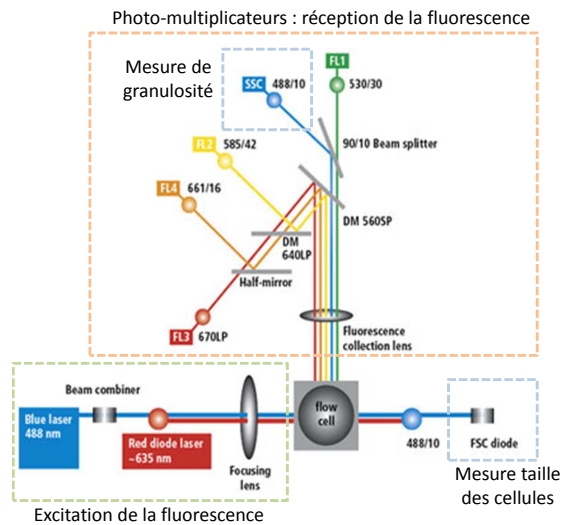


FIGURE 3.1 – Schéma des optiques du cytomètre de flux FACSCalibur.

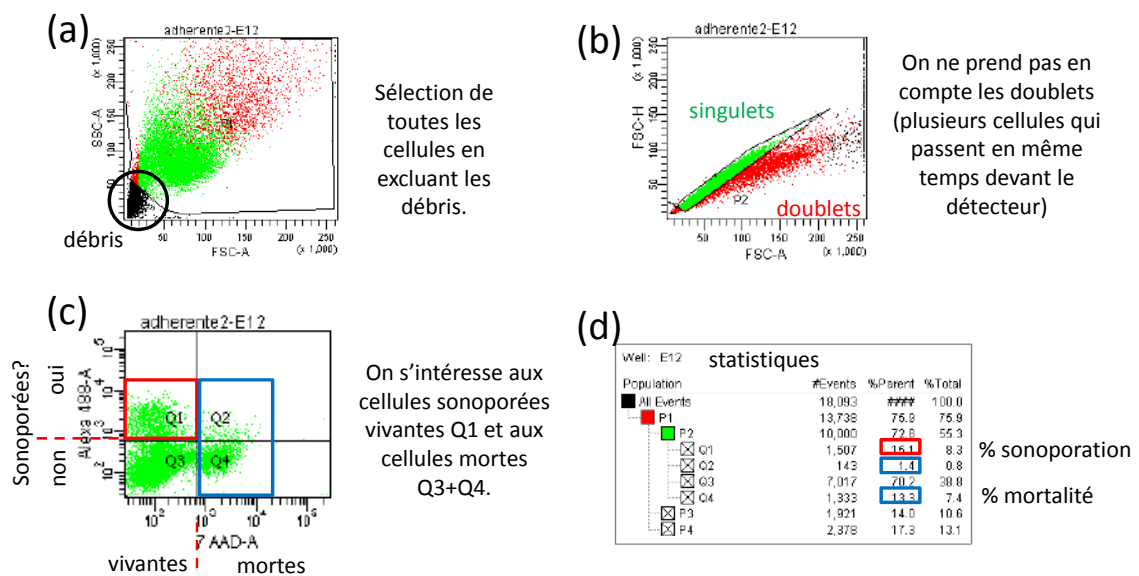


FIGURE 3.2 – Exemple de résultats obtenus après passage d'un échantillon au cytomètre de flux, obtenu avec le logiciel DIVA : en a/ les débris sont exclus de l'analyse, en b/ les doublets sont exclus de la population de cellules restantes, en c/ la population de cellules en fonction des marqueurs de sonoporation (AlexaFluo 488) et de mortalité (7-AAD) met en évidence 4 sous-populations. En d/ les résultats de sonoporation (cellules sonoporées vivantes Q1) et de mortalité (Q2+Q4) sont compilés dans un tableau.

Les cellules passent chacune leur tour devant le détecteur, laser bleu, ce qui permet de caractériser la taille (FSC) et la granulométrie (SSC) des cellules (Figure 3.1). A partir de ces paramètres, les débris de cellules sont exclus de l'analyse (Figure 3.2a) de même que les doublets (passage de plusieurs cellules en même temps) (Figure 3.2b). Pour chaque échantillon, les résultats de 10000 cellules sont compilés en 4 sous populations en fonction des marquages de sonoporation (AlexaFluo 488) et de mortalité

(7-AAD) (Figure 3.2c) :

- cellules vivantes et sonoporées, Q1
- cellules vivantes non sonoporées, Q3
- cellules mortes et sonoporées, Q2
- cellules mortes non sonoporées, Q4

Dans la suite, les paramètres relevés sont le nombre de cellules vivantes et sonoporées (Q1) pour la mesure du pourcentage de sonoporation et le nombre de cellules mortes (Q2+Q4) pour la mesure de mortalité (Figure 3.2d). La population Q2 est faible car les cellules mortes ont une membrane dégradée ne permettant pas de garder les marqueurs fluorescents.

Lors d'une insonification, une partie des cellules est détachée. Afin d'évaluer le détachement, les cellules détachées sont séparées des cellules toujours adhérentes à la fin du tir et analysées séparément au cytomètre. Les pourcentages de détachement et de mortalité sont déterminés de la manière suivante :

$$\text{nombre de cellules total} = \frac{\text{nombre de cellules}}{\text{temps de passage} \times \text{débit}} \times \text{volume échantillon}$$

$$\text{pourcentage de détachement} = \frac{\text{nombre cellules détachées}}{\text{nombre de cellules adhérentes} + \text{nombre de cellules détachées}} \times 100$$

$$\text{pourcentage de mortalité} = \frac{\text{nombre cellules adhérentes mortes} + \text{nombre de cellules détachées mortes}}{\text{nombre de cellules adhérentes} + \text{nombre de cellules détachées}} \times 100$$

Le paramètre de temps de passage est le temps nécessaire au passage des 10000 cellules. Le débit est choisi en début d'analyse et correspond à la vitesse du flux dans lequel passent les cellules. Plus il est élevé, plus il y a de chance d'avoir des doublets. Il est de l'ordre de 1 $\mu\text{L/s}$. Le volume de l'échantillon est 200 μL .

Culture cellulaire

Le modèle cellulaire utilisé, HT-29, est une lignée de cellules adhérentes de cancer colorectal humain (donnée par Dr. Lina Bolotine, Université Henri Poincaré Nancy 1, France). Ces cellules ont été choisies pour ses fortes propriétés d'adhésion en comparaison avec d'autres lignées cellulaires adhérentes. Sauf indications contraires, tous les réactifs proviennent de chez Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

Ces cellules sont mises en culture dans un incubateur humidifié à 37°C et 5% CO₂ dans l'air. Le milieu de culture est du RPMI 1640 complet (supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal (FCS), et de 200 UI/ml de pénicilline et 200 $\mu\text{g/mL}$ de streptomycine). Vingt-quatre heures avant l'insonification, les cellules (à confluence, c'est à dire recouvrant toute la surface de culture) sont collectées après 5 minutes d'incubation avec de la trypsine²-EDTA (0,05 % et 0,53 mM, respectivement), dénombrées au cellomètre Auto T4 (Nexcelom Bioscience, MA, USA) et la mortalité est évaluée au bleu de trypan. Les cellules sontensemencées dans les puits de culture Labtek (4,2 cm², Thermo Scientific Nunc, NY, USA) à 2.10⁶ cellules/puits, avec 2 mL de milieu RPMI 1640 complet.

2. enzyme rompant les liaisons cellule-substrat et cellule-cellule.

Protocole

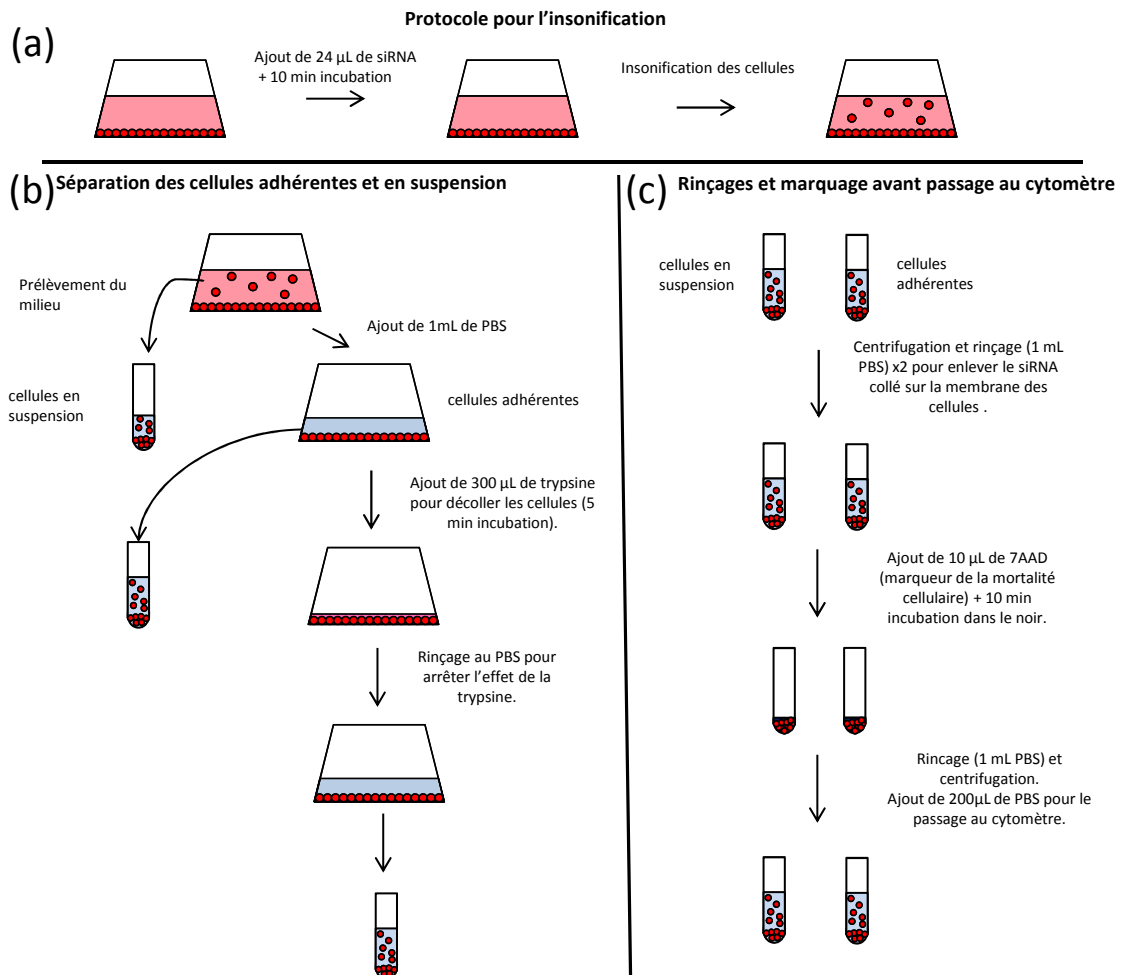


FIGURE 3.3 – Protocole de préparation des expériences de sonoporation : a/ pour l'insonification, b/ la séparation des cellules adhérentes et détachées et c/ les rinçages et marquage avant le passage au cytomètre de flux.

La sonoporation des cellules est quantifiée par l'utilisation de marqueurs fluorescents. Le choix s'est porté dans un premier temps sur le siRNA (AllStars Neg. siRNA AF 488, Qiagen, CA, USA) sur lequel est greffé un fluorochrome AlexaFluor 488 ($\lambda_{excitation} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{émission} = 530 \text{ nm}$). Le siRNA (7000 Da ou g/mol) est une séquence d'acide nucléique qui va se greffer à un ARN messager et réprimer sa traduction, c'est-à-dire une molécule qui bloque l'expression du gène. Bien que le siRNA utilisé soit un "contrôle négatif", il est impossible de prévoir son effet sur le génome des cellules. Dans un second temps, le dextran (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), "sucre" de taille variable (3 à 2000 kDa ou g/mol), lui aussi greffé au fluorochrome AlexaFluor 488, est utilisé en remplacement du siRNA car il est considéré comme biologiquement neutre. Ce remplacement s'est effectué après vérification de l'absence de différences dans les résultats de sonoporation. Le marqueur de mortalité utilisé est le 7-AAD, qui est un agent intercalant de l'ADN (ne pénétrant donc que dans les cellules mortes).

Celui-ci est excité à 488 nm et émet à 647 nm.

Les cellules sont ensemencées la veille pour être adhérentes au fond du puits le jour de l'insonification. Dix minutes avant insonification, 240 pmol de siRNA-AlexaFluor 488 sont ajoutés au milieu cellulaire afin que les molécules diffusent dans tout le milieu et en particulier vers le fond du puits où se trouvent les cellules. Les cellules sont ensuite insonifiées puis remises à l'incubateur avant traitement (Figure 3.3).

Avant passage au cytomètre de flux pour déterminer le nombre de cellules sonoporées, les cellules toujours adhérentes à la fin du tir sont séparées de celles qui se sont décrochées afin de pouvoir évaluer le détachement des cellules. Le tapis est ensuite rincé avec 1 mL de PBS et le rinçage est ajouté aux cellules détachées. Les cellules adhérentes sont décrochées en ajoutant dans chaque puits 300 μL de trypsine. Le tapis est ensuite rincé au PBS pour arrêter l'effet de la trypsine et collecté en tube. Les cellules sont ensuite centrifugées et rincées au PBS deux fois afin de bien laver les cellules des restes de molécules fluorescentes qui pourraient être collés sur les membranes. Les cellules sont ensuite marquées au 7-AAD (4 nmol/culot) et incubées 10 minutes au noir. Les cellules sont rincées une nouvelle fois pour enlever les restes de 7-AAD, centrifugées et finalement reprises dans 200 μL de PBS, avant passage au cytomètre de flux (FACS LSRII; Becton Dickinson, CA, USA) (Figure 3.3). Les résultats de cytométrie sont analysés avec le logiciel FACSDiva (Becton Dickinson, CA, USA).

Analyses statistiques

Les données sont vérifiées au niveau de la normalité et l'homogénéité de la variance respectivement par le test de Shapiro-Wilk et le test de Bartlett. De plus, l'analyse de variance (one-way ANOVA) a été réalisée et suivie par un test post-hoc (LSD Fisher). Si les conditions pour ANOVA ne sont pas toutes remplies, le test non-paramétrique Kruskal-Wallis est suivi par le test Mann-Whitney ou le test de Dunn avec la correction de Bonferroni. Pour toutes les analyses statistiques, le niveau significatif (α) a été mis à 0,05 et les calculs sont réalisés en utilisant le logiciel Statistica 8.0 (Stat soft, Inc.). Un résumé des méthodes utilisées est présenté en Annexe.

3.1.2 Apport de la régulation de l'activité de cavitation inertielle pour la sonoporation de cellules adhérentes

Une des différences du système de sonoporation pour cellules adhérentes par rapport à ceux décrits dans la littérature (Kim *et al.*, 1996; Miller et Quddus, 2001; Ohl et Wolfrum, 2003; Lu et Zhong, 2005; Kinoshita et Hynynen, 2007; Forbes *et al.*, 2008) est la régulation du niveau de cavitation inertielle en temps réel. En effet, des études ont montré que la sonoporation ou la transfection étaient corrélées au niveau du bruit large bande généré par les bulles implorantes en cavitation inertielle. Cette étude compare donc les effets biologiques (détachement, mortalité et sonoporation) en cavitation inertielle régulée et en intensité acoustique fixée. Pour cela les paramètres de CI 26, 28, 30 et 32 (correspondant à 0,44, 0,63, 0,82 et 1,02 μM de HTA pour un rapport cyclique de 0.2 durant 5 minutes) et les intensités acoustique I_a 1,63, 2,82, 4,32 et 6,07 W/cm^2 (correspondant en moyenne à 0, 0,35, 0,65 et 1,11 μM de HTA) ont été choisis. L'effet de la durée totale d'insonification est également étudiée pour des temps de 1, 5 et 10 minutes (correspondant à des insonifications effectives de 12, 60 et 120 secondes). Les

résultats sont présentés sur la figure 3.4.

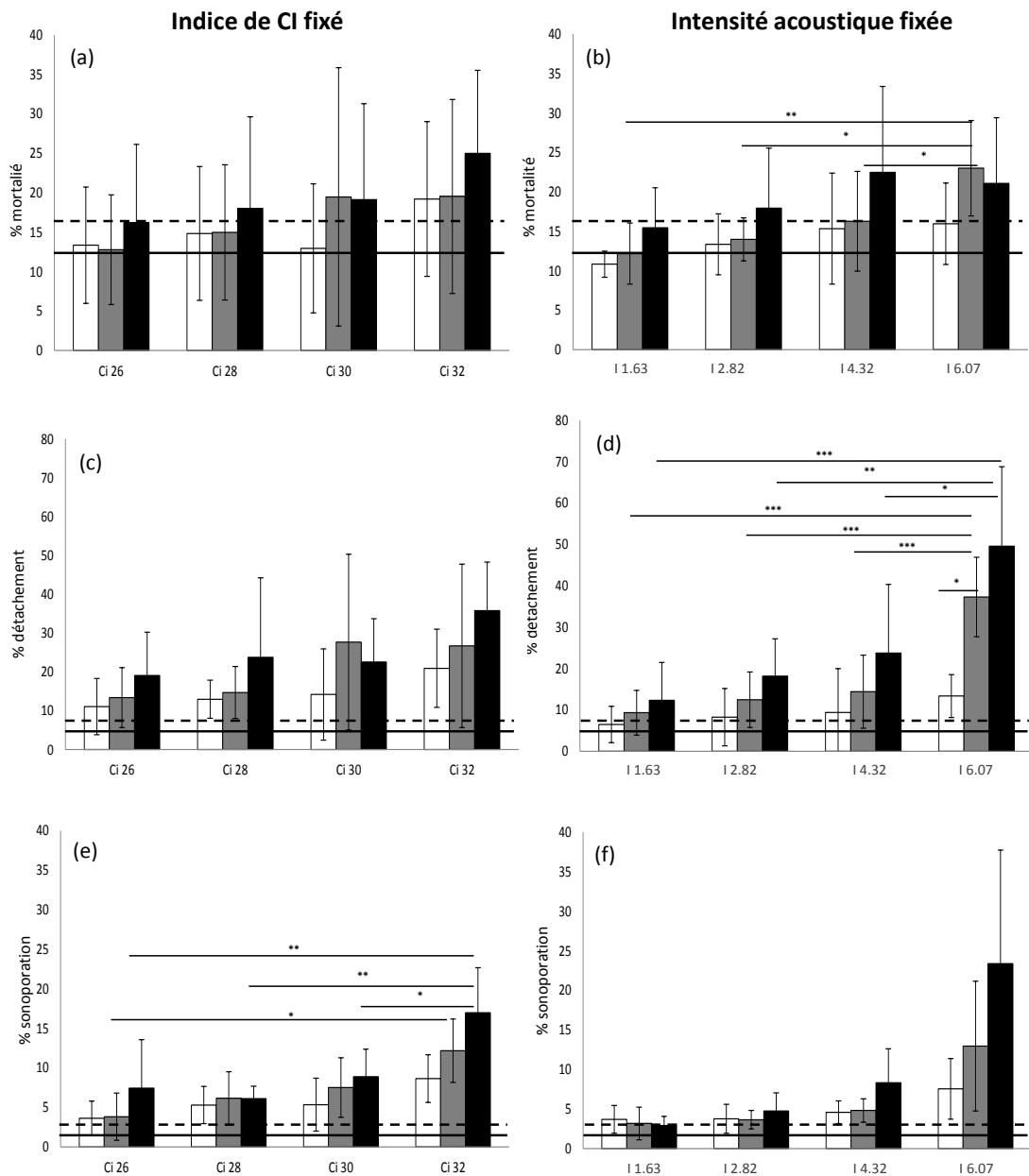


FIGURE 3.4 – Mortalité (a et b), détachement (c et d) et sonoporation (e et f) pour des excitations en niveau de cavitation inertielle fixé (a, c, e) et en intensité acoustique fixée (b, d, f) pour différents temps d'excitation (1 en blanc, 5 en gris et 10 minutes en noir). Ligne noire : valeur moyenne du témoin ; ligne pointillée noire : valeur maximale de l'écart-type du témoin. Moyenne \pm écart-type ($n=5$). * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, voir Analyses statistiques.

La mortalité Les résultats de mortalité pour la cavitation inertielle régulée et pour les intensités acoustiques sont présentés sur les figures 3.4a et b. Les mortalités des témoins sont 13% et 16%

en valeurs moyenne et écart-type maximum respectivement. Dans la configuration cavitation régulée (figure 3.4a), il n'y a pas d'effet du temps d'exposition sur la mortalité pour un CI donné et pas d'effet sur le niveau de cavitation inertielle CI pour une durée d'excitation totale donnée. Pour la configuration "intensité acoustique fixe" (figure 3.4b), il n'y a pas d'effets de la durée d'excitation ou de l'intensité acoustique, sauf pour une durée d'excitation de 5 minutes. En effet, pour une excitation de 5 minutes, l'intensité acoustique $6,07 \text{ W/cm}^2$ induit une augmentation significative de la mortalité comparé aux autres intensités acoustiques $1,63$ ($p=0,003$), $2,82$ ($p=0,011$) et $4,32 \text{ W/cm}^2$ ($p=0,048$). Concernant la mortalité, la cytotoxicité des ultrasons est en moyenne du même ordre que celui des cellules témoins, montrant que le système de sonoporation ne semble pas induire de dommages importants aux cellules (Figure 3.4a et b). Pour les cellules en suspension, la viabilité des cellules décroît de façon monotone avec l'augmentation de l'amplitude de pression négative (Qiu *et al.*, 2012; Sundaram *et al.*, 2003; Okada *et al.*, 2005), l'augmentation de la dose de cavitation (Qiu *et al.*, 2010) ou le nombre d'évènements de cavitation (Sundaram *et al.*, 2003). Dans le cas des cellules en suspension, les cellules se déplacent dans le milieu et sont donc facilement en contact avec les bulles de cavitation acoustique, alors que dans le cas des cellules adhérentes, celles-ci sont fixées au fond.

Le détachement Concernant le détachement (figure 3.4c et d), les valeurs des témoins sont $5,7\%$ et $8,1\%$ en valeurs moyenne et écart-type maximum respectivement. Le niveau de cavitation inertielle n'induit pas de différences significatives (même si en moyenne le détachement pour les CI 26, 28 et 32 augmente avec la durée d'excitation) (figure 3.4-c). Dans la configuration "intensité acoustique fixée" (figure 3.4d), il y a des effets significatifs de l'intensité acoustique et du temps d'excitation. En effet, le détachement pour un temps d'excitation de 5 minutes montre des différences statistiques avec l'intensité acoustique ($6,07 \text{ W/cm}^2$ vs $1,63$ ($p=0,00003$), $2,82$ ($p=0,0001$), $4,32 \text{ W/cm}^2$ ($p=0,0003$)) ainsi que pour un temps d'excitation de 10 minutes ($6,07 \text{ W/cm}^2$ vs $1,63$ ($p=0,0008$), $2,82$ ($p=0,003$), $4,32 \text{ W/cm}^2$ ($p=0,011$)). De plus, pour la même intensité acoustique ($6,07 \text{ W/cm}^2$) il y a un effet de la durée d'excitation avec une augmentation significative du détachement après 5 et 10 minutes par rapport à 1 minute (1 vs. 5 min, $p=0,018$ et 1 vs. 10 min, $p=0,0007$). L'insonification induit clairement du détachement (Figure 3.4c et d), et des différences statistiques sont obtenues pour la condition I_a $6,07 \text{ W/cm}^2$ par rapport aux intensités acoustiques plus faibles.

Le lien entre le détachement des cellules et l'intensité acoustique appliquée pourrait être relié à des pics d'activités des indices de cavitation inertielle instantanés, présents dans le milieu à I_a $6,07 \text{ W/cm}^2$ (et qui sont moins importants à CI consigne 32). Ces pics d'activité de cavitation inertielle pourraient induire des déchirures locales du tapis de cellules et l'importante pression acoustique constante pourrait générer du streaming acoustique et des pressions de radiation qui aident probablement à détacher les morceaux de tapis déchirés. Dans le cas d'une excitation acoustique régulée, l'intensité acoustique appliquée aux transducteurs est continuellement modulée en temps réel pour assurer l'indice de cavitation inertielle consigne, et donc les pics de cavitation inertielle sont limités. De plus, cette modulation de l'intensité acoustique génère des fluctuations du streaming et de la pression de radiation qui pourrait expliquer l'apparente variabilité plus importante des résultats car chaque tir possède une fluctuation de l'intensité acoustique appliquée unique. Par exemple, l'intervalle d'intensité acoustique

appliquée durant l'insonification en excitation régulée (I_a entre [3-6.5] W/cm² pour CI 32, (Figure 2.14)) inclut presque toutes les intensités acoustiques fixées étudiées.

La sonoporation Les valeurs moyenne et écart-type maximum de sonoporation des témoins (figure 3.4e et f), correspondant à de l'endocytose, sont 1,7 et 3%, respectivement. En configuration cavitation régulée (figure 3.4e), la sonoporation augmente significativement pour une durée d'excitation de 5 minutes entre les niveaux de cavitation inertielle 26 et 32 ($p=0,011$). Pour une durée d'excitation de 10 minutes, les résultats pour le niveau de cavitation inertielle CI 32 sont statistiquement différents des autres CI (CI 32 vs. 26 ($p=0,005$), 28 ($p=0,0017$), 30 ($p=0,013$)). Même si les mêmes comportements sont observés en moyenne pour la configuration "intensité acoustique fixée" (figure 3.4f), il n'y a pas de différences significatives sur l'augmentation de la sonoporation pour une intensité acoustique ou un temps d'excitation donnés. Concernant la sonoporation, comme observé sur la Figure 3.4, le pourcentage de sonoporation moyenne montre une tendance à augmenter avec l'intensité acoustique et l'indice de cavitation inertielle. Cependant, et surtout dans le cas intensité acoustique fixée, les résultats de sonoporation montrent une grande variabilité. Par exemple, pour une intensité acoustique de 6,07 W/cm² pendant 10 minutes d'insonification, le coefficient de variabilité des CI moyens obtenus est de 61% comparé à 34% pour le CI consigne 32. De plus les analyses statistiques confirment le lien entre le pourcentage de sonoporation et l'indice de cavitation inertielle. Ce résultat est en accord avec (Sundaram *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2008) qui observent une corrélation entre l'énergie du bruit large bande et la sonoporation. Cette forte variabilité des résultats de sonoporation en intensité acoustique fixée pourrait être due à l'importante gamme de CI moyens obtenus pour une intensité acoustique donnée ($CI \in [27,35]$ pour I_a 6,07 W/cm², Figure 2.14), gamme qui inclut presque toute la gamme de CI consigne testés en configuration "CI consigne fixé", et donc à fortiori la condition CI 32 seule.

La durée d'insonification En ce qui concerne l'influence du temps d'insonification sur les résultats de sonoporation, les taux de sonoporation sont en moyenne plus importants pour une durée d'insonification plus longue. Cette absence de différences significatives des taux de sonoporation en fonction du temps d'exposition pourrait être due à la variabilité inhérente à la régulation de la cavitation acoustique dans le volume pour des effets biologiques surfaciques. De plus, si on part de l'hypothèse d'une cavitation acoustique dépendant spatialement du champ acoustique d'ondes stationnaires, alors le taux de sonoporation atteindra une valeur limite même en augmentant le temps d'exposition (contrairement aux expériences sur les cellules en suspension qui se passent dans le volume).

L'utilisation de la régulation de l'activité de cavitation inertielle a montré de bons résultats en terme de reproductibilité de la sonoporation pour des cellules en suspension (Reslan *et al.*, 2010; Lo *et al.*, 2014). Dans notre configuration les cellules adhérentes ne se trouvent qu'au fond du puits et la régulation de l'activité de cavitation inertielle s'applique sur tout le milieu. Cependant, même dans cette configuration moins idéale, l'utilisation de la régulation permet d'augmenter la reproductibilité des résultats de sonoporation.

3.1.3 Études paramétriques sur la sonoporation

Pour chaque jour d'expériences, des témoins sont soumis aux mêmes conditions (traitement biologique, temps passé en dehors de l'incubateur) que les cellules insonifiées. Les conditions ultrasonores sont des excitations pulsées (durée des pulses 50 ms, rapport cyclique 0,2) à 426,5 Hz pour un CI consigne 30 ou 32 pendant 1 ou 5 minutes à 24 °C. Les différents paramètres étudiés sont :

- la configuration biologique cellules adhérentes ou resuspendues (par ajout de trypsine) avant le tir,
- l'influence de la température : ambiante (24 °C) ou physiologique (37 °C), en plaçant le système d'insonification ou non dans un incubateur,
- des paramètres de l'excitation acoustique : la durée des pulses et des excitations fragmentées (pauses de 10 ou 30 secondes toutes les minutes d'excitation),

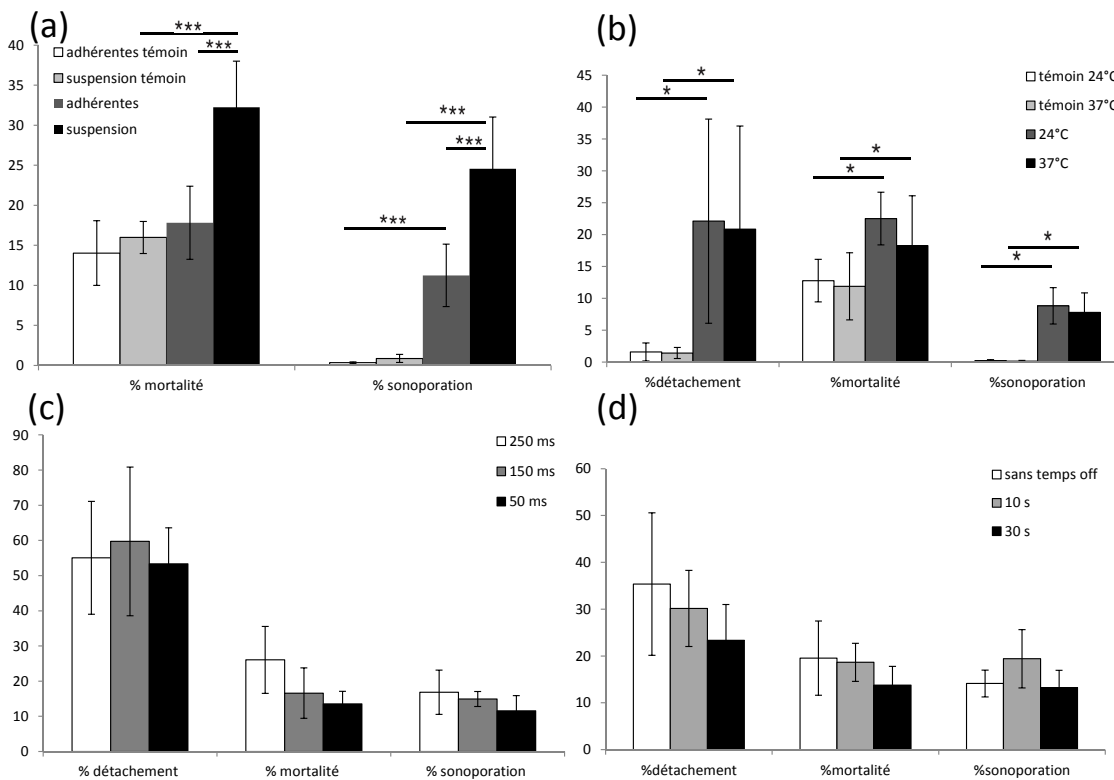


FIGURE 3.5 – Résultats des études paramétriques : a/ mortalité et sonoporation des cellules en configuration adhérentes ou suspension pour une excitation pulsée CI 32 pendant 60 secondes et leurs témoins. b/ c/ et d/ présentent le détachement, mortalité et sonoporation des cellules adhérentes et détachées pour des cellules à température ambiante ou à 37°C pour une excitation pulsée CI 30 pendant 300 secondes, différents temps des pulses d'excitation (cycles d'excitations correspondant à 250, 150 et 50 ms) pour une excitation pulsée CI 32 pendant 300 secondes ou pour des tirs fragmentés (5 minutes, 5 minutes avec des pauses de 10 secondes toutes les minutes et ou des pauses de 30 secondes toutes les minutes) pour une excitation pulsée CI 32 pendant 300 secondes. Moyenne ± écart-type (n=4-5). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Paramètre configuration adhérentes vs suspension Dans un premier temps, l'influence de la configuration biologique est testée en comparant les cellules adhérentes et resuspendues. En effet, la plupart des expériences de sonoporation sont réalisées sur des cellules adhérentes qui sont resuspendues pour l'insonification. Dans la plupart des dispositifs, le transducteur est placé dans une cuve remplie d'eau et l'échantillon de cellules est contenu dans un tube dans l'eau (Mehier-Humbert *et al.*, 2005b; Qiu *et al.*, 2010) ou dans un puits à la surface (Kinoshita et Hynynen, 2007; Reslan *et al.*, 2010; Zhong *et al.*, 2011). Il est donc plus simple que les cellules soient en suspension pour augmenter le volume contenant les cellules ou tout simplement augmenter les chances d'interactions bulles-cellules.

L'étude a été réalisée avec des tirs ultrasonores en excitation pulsée pour un CI 32 pendant 1 minute. Les résultats sont présentés sur la figure 3.5a. La mortalité des cellules témoins (en suspension ou adhérentes) n'est pas différente ($p=0,605$) et est autour de 15%. Pour les cellules en suspension, la mortalité augmente par rapport au témoin en suspension ($p<0,001$) et atteint 30%. Il y a une différence significative sur la mortalité pour les cellules insonifiées en suspension ou adhérentes ($p<0,0001$).

Quelques études ont comparé les résultats de sonoporation pour un même type de cellules en configuration adhérentes et resuspendues (Kim *et al.*, 1996; Kinoshita et Hynynen, 2007). Les résultats sont variables : Kinoshita et Hynynen (2007) ont observé plus de sonoporation pour les cellules adhérentes qu'en suspension et Kim *et al.* (1996) n'ont pas vu de différences. Lu et Zhong (2005) se sont quant à eux intéressés à la sonoporation de cellules restées adhérentes lors d'une excitation acoustique et de celles qui se sont détachées. Dans ce cas, des taux de sonoporation plus importants sont obtenus pour les cellules détachées.

En l'absence de stimulation ultrasonore, l'endocytose³ pour les cellules adhérentes et en suspension témoins est inférieure à 1%. Les taux de sonoporation pour les cellules insonifiées sont d'environ 12% pour les cellules adhérentes et 21% pour les cellules en suspension. Ces taux sont statistiquement supérieurs à ceux de l'endocytose des témoins respectivement adhérent et en suspension ($p<0,001$). La sonoporation des cellules en suspension est deux fois plus élevée que celle des cellules adhérentes ($p<0,001$). La cavitation inertielle ou l'implosion des bulles de cavitation à proximité de cellules va induire de la mortalité cellulaire. De plus, dans la configuration où les cellules sont resuspendues, la probabilité de rencontre bulle-cellule est bien plus importante que dans la configuration des cellules adhérentes, ce qui explique le taux de mortalité plus important dans la configuration resuspendue. De même, la sonoporation est significativement plus importante pour les cellules resuspendues. Comme pour la mortalité, cette différence peut s'expliquer par une plus grande probabilité de rencontre bulle-cellules ainsi que par la plus grande surface de contact des cellules dans la configuration resuspendue. De plus les cellules n'ont pas les mêmes propriétés mécaniques car elles se comportent plutôt comme un "fluide" lorsqu'elles sont en suspension et plutôt comme un "solide" lorsqu'elles sont en monocouches adhérentes (Laurent *et al.*, 2000) et donc n'offrent pas forcément dans ces deux configurations la même résistance à la sonoporation.

3. Mécanisme de pénétration de molécules dans les cellules sans intervention extérieure.

Paramètre température : température ambiante vs température physiologique

L'utilisation de modèle cellulaire, dont la température de croissance de cellule est 37°C, impose d'étudier l'effet de la température sur la sonoporation. L'influence de la température physiologique (37°C) par rapport à la température ambiante (24°C) a été testée pour une condition ultrasonore pulsée à CI 30 pendant 5 minutes.

Les résultats sont présentés sur la figure 3.5b. Les cellules insonifiées à 24°C montrent des différences significatives avec le témoin pour le détachement ($p=0,021$), la mortalité ($p=0,012$) et la sonoporation ($p=0,012$) des cellules adhérentes et en suspension. De même, les cellules insonifiées à 37°C montrent des différences significatives avec le témoin pour le détachement ($p=0,012$), la mortalité ($p=0,036$) et la sonoporation ($p=0,012$) des cellules adhérentes et en suspension. Cependant, aucun effet température n'est observé sur les paramètres biologiques pour les cellules insonifiées à 24 ou 37°C. Une augmentation de la sonoporation serait attendue en intensité fixe pour deux raisons : la création de la cavitation et sa dynamique est facilitée à plus haute température (Brennen, 2005) et la membrane serait éventuellement plus perméable aux molécules.

D'un point de vue acoustique, aucun effet de la température n'est attendu sur les résultats de sonoporation car cette dernière est corrélée à l'activité de cavitation inertielle (Sundaram *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2008). Cependant, d'un point de vue biologique, les résultats obtenus sont plus surprenant. En effet, la sonoporation (ou la transfection dans certain cas) à température ambiante est en générale considérée comme négligeable par rapport aux résultats à 37°C et ceci pour les cellules adhérentes (Kim *et al.*, 1996) et en suspension (Liu *et al.*, 2012).

Paramètres acoustiques

Les résultats précédents ont montré que les taux de détachement et de mortalité sont non négligeables. L'effet de la durée des pulses d'excitation est étudié pour trouver le meilleur compromis en termes de sonoporation, détachement et mortalité cellulaire. De plus, dans le but d'essayer de limiter le détachement cellulaire, des excitations fragmentées (excitations de 5 minutes avec des pauses toutes les minutes) sont effectuées afin de laisser au tapis de cellule un temps de relaxation suffisant tout en étant assez court pour conserver des bulles de cavitation dans le milieu afin que la cavitation acoustique se ré-initie facilement.

Durée des pulses d'excitation Afin de générer le niveau de cavitation inertielle souhaité (ici CI 32), il est nécessaire que les pulses soient suffisamment longs pour générer le CI souhaité ou alors utiliser des intensités acoustiques suffisamment élevées. Il a été montré au chapitre 2, sur la Figure 2.13a, que pour une durée de cycle de 250 ms avec un rapport cyclique de 0,1 (soit des pulses de 25 ms) le CI maximum obtenu est environ de 30. La durée de pulse minimale choisie est donc celle qui permet d'atteindre CI 32 dans le milieu cellulaire avec un rapport cyclique de 0,2. Dans cette configuration, les pulses sont certes plus courts mais les salves de pulses sont plus proches les unes de autres que si l'on diminue le rapport cyclique tout en conservant la même période d'excitation. Ainsi pour un rapport cyclique de 0,2, une durée de cycle minimum de 50 ms a été déterminée (soit des pulses de 10 ms) pour obtenir un CI 32. Afin d'étudier l'effet de la durée des pulses sur les paramètres biologiques, des

tirs ultrasonores pulsés de CI 32 pendant 5 minutes ont été réalisés pour trois durées de pulses : 50 ms (valeur utilisée pour les autres expériences), 30 ms et 10 ms. Le rapport cyclique étant de 0,2, les durées de chaque cycle sont respectivement 250, 150 et 50 ms. Les résultats sont présentés sur la figure 3.5c. Pour ces durées de pulses d'excitation, même si en moyenne la mortalité et la sonoporation augmentent quand la durée des pulses augmente, il n'y a pas de différences significatives sur le détachement, la mortalité et la sonoporation entre ces durées de pulses.

Pan *et al.* (2005) ont quant à eux fait varier le rapport cyclique (durée des pulses d'excitation mais aussi de la durée effective totale) et observé qu'en augmentant le rapport cyclique, la mortalité et la sonoporation augmentent. L'absence de différence dans notre cas pourrait être due au fait que contrairement à (Pan *et al.*, 2005), le temps de tirs cumulé est le même pour les trois conditions (soit 60 secondes).

Insonification fragmentée Afin de vérifier s'il était possible de limiter le détachement des cellules tout en ne limitant pas la sonoporation, des excitation ultrasonores fragmentées ont été réalisées avec des pauses au cours du tir. Les paramètres testés sont un tir de CI 32 pendant 5 minutes, pendant 5 min mais avec une pause de 10 s toutes les minutes ou avec une pause de 30 s toutes les minutes. Les résultats sont présentés sur la figure 3.5d. Bien qu'il n'y ait pas de différences significatives, une tendance sur le détachement et la mortalité sont observées. Le détachement diminue en moyenne lorsque la durée des pauses augmentent. Cette tendance sur la mortalité est peut être liée simplement au détachement car si les cellules détachées ne sont pas nécessairement mortes, leur taux de mortalité est en général bien plus élevé que pour les cellules adhérentes.

Conclusion

Au vu des résultats de ces expériences, les paramètres suivants seront utilisés pour la suite des expérimentations :

- une excitation acoustique en cavitation inertielle régulée,
- une configuration de cellules adhérentes,
- une température ambiante (et non physiologique),
- une durée de cycle de 250 ms et une excitation non fragmentée.

3.1.4 Étude des mécanismes potentiels

Effet spatial

Le champ acoustique dans le puits est un champ d'onde quasi-stationnaire (mode (4, 8, 1), voir chapitre 2) et donc en suivant la théorie des forces de Bjerknes (Eller, 1968; Crum, 1975), il existe des positions d'équilibre stable des bulles au fond du puits (Figure 2.17) : les bulles de rayon en dessous du rayon résonant sont attirées vers les ventres et les bulles plus grosses sont attirées vers les nœuds de pression acoustique. Les effets biologiques étant liés à la cavitation inertielle et aux interactions bulles-cellules pour les bulles proches des cellules, une grande partie des cellules au fond du puits peut n'être que très peu impactée par les bulles de cavitation. Pour augmenter ces interactions et vérifier

si ce sont bien ces bulles au fond du puits qui seraient responsables de la sonoporation, un balayage en fréquence sur 3 modes acoustiques différents durant l'excitation acoustique est réalisé. En effet, en changeant de mode acoustique, les maxima et minima de pressions acoustique sont déplacés et donc les positions d'équilibre stables des bulles de cavitation. L'expérience réalisée consiste en une excitation acoustique de 5 minutes pour un niveau de cavitation inertielle CI 32 pour 3 différentes fréquences 386,5, 430,5 et 426,5 kHz correspondant respectivement aux modes (6,6,1), (8,7,1) et (4,8,1) ainsi qu'un balayage en fréquence consistant à insonifier successivement à ces 3 fréquences pendant 100 secondes chacune pour avoir une durée totale d'excitation identique aux autres conditions. Les résultats sont présentés sur la figure 3.6. Le détachement et la mortalité sont similaires lorsqu'une seule fréquence ou le balayage est appliqué. L'utilisation du balayage en fréquence permet d'augmenter la sonoporation à 26% par rapport à une seule fréquence (balayage en fréquence vs. 386,5 kHz $p=0,0026$, vs. 430,5 $p=0,0027$, vs. 426,5 $p=0,0027$). Il y a donc bien une dépendance spatiale de la sonoporation.

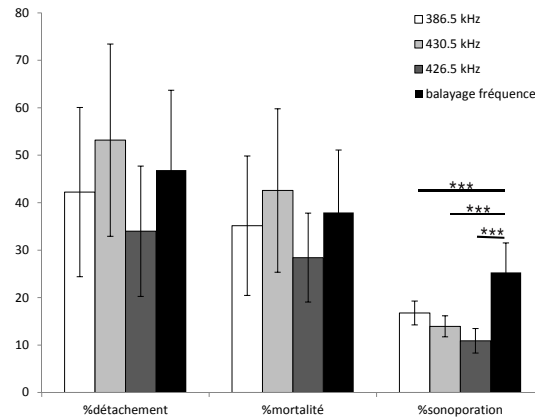


FIGURE 3.6 – Détachement, mortalité et sonoporation des cellules adhérentes pour différentes fréquences (386,5 kHz pendant 300 s, 430,5 kHz pendant 300 s, 426,5 kHz pendant 300 s et un balayage en fréquence (386,5 kHz pendant 100 s puis 430,5 kHz pendant 100 s et finalement 426,5 kHz pendant 100 s). Ces conditions correspondent à 6 (386,5 kHz), 7 (430,5 kHz) et 8 (426,5 kHz) longueurs d'ondes dans le puits le long de la direction y . Moyenne \pm écart-type ($n=6$). * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

Stimulation de l'endocytose

Afin de vérifier si la cavitation inertielle n'implique pas d'internalisation de molécules dans les cellules en sonoporant seulement mais également en stimulant l'endocytose, une expérience avec analyse des résultats juste après l'expérience et 18 h après a été réalisée. Pour cela, les cellules ont été insonifiées à la condition CI 32 pendant 5 minutes et les résultats d'internalisation du dextran ont été comparés avec des témoins (4 réplicats). Après tir, les cellules sont traitées et pour une partie le pourcentage d'internalisation est mesuré au cytomètre (FACS LSRII) alors qu'une autre partie est remise en culture pour une mesure au cytomètre 18 h plus tard. Les résultats d'internalisation du dextran sont présentés sur la Figure 3.7. La sonoporation ne semble pas être liée, ici, à une stimulation de l'endocytose, car pour la mesure à 18 h, les puits témoins comme les insonifiés montrent une

augmentation de l'endocytose du même ordre (soit de 3 à 5%). Un effet de stimulation de l'endocytose par la cavitation acoustique avait été observé par Lo *et al.* (2014) pour des mesures d'expression de la luciférase à 30 min et 24 h. Lee *et al.* (2014) met en avant l'implication des ultrasons dans l'augmentation d'une des phases de l'endocytose en augmentant les taux de calcium intracellulaire.

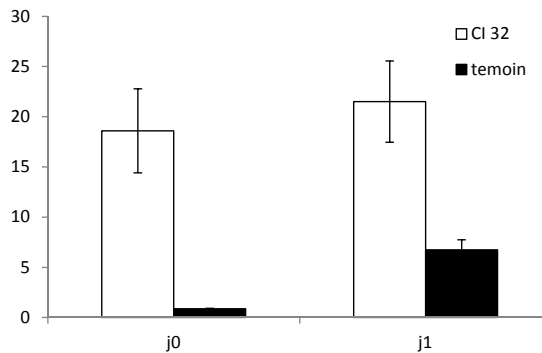


FIGURE 3.7 – Pourcentage de cellules contenant la molécule AlexaFluor 488 (sonoporation et/ou endocytose) pour des cellules insonifiées à j0 (CI 32 pendant 5 minutes) et des témoins. Les mesures ont été effectuées juste après tirs (J0) et 18h plus tard (J1).

3.2 Effet des ultrasons et de la cavitation acoustique sur les cellules à moyen terme

Les effets biologiques associés à l'insonification ou à la sonoporation sont variés et vont des modifications de la morphologie des cellules (plus petites, de surface plus lisse ou au contraire plus irrégulière, avec des pores) (Postema *et al.*, 2004; Ross *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2012), de la structure des cellules (Postema *et al.*, 2004), des modifications de la fonction de l'ADN (Postema *et al.*, 2004) à des effets d'anti-prolifération (Zhong *et al.*, 2011) ou même de lyse des cellules (rupture de la membrane entraînant la mortalité cellulaire) (Postema *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 1996).

Dans cette partie, l'effet des ultrasons et de la cavitation acoustique sur la reprise de croissance des cellules est étudiée pour trois paramètres acoustiques. Puis, le comportement des cellules insonifiées sonoporées et non sonoporées est comparé avec des cellules contrôles.

3.2.1 Méthode d'évaluation de la reprise de croissance cellulaire

Dans les études des effets des ultrasons sur les cellules, le paramètre biologique mesuré est la reprise de croissance des cellules après insonification à j0. Pour cela, deux expériences sont réalisées. La première consiste à suivre la croissance des cellules exposées à 3 sortes d'ultrasons : des lipus, de la cavitation stable et de la cavitation inertielle. L'intérêt de ces différents ultrasons est que si un effet est observé en cavitation inertielle, il sera possible de discriminer le mécanisme responsable de cet effet. En effet, lorsque de la cavitation inertielle est générée, il y a également des ultrasons seuls (lipus) et de la cavitation stable. La reprise de croissance cellulaire est évaluée avec l'appareil Xcelligence.

Une deuxième étude porte sur la reprise de croissance des cellules insonifiées sonoporées ou non. Pour cela, les cellules adhérentes à la fin sont séparées en fonction de leur état (sonoporées ou non). Ceci est réalisé en utilisant un cytomètre trieur de cellule. Les cellules sont alorsensemencées à l'Xcelligence pour la mesure de reprise de croissance.

Le détails des statistiques des mesures de reprises de croissances est donné en Annexe.

Le cytomètre trieur de cellules

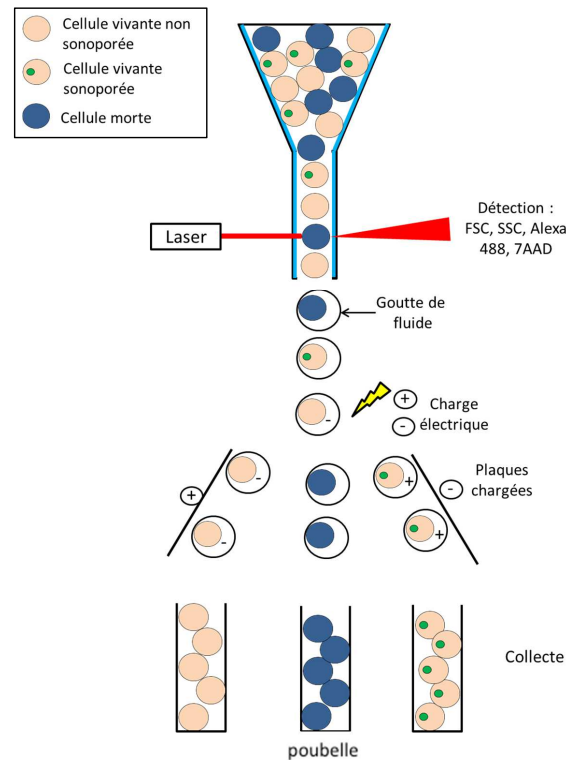


FIGURE 3.8 – Schéma du fonctionnement du FACS trieur de cellules dans le cas où les cellules à trier sont les cellules vivantes sonoporées ou non : les cellules passent d'abord devant le détecteur comme dans le cas du cytomètre de flux classique et les gouttes de fluide contenant les cellules sélectionnées sont chargées électriquement de manière positive ou négative suivant les critères définis avant de passer devant des plaques chargées qui vont orienter les cellules chargées dans les puits de récolte correspondants. Les gouttes de fluide non chargées vont à la poubelle : il s'agit dans ce cas des cellules mortes.

Le cytomètre trieur de cellules est un cytomètre de flux traditionnel, qui en plus de déterminer l'internalisation de molécules fluorescentes, va trier les cellules dans des tubes de récolte séparés suivant les conditions. Ceci permet de remettre en culture séparément les cellules sonoporées ou non par exemple. Lors du passage d'un échantillon, les cellules défilent les unes après les autres dans des gouttes de fluide entraînées par le flux du cytomètre avant de passer devant un détecteur (Figure 3.8) pour mesurer les paramètres FSC (taille des cellules), SSC (granulosité) et l'émission de fluorescence comme pour le cytomètre de flux classique (Figure 3.1). Les gouttes de fluide contenant les cellules recherchées (sonoporée vivantes : marquée à l'AlexaFluor 488 mais pas au 7-AAD, et non sonoporées

vivantes : non marquées à l'AlexaFluor 488 ni au 7-AAD) par exemple sont alors chargées positivement et négativement respectivement avant de passer devant des plaques chargées qui vont orienter les cellules chargées vers les tubes de récoltes. Les gouttes de fluide contenant les cellules non recherchées (mortes marquée au 7-AAD par exemple) ne sont pas chargées et les cellules vont dans un tube poubelle.

L'Xcelligence

L'Xcelligence (ACEA /Roche, CA, USA/ Suisse) est un appareil qui permet de mesurer par impédancemétrie l'évolution du tapis cellulaire en temps réel. L'impédance mesurée, le cell index, est liée au nombre de cellules, à leur adhérence et à leur morphologie. Néanmoins, d'après les données du fabricant, le cell index évolue linéairement avec le nombre de cellules en fonction du temps. Les cellules sontensemencées dans une plaque de culture spécifique (ici e-plate de 16 puits, de surface $0,32 \text{ cm}^2$) dans l'Xcelligence placé lui-même dans un incubateur. Le fond des puits de culture est tapissé d'électrodes (Figure 3.9a). Avant de mettre les cellules, du milieu cellulaire est ajouté et l'impédance électrique Z mesurée correspond alors au bruit de fond Z_0 (Figure 3.9b). Lorsque les cellules commencent à adhérer au fond du puits et donc sur les électrodes, l'impédance électrique mesurée correspond à $Z_{cellules}$ (Figure 3.9c).

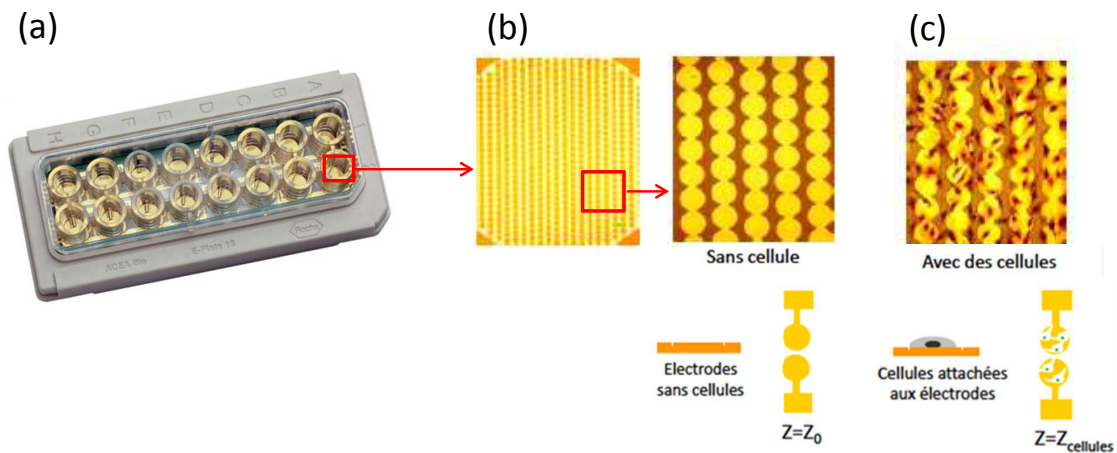


FIGURE 3.9 – Principe de l'Xcelligence : a/ e-plate : plaque 16 puits utilisée pour mettre les échantillons dans l'Xcelligence, b/ zoom sur un puits de l'e-plate puis sur une petite zone où on voit les électrodes : avant de mettre les échantillons une mesure de bruit de fond sans cellules est réalisée pour déterminer Z_0 et c/ le même zoom en présence de cellules : cette fois le cell index mesuré est lié aux cellules qui adhèrent sur les électrodes.

Le cell index ne correspondant pas seulement au nombre de cellules, mais également à leur morphologie et à l'adhérence, il est nécessaires de discriminer ces paramètres les uns par rapport aux autres. Pour cela, en parallèle des mesures à l'Xcelligence, des cellules sont remises en culture dans des plaques 96 puits (de la même dimension que les puits de l'e-plate). Ces puits permettent de quantifier l'aire des cellules par analyse de photos de microscopie (objectif x10) (DMI3000, Leica, Allemagne) et le nombre de cellules soit en utilisant le cellomètre Auto T4 (Nexcelom Bioscience, MA, USA) ou bien en passant les cellules au cytomètre (FACS LSRII, Becton Dickinson, CA, USA). Cette

deuxième méthode permet de compter des cellules pour des concentrations inférieures à celles valables pour le cellomètre qui a une gamme de mesure fiable entre 10^5 et 10^7 cellules/mL.

3.2.2 Reprise de croissance des cellules après exposition à différentes stimulations ultrasonores

Dans ce travail, l'effet des ultrasons et de la cavitation acoustique est étudié sur la reprise de croissance des cellules après insonification. Afin de discriminer les effets liés aux ultrasons, de ceux dus à la cavitation acoustique, trois paramètres acoustiques sont utilisés : une excitation acoustique sans cavitation, avec de la cavitation stable et avec de la cavitation inertielle.

Définition des paramètres acoustiques

Le paramètre de cavitation inertielle choisi est l'un de ceux utilisés dans les expériences de sonoporation (CI 32 pendant 300 secondes à 426,5 kHz). Le paramètre de cavitation stable choisi est l'intensité acoustique $I_a=0,35$ W/cm². Cette intensité est trop faible pour qu'il y ait déclenchement de la cavitation inertielle dans notre configuration mais suffisante pour observer sur les spectres durant les tirs la fréquence subharmonique. Pour le paramètre ultrasons sans cavitation, l'intensité acoustique $I_a=0,06$ W/cm² est choisie. Cette intensité est suffisamment faible pour ne pas générer de cavitation stable. Afin de ne changer qu'un seul paramètre les tirs effectués durent 300 secondes à une fréquence de 426,5 kHz.

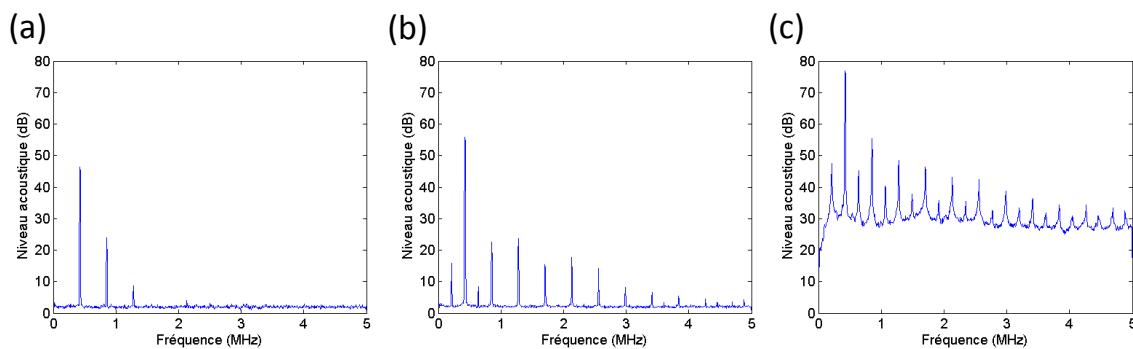


FIGURE 3.10 – Exemples de spectres obtenus pour les différents paramètres acoustiques : a/ pour la condition lipus (il n'y a pas de fréquence subharmonique et peu d'harmoniques), b/ pour la condition cavitation stable (présence d'harmoniques supérieures et de la fréquence subharmonique) et c/ pour la condition cavitation inertielle (apparition du bruit large bande).

Protocole

Les cellules sont insonifiées pour les différents paramètres acoustiques : lipus, cavitation stable et cavitation inertielle (4 réplicats par conditions), puis traitées avant passage au cytomètre de flux (Figure 3.3). Seules les cellules adhérentes sont conservées pour êtreensemencées. Elles sont alorsensemencées dans l'e-plate de l'Xcelligence (7500 cellules par puits) où des mesures du cell index sont relevées toutes les 10 minutes. En parallèle, d'autres sont remises en culture pour effectuer les

comptages et prendre des photos des cellules pendant leur reprise de croissance. Les cellules détachées pour chaque puits, quant à elles, sont passées au cytomètre de flux (FACS LSRII ; Becton Dickinson, CA, USA) afin d'obtenir le pourcentage de détachement pour chaque condition. A j1 et j4 à j8 les cellules sont photographiées au microscope (DMI3000, Leica, Allemagne) afin de pouvoir estimer la surface des cellules (1 photo/puits et 4 puits/conditions). Pour chaque photo, la surface de 10 cellules est mesurée. Les cellules photographiées sont ensuite passées au cytomètre de flux (FACS LSRII) afin d'estimer le nombre de cellules. Le protocole récapitulatif de l'expérience est présenté sur la Figure 3.11.

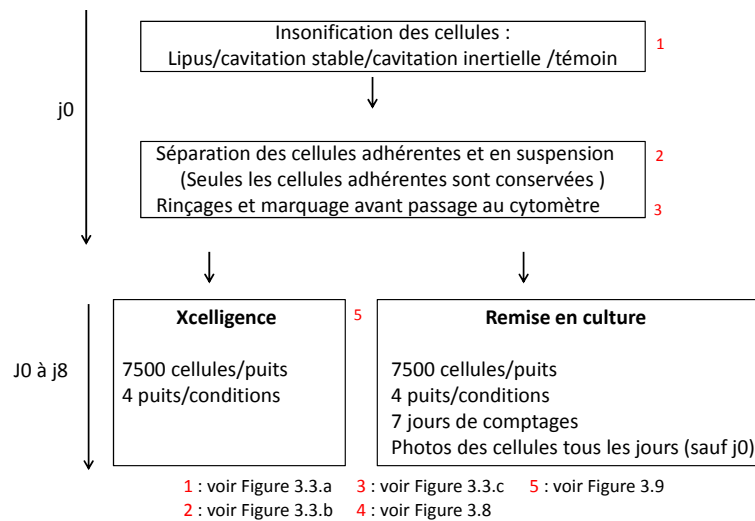


FIGURE 3.11 – Étapes de l'expérience sur l'effet de trois types d'ultrasons : lipus, cavitation stable et cavitation inertielle sur les cellules adhérentes.

Résultats

Les résultats en termes de détachement, mortalité et sonoporation obtenus après insonification sont présentés sur la Figure 3.12.

Il y a peu de détachement pour les cellules témoins ou insonifiées avec des lipus ou de la cavitation stable (<2%). De même, la mortalité pour ces 3 conditions est du même ordre et inférieure à 12%. Les cellules insonifiées avec de la cavitation inertielle montrent un pourcentage de détachement et de mortalité statistiquement supérieur aux autres conditions, respectivement 22 et 25%, ce qui est cohérent avec les valeurs obtenues dans les expériences précédentes (Figure 3.4). Pour les résultats de sonoporation, les témoins présentent une endocytose inférieure à 0,5% et les cellules sonoporées un pourcentage de sonoporation d'environ 18%, ce qui est en accord également avec les expériences précédentes (respectivement Figure 3.5b et Figure 3.4). Les paramètres de cavitation stable et lipus montrent peu de sonoporation également (<1,5%).

Les résultats obtenus avec l'Xcelligence sont présentés sur la Figure 3.13a. L'évolution temporelle du cell index commence par une phase d'accroche (les cellules mettent environ 20 h à venir adhérer au fond du puits), puis une phase de latence pendant laquelle les cellules ne se multiplient pas ou peu, une phase de croissance exponentielle et enfin un plateau (les cellules occupent tout l'espace ou bien

ont épuisé leur milieu). Le comportement des cellules témoin et avec cavitation inertielle est plutôt similaire et celui des cellules avec lipus et cavitation stable également.

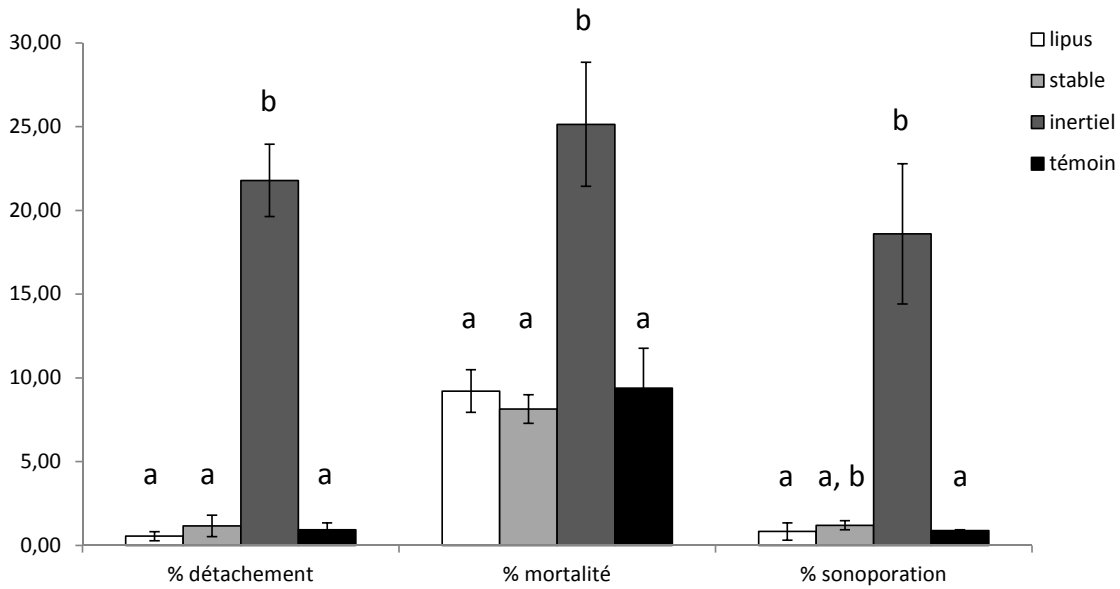


FIGURE 3.12 – Pourcentages de détachement, de mortalité et de sonoporation des cellules adhérentes obtenus après insonification à j0 pour les différents paramètres. Moyenne ± écart-type (n=4), les moyennes non différentes portent la même lettre.

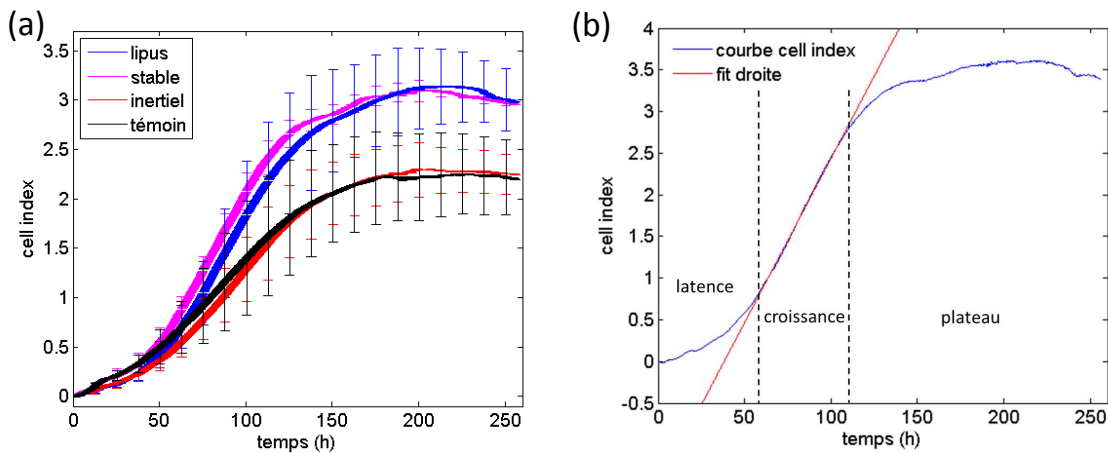


FIGURE 3.13 – a/ Évolution du cell index en fonction du temps pour les différentes conditions et b/ description des mesures des temps de latence et d’arrivée sur le plateau.

Des indicateurs de la croissance cellulaire sont le temps de latence et le temps d’arrivée sur le plateau. De plus, les cell index correspondants à la fin de la période de latence, au début de la phase plateau et le cell index maximal sont analysés. La période de croissance exponentielle correspond à une droite (sur la courbe) (Figure 3.13b) et les temps de latence et plateau correspondent aux temps où l’approximation par une droite de la courbe de cell index en fonction du temps n’est plus vrai. Les

paramètres ainsi extraits sont présentés sur la Figure 3.14.

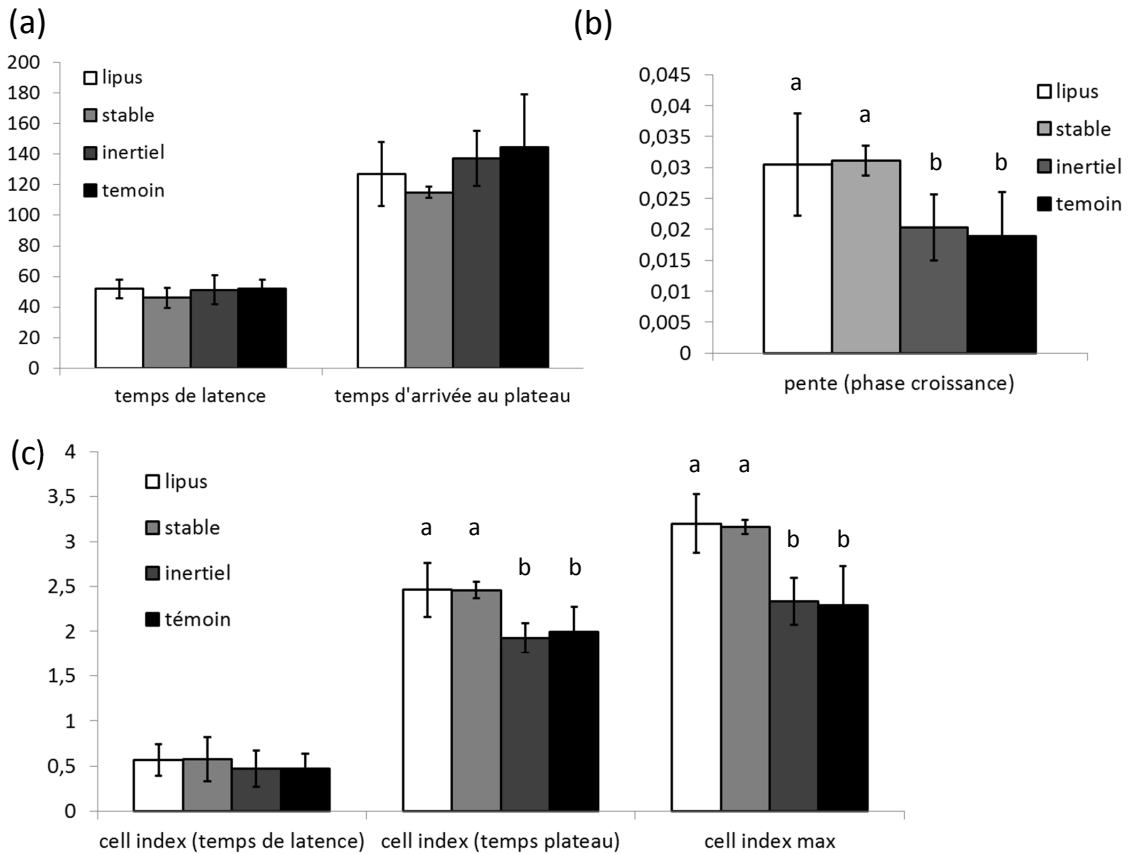


FIGURE 3.14 – Résultats des mesures des paramètres des courbes du cell index. a/les temps de latence et d’arrivée au plateau (en h), b/ les pentes lors de la période de croissance exponentielle et c/ les cells index correspondants aux temps de latence et d’arrivée sur le plateau ainsi que le cell index maximum obtenu. Moyenne \pm écart-type (n=4), les moyennes non différentes portent la même lettre.

Les évolutions temporelles du cell index des cellules exposées aux lipus ou à la cavitation stable sont plus importantes que celles des cellules témoins ou exposées à la cavitation inertielle (Figures 3.13a et 3.14c). Toutefois, ces différences de comportement ne sont pas liées aux temps de latence (Figure 3.14a), au cell index au début de la période de croissance (Figure 3.14c) ou aux temps d’arrivée au plateau (Figure 3.14a) pour ces différentes conditions. Cette différence de cell index entre conditions semble liée aux pentes de la période de croissance exponentielle (Figure 3.14b). La différence de pente indiquerait ici que les cellules insonifiées par des lipus ou de la cavitation stable auraient une croissance plus rapide. Afin de vérifier cette hypothèse, le nombre de cellules et leurs surfaces ont été déterminés pendant la phase de croissance exponentielle (j4 soit à 96h) et au plateau (j8 soit à 196h). Les résultats pour ces paramètres sont présentés sur les Figures 3.2.2a et b ainsi qu’un exemple de photos de cellules à j4 et j8 sur les Figures 3.2.2c et d. Il n’y a pas de différences dans la surface cellulaire pour les différentes conditions que ce soit à j4 ou à j8. Ceci pourrait être dû à la grande variabilité de surface des cellules sur une même photo, comme illustré sur les Figures 3.2.2c et d. Le

nombre de cellules, quant à lui, montre des différences entre les conditions à j4 mais pas à j8. A j4, il y a moins de cellules dans les puits de cellules exposées au lipus par rapport à ceux contenant des cellules témoins.

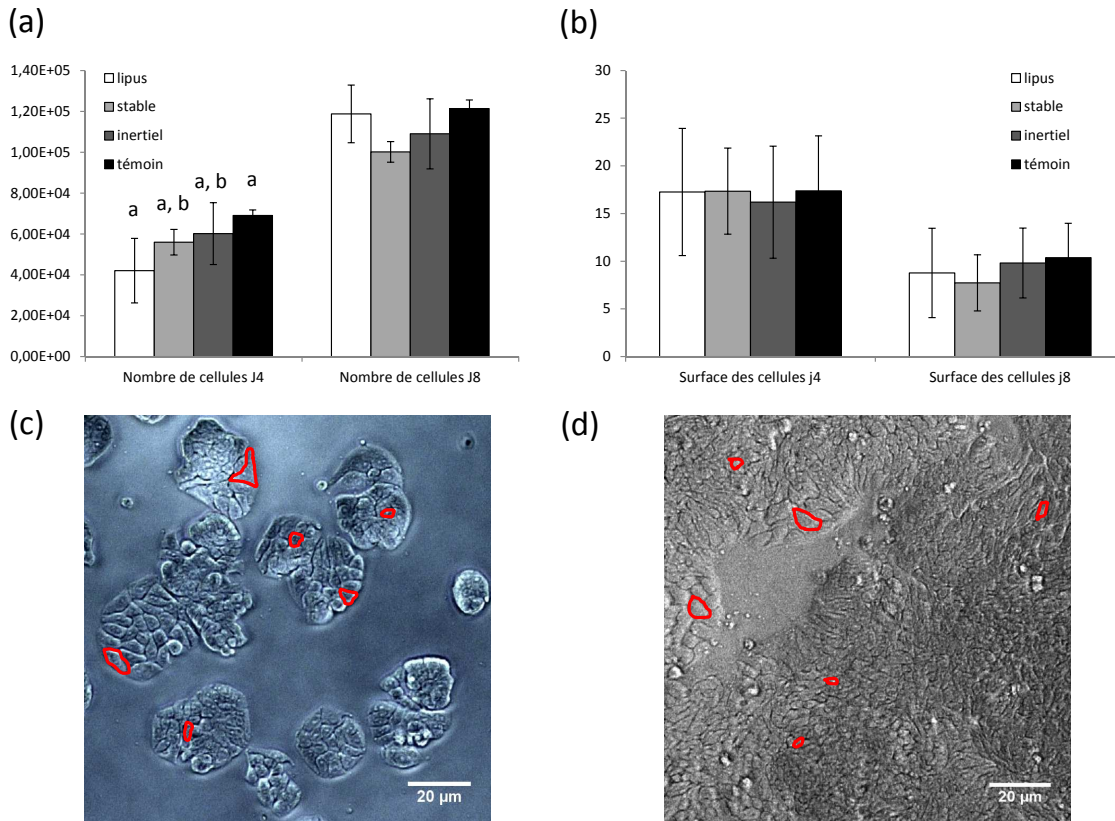


FIGURE 3.15 – a et b/ Respectivement le nombre de cellules (Moyenne \pm écart-type ($n=4$), les moyennes non différentes portent la même lettre.) ainsi que la surface des cellules mesurées (en μm^2 à j4 et j8 (Moyenne \pm écart-type ($n=40$)) et c/ et d/ exemple de photos de cellules obtenues respectivement à j4 et à j8. Certaines cellules sont entourées en rouge afin de montrer la variabilité de la surface des cellules au sein d'une même photo.

Interprétation

L'évolution temporelle du cell index met en évidence deux comportements : lipus/cavitation stable et témoin/cavitation inertielle. Les cellules insonifiées en cavitation stable ne montrent pas de différence en terme de nombre de cellules ou de surface par rapport au témoin, néanmoins leur cell index est plus élevé que celui du groupe contrôle. Cette dissemblance du cell index pourrait s'expliquer par une modification de l'adhésion pour les cellules insonifiées.

Les cellules exposées au lipus n'ont pas une surface cellulaire différente de celle des témoins mais le nombre de cellules est plus faible et le cell index plus élevé. Ces deux derniers résultats ne sont pas corrélés (moins de cellules impliquerait un cell index plus faible), une fois de plus la différence de cell index pourrait s'expliquer par une modification de l'adhésion pour les cellules insonifiées.

Pour les cellules témoin et exposées à la cavitation inertielle, le cell index, le nombre de cellule et

leur surface ne sont pas différents. Afin d'analyser plus finement le comportement de ces deux groupes, les différentes sous-populations sont étudiées séparément.

3.2.3 Effet de la cavitation inertielle sur la reprise de croissance des cellules adhérentes sonoporées ou non et détachées

L'étude précédente ne montre pas de différences entre des cellules insonifiées en condition de cavitation inertielle ou les cellules contrôle. Après insonification, deux sous populations de cellules sont présentes : des cellules sonoporées et des cellules non sonoporées. La reprise de croissance par impédancemétrie est réalisée pour ces deux sous population ainsi que pour les cellules détachées sonoporées.

Protocole

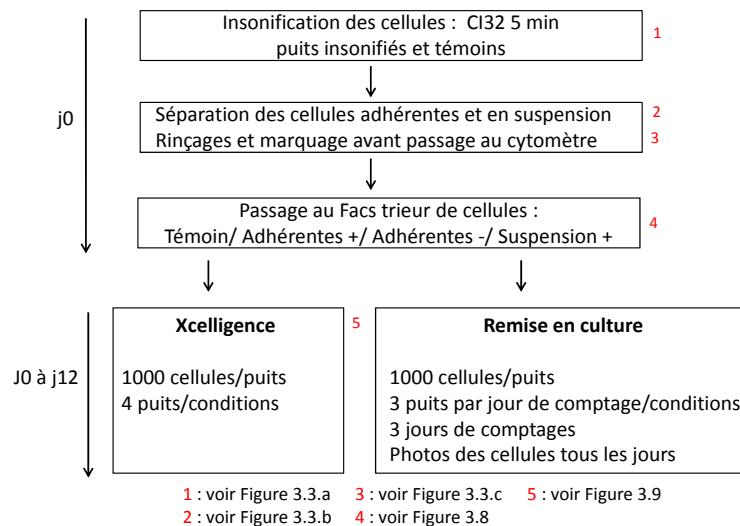


FIGURE 3.16 – Étapes de l'expérience sur l'effet des ultrasons CI32 pendant 300 secondes sur les cellules adhérentes (sonoporées ou non) et détachées.

Comme précédemment, les cellules sont insonifiées et traitées avant passage au cytomètre de flux comme présenté sur la Figure 3.3. Le paramètre acoustique utilisé est CI 32 pendant 5 minutes mais cette fois le balayage en fréquence est utilisé afin de récolter plus de cellules sonoporées. Dix-neuf puits sont insonifiés et les cellules adhérentes après traitement avant passage au cytomètre sont réunies dans un tube (de même pour les cellules détachées). Un tube de cellules témoin adhérentes est récolté à partir de 4 puits. Les cellules sont ensuite passées au FACS trieur de cellules afin de ne conserver que les cellules vivantes et de séparer les cellules adhérentes sonoporées ou non. Elles sont alors ensemencées dans l'e-plate de l'Xcelligence (10000 cellules par puits), à raison de 4 puits par condition (Témoins vivantes/Adhérentes non sonoporées vivantes/Adhérentes sonoporées vivantes/Suspension sonoporées vivantes), où des mesures du cell index sont relevées toutes les 10 minutes. En parallèle le reste des cellules est remis en culture pour effectuer les comptages et prendre des photos des cellules pendant leur reprise de croissance (3 puits/conditions). Des photos sont prises tous les jours avec le microscope

à j1, j2 à j9 et j12 (3 photos/puits). Les cellules sont comptées au cellomètre à j6, j7, j9 et j12. Le protocole récapitulatif de l'expérience est présenté sur la Figure 3.16.

Résultats

Après passage des échantillons au FACS trieurs, les pourcentages d'endocytose et de sonoporation sont obtenus : les témoins présentent 0,2 % d'endocytose, les cellules adhérentes 24,6% de sonoporation et les cellules détachées 86 % de sonoporation. Le pourcentage de sonoporation des cellules détachées est élevé et correspond aux cellules détachées vivantes. Il y a 70% de cellules détachées qui sont mortes. Ces résultats de sonoporation sont cohérents avec ceux obtenus dans les expériences précédentes (respectivement Figure 3.5b et Figure 3.6).

L'évolution temporelle du cell index ainsi que des différents paramètres extraits de ces courbes sont présentés sur la Figure 3.17.

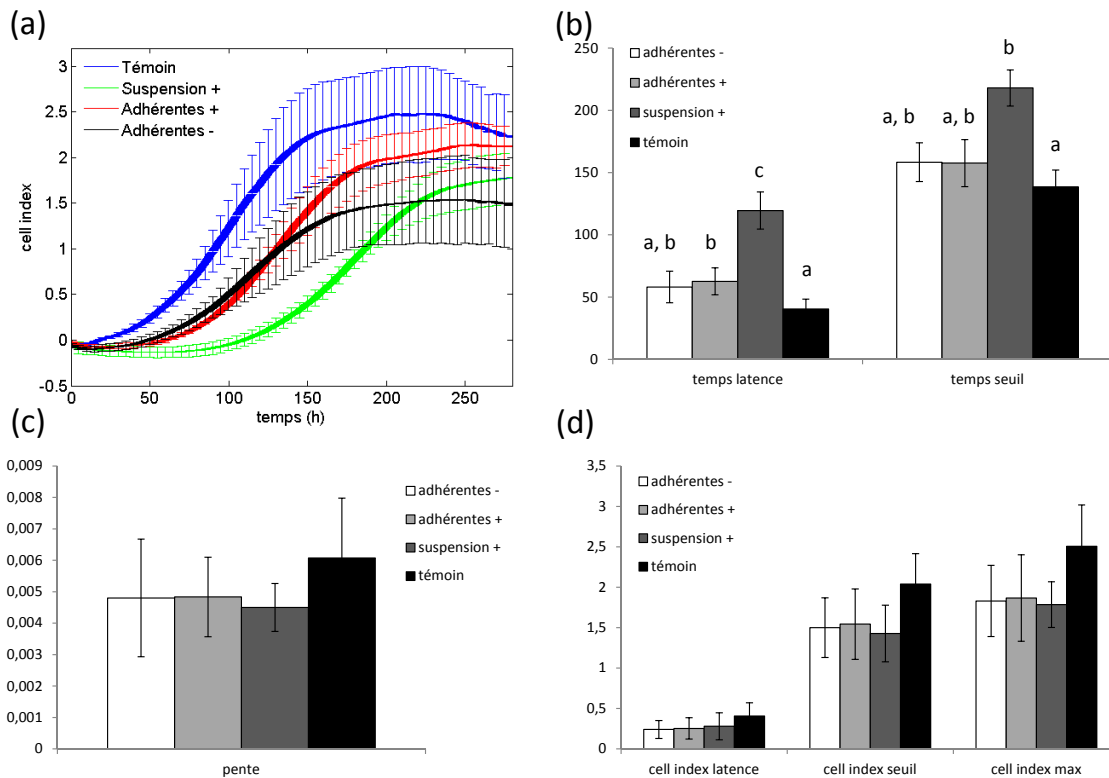


FIGURE 3.17 – Cell index et paramètres extraits : a/ cell index en fonction du temps pour les différentes conditions, b/ les temps de latence et d'arrivée au plateau (en heures), c/ les pentes lors de la période de croissance exponentielle et d/ les cells index correspondant aux temps de latence et d'arrivée sur le plateau ainsi que le cell index maximum obtenu. Moyenne \pm écart-type (n=4), les moyennes non différentes portent la même lettre.

Le nombre de cellules et leur surface pour j12 sont présentés sur la Figure 3.18. Seul ce jour de mesure est conservé car les cellules à ce moment sont toutes dans la même phase, sur le plateau.

Le cell index évolue différemment dans le temps en fonction des conditions expérimentales. Tout

d'abord, le temps de latence est significativement augmenté pour les cellules détachées (par rapport au témoin). Le temps d'arrivée au plateau est également plus élevé pour les cellules détachées. Les cell index, pentes, nombres de cellules et surface cellulaires ne sont pas différents pour les cellules détachées et les témoins.

Les cellules adhérentes sonoporées montrent un temps de latence supérieur ainsi qu'une surface cellulaire au plateau plus grande que les témoins, les cellules adhérentes non sonoporées ne sont pas différentes des témoins. Les cellules adhérentes non sonoporées ont eu à priori moins d'interactions avec les bulles de cavitation ce qui pourrait expliquer l'absence de différences avec les témoins.

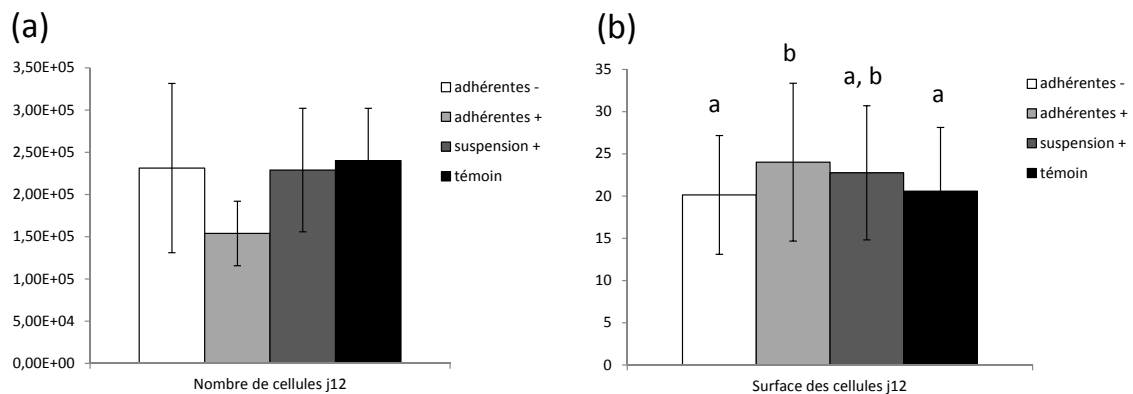


FIGURE 3.18 – Nombre de cellule à j12 (a) (Moyenne \pm écart-type (n=4)) et surface des cellules mesurées (en μm^2) (b) (Moyenne \pm écart-type (n=90), les moyennes non différentes portent la même lettre).

Outre le temps de latence un peu plus long, les cellules adhérentes sonoporées ne montrent pas (ou peu) de différences en termes de cell index, de nombre de cellules et de leur surface avec les cellules contrôles, ce qui met en évidence que des cellules survivent et qu'elles se multiplient normalement après insonification et sonoporation.

Le temps de latence différent pour les cellules témoins, adhérentes sonoporées et détachées pourrait être dû à un stress cellulaire ou à une perte de viabilité de ces cellules. En effet, une partie des cellules pourrait être non viable, car la sonoporation peut mener à l'apoptose en activant le signal PARP (marqueur de la pro-apoptose pour des pertes de fonctionnalités de réparation de l'ADN) (Zhong *et al.*, 2011). Cependant, si la période de croissance exponentielle des cellules est un peu retardée, les cell index obtenus ne sont pas différents pour ces conditions donc l'insonification sur les cellules adhérentes ne semble pas avoir dans notre étude un effet aussi négatif. Ce temps de latence plus long pourrait être induit par un délai dans la synthèse de l'ADN, ce qui retarderait la croissance cellulaire, comme observé par Chen *et al.* (2013) pour les cellules sonoporées.

Peu de modification de la surface cellulaire ont été observés contrairement à la littérature. Après insonifications, des changements morphologiques sont observés : certaines cellules prennent une forme irrégulière en gardant plus ou moins leur taille initiale et d'autres apparaissent bien plus petites que leur taille initiale (Ross *et al.*, 2002). Ces changements sont visibles pour la plupart des cellules sans pour autant qu'il y ait beaucoup de sonoporation. Leur surface est soit plus lisse qu'avant insonification, peut présenter des pores ou encore être plus irrégulière qu'avant insonification (Zhang *et al.*, 2012).

Dans notre cas, l'observation de la morphologie des cellules n'a pas été réalisée immédiatement après insonification mais quelques jours plus tard, ce qui peut expliquer une absence d'effet.

3.3 Conclusion

Le système d'insonification de cellules adhérentes conçu pour des observations en temps réel sous microscope montre des résultats de sonoporation bien supérieurs à l'endocytose. L'utilisation de la régulation de l'activité de cavitation inertielle donne des résultats de sonoporation plus reproductibles qu'à intensité acoustique fixée. La régulation permet de travailler à température ambiante avec les mêmes résultats qu'à température physiologique en assurant le même indice de cavitation inertielle. La sonoporation montre une dépendance spatiale car l'excitation de plusieurs modes successifs lors d'une insonification permet d'augmenter le pourcentage de sonoporation d'environ 15 à 25%.

Les cellules insonifiées par des lipus ou de la cavitation stable montrent un comportement différent en terme de reprise de croissance par rapport aux cellules témoins ou exposées à de la cavitation inertielle. Ces différences semblent liées à une modification de l'adhérence des cellules exposées aux lipus ou à la cavitation stable. Il serait intéressant d'investiguer cette modification de l'adhérence des cellules sous microscope, en utilisant des marqueurs de la vinculine par exemple, qui est une protéine impliquée dans l'adhésion au niveau des points focaux. Les cellules sonoporées, qu'elles soient adhérentes ou détachées par les ultrasons lors du tir, présentent un temps de latence plus important, qui pourrait être induit par le stress de ces cellules. Ce délai est bien supérieur pour les cellules détachées qui ont subi plus d'interactions avec les bulles de cavitation. Il n'y a pas (ou peu) de différence dans les mesures d'impédance, du nombre de cellules et de la surface des cellules sonoporées en comparaison des cellules contrôles, ce qui montre que la sonoporation n'induit pas d'effets négatifs importants sur la reprise de croissance des cellules. Des études plus fines sur l'effet de la sonoporation et de l'insonification des cellules pourraient être réalisées en analysant l'ARN des cellules par la méthode de RNA-Seq qui permet d'obtenir toutes les séquences ARN d'une cellule ainsi que leur quantité (Wang *et al.*, 2009).

Chapitre 4

Observation sous microscope de l'action de la cavitation sur les cellules

Dans le chapitre précédent, des résultats quantitatifs de sonoporation de cellules adhérentes ont été obtenus avec le système développé. Des taux de sonoporation suffisants pour des observations sous microscope ont été obtenus et l'utilisation de la régulation de l'activité de cavitation inertielle a permis une bonne reproductibilité des taux de sonoporation. Dans ce chapitre, le système de sonoporation est utilisé pour sa deuxième particularité : pouvoir effectuer des observations sous microscope en temps-réel. L'utilisation de cette caractéristique du système a déjà permis des observations sous microscope de l'écoulement de streaming global au sein du puits ainsi que des translations de bulles. Dans cette partie, l'idée est d'avoir des informations sur les interactions bulles-cellules. Pour cela, des membranes modèles (des bicouches de lipides fluorescents) sont utilisées à la place des cellules dans un premier temps comme système simplifié et marqueur des interactions bulles-membrane. Puis dans un deuxième temps, des insonifications de cellules sont réalisées dans le but de déterminer la cause du détachement des cellules et d'obtenir des informations sur la sonoporation (localisation spatiale, présence de bulles?).

4.1 Principe de fonctionnement des microscopes utilisés

Ces différentes études ont été réalisées sous microscope et le principe de l'obtention des images des bicouches de lipides fluorescents et de molécules fluorescentes que l'on veut sonoporer est présenté. Les études avec les bicouches de lipides ont été réalisées sous un microscope à épifluorescence (Eclipse TE2000E, Nikon) et confocal à fluorescence (TCS SP5, Leica), celles de sonoporation sauf les scans de cellule l'ont été sous microscope confocal (Confocal Laser Scanning Microscopy 780, Zeiss) à fluorescence et les scans des cellules avant et après sonoporation sous microscope à épifluorescence (Eclipse TE2000E, Nikon). Les observations du détachement cellulaire ont été réalisées en partie sous microscope (MacroFluo, Leica).

Un microscope à épifluorescence permet l'observation d'échantillons fluorescents (comme les bicouches de lipides) ou des molécules fluorescentes (comme l'AlexaFluor 488 contenu dans les molécules que l'on veut internaliser). Son principe de fonctionnement est de diriger le faisceau issu

du laser par un miroir dichroïque vers l'objectif puis vers l'échantillon. Lorsque des molécules sont excitées par le laser dans l'échantillon, elles émettent de la fluorescence dont le signal est capté par la caméra CCD après être passé par l'objectif. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission des molécules fluorescentes sont filtrées via un filtre d'émission (sur la lumière émise par la lampe) et par un filtre de réception (sur la fluorescence émise par l'échantillon). De cette manière, seules les molécules d'intérêt sont considérées et plusieurs molécules différentes peuvent être observées en changeant les filtres d'excitation-émission. La "hauteur" en z d'échantillon observé est liée à l'objectif utilisé. Concernant la profondeur de champ d'observation des échantillons, elle dépend de l'objectif utilisé : elle est de l'ordre de $30 \mu\text{m}$ pour un objectif x10 contre $2 \mu\text{m}$ pour un objectif x50 à huile. Un schéma de principe du microscope à épifluorescence est présenté sur la Figure 4.1a.

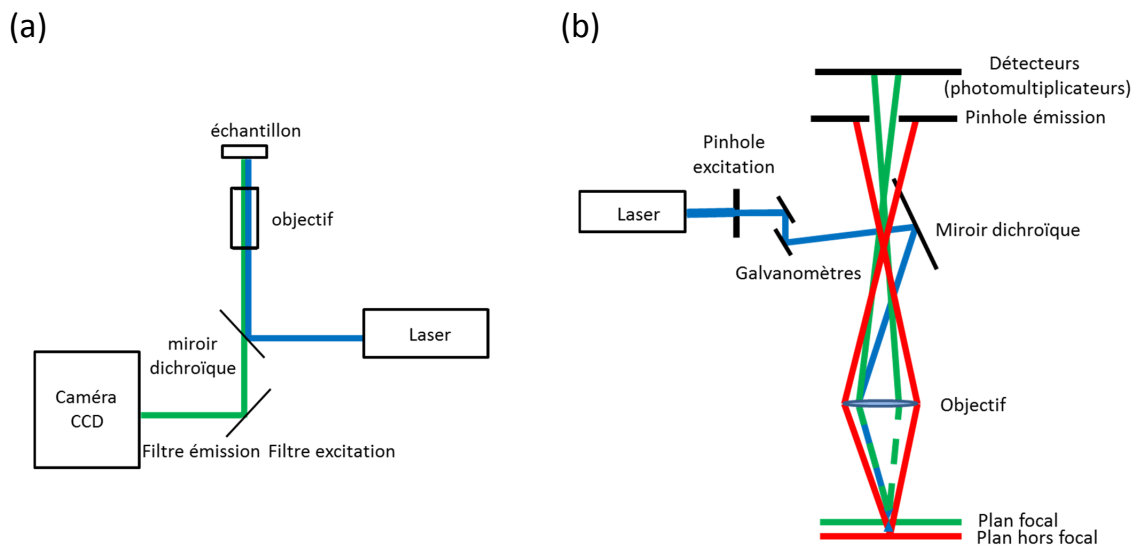


FIGURE 4.1 – Principe de fonctionnement des microscopes à épifluorescence et confocal utilisés dans les expériences sur les membranes et les cellules. a/ Principe du microscope à épifluorescence et b/ principe du microscope confocal à fluorescence.

Le microscope confocal à fluorescence (Figure 4.1b), présente l'avantage de travailler à une profondeur de champ donnée, en faisant varier la position du plan focal d'observation. La résolution en z est de 400 à 600 nm mais peut varier en fonction de l'ouverture du pinhole d'émission. Les galvanomètres permettent de déplacer le "faisceau" selon l'axe z de manière très fine afin de choisir la coupe de l'échantillon que l'on veut observer. Seule la fluorescence émise dans le plan focal est transmise au détecteur grâce au pinhole d'émission.

Le principe du microscope à fluorescence est le même que celui du microscope à épifluorescence mais avec un objectif de faible puissance permettant l'observation d'objet macroscopique. Par exemple avec un objectif x1 (Planapo 1x, Leica MacroFluo), le champ d'observation est de 35 mm.

4.2 Les bicouches lipidiques : des membranes modèles

Mon sujet de thèse s'inscrivait, en partie, dans un contrat de recherche international porté par le laboratoire, sur des aspects fondamentaux et applicatifs du contrôle de cavitation pour la thérapie. Dans ce cadre, une collaboration a été initiée avec le groupe Biophysique, porté par le professeur Jean-Paul Rieu, de l'Institut Lumière et Matière de l'Université Lyon 1. L'objectif, à moyen terme, était la caractérisation d'une cinétique de sonoporation par l'utilisation de membranes modèles, des bicouches lipidiques. Suite au développement de la platine de microscopie avec dispositif d'insonification intégré, et les résultats de sonoporation démontrant un effet spatial du phénomène, cette collaboration LabTAU-ILM a été l'occasion de regrouper les compétences acoustiques du LabTAU et biophysique de l'ILM pour étudier les interactions bulles (en proche paroi) et fond du puits (où sont placées les cellules) par l'intermédiaire de bicouches lipidiques.

4.2.1 Protocole de fabrication des bicouches de lipides et protocole de microscopie

Les membranes étudiées sont constituées de lipides (tête hydrophile et queue hydrophobe sur laquelle sont attachés des fluorochromes). Les lipides utilisés sont des bicouches supportées de DPPC ou DLPC (en phase gel ou fluide à température ambiante) avec 5% de fluorophore avec NBD-PC (Avanti Polar Lipids, $\lambda_{excitation} = 460 \text{ nm}$ et $\lambda_{émission} = 534 \text{ nm}$). Les lipides sont déposés au fond du puits selon la méthode de fusion des vésicules (Brian et McConnell, 1984), schématisée sur la Figure 4.2.

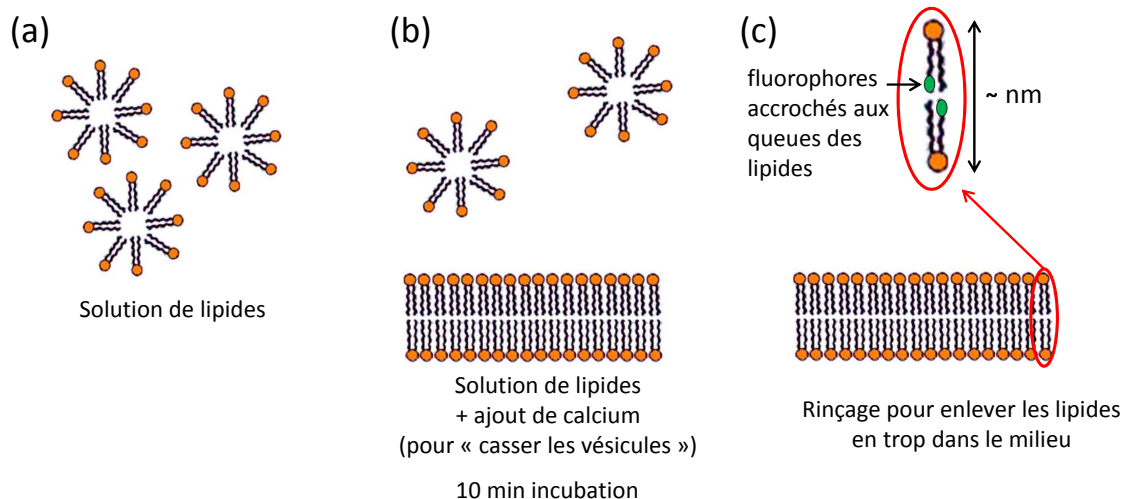


FIGURE 4.2 – Méthode de préparation des bicouches de lipides à partir d'une solution de lipides en vésicules.

Une solution contenant les vésicules de lipides est déposée au fond du puits (concentration = $0,32 \mu\text{M}$) avec du calcium (solution de CaCl_2 , concentration = $0,2 \text{ M}$, Roth) (Tamm et McConnell, 1985; E. Kalb et Tamm, 1992), qui a la propriété de "casser" les vésicules. Celles-ci se déposent alors en bicouches au fond du puits. Le milieu est rincé (25 fois) afin de retirer le surplus de lipides restés dans le

volume. Dans certaines études de cette section, de la SulfoRhodamine a été ajoutée pour marquer le milieu fluide (Sigma-Aldrich, $\lambda_{excitation} = 586 \text{ nm}$ et $\lambda_{émission} = 605 \text{ nm}$, concentration=0,02 nM) et des microbilles ont été utilisées pour visualiser l'écoulement près des bulles (Invitrogen, $\lambda_{excitation} = 580 \text{ nm}$ et $\lambda_{émission} = 605 \text{ nm}$, diamètre=0,5 μm , concentration= $2,3 \cdot 10^6$ microbilles/mL).

La plupart des observations ont été réalisées sous microscope (Eclipse TE2000E, Nikon) avec les objectifs :

- 10x (1 pixel=0,658 μm) avec une vitesse d'acquisition de 33 images/s,
- 40x (1 pixel=0,165 μm) avec une vitesse d'acquisition de 18 images/s.

Des observations préliminaires ont été réalisées sous microscope confocal (TCS SP5, Leica) avec l'objectif 10x (1 pixel=0,658 μm) et une vitesse d'acquisition de 7 images/s, et des vidéos avec une cadence d'acquisition plus importantes ont été acquise avec une caméra rapide (Vision Research Phantom v12.1) (1 pixel=1,087 μm) avec une vitesse d'acquisition de 2000 images/s.

Les excitations acoustiques des insonifications sur membranes sont des excitations continues pour différents CI consignés.

4.2.2 Observations préliminaires

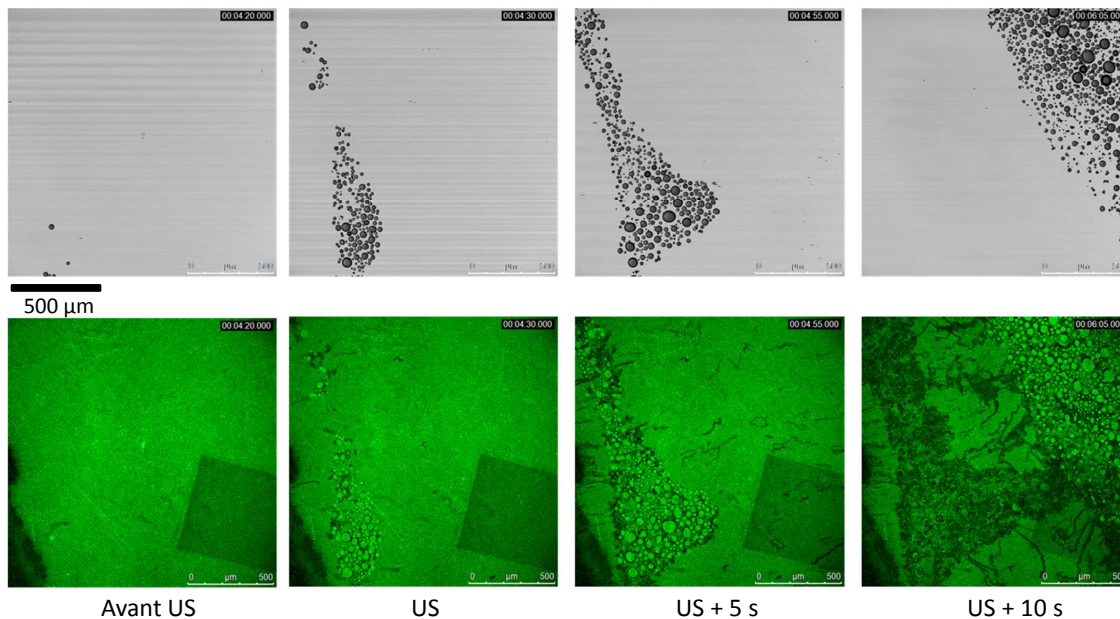


FIGURE 4.3 – En haut, les images en transmission et en bas les images correspondantes en fluorescence résultant du passage d'un nuage de bulles dans le voisinage de la membrane.

Dans un premier temps, des observations ont été réalisées sous microscope confocal afin de pouvoir afficher à la fois une image en fluorescence et en transmission au même instant, au détriment d'une vitesse d'acquisition plutôt faible. L'obtention de ces deux images simultanées permet de voir les bulles seules (en transmission) et leurs effets sur la membrane (en fluorescence). Un exemple d'images

obtenues est présenté sur la Figure 4.3 (les images de transmission en haut et celle de fluorescence en bas). Avant application des ultrasons, la membrane en fluorescence est d'une couleur verte plutôt homogène sauf sur un carré (en bas à droite) qui correspond à une zone précédemment observée et qui a été photoblanchie (les fluorochromes ont été détruits de manière irréversible par la lumière en présence d'oxygène). Lorsqu'une excitation acoustique est appliquée, il y a apparition d'un nuage de bulles visible sur l'image en transmission mais qui apparaît également en surfluorescence sur l'image en fluorescence : les bulles ont réquisitionné des lipides de la membrane. Des zones de dégâts (en noir) sur la membrane existent et sont localisées autour du nuage de bulles. Cinq secondes plus tard, le nuage s'est développé et des fissures, à droite du nuage, se forment sur la membrane à une distance importante du nuage de bulles. Dix secondes après application des ultrasons, le nuage s'est décalé vers la droite laissant sur son passage des dégâts permanents (en noir).

Ces premières observations montrent tout d'abord les différents types de dégâts causés par les bulles de cavitation ainsi que le fait qu'il n'est pas nécessaire d'avoir à la fois des images en transmission et en fluorescence car les bulles, en pompant des lipides sur la membrane, apparaissent sur les images en fluorescence. Les observations suivantes seront réalisées au microscope inversé mais non confocal, ce qui permettra d'obtenir des vitesses d'acquisitions plus intéressantes en se concentrant sur les images en fluorescence.

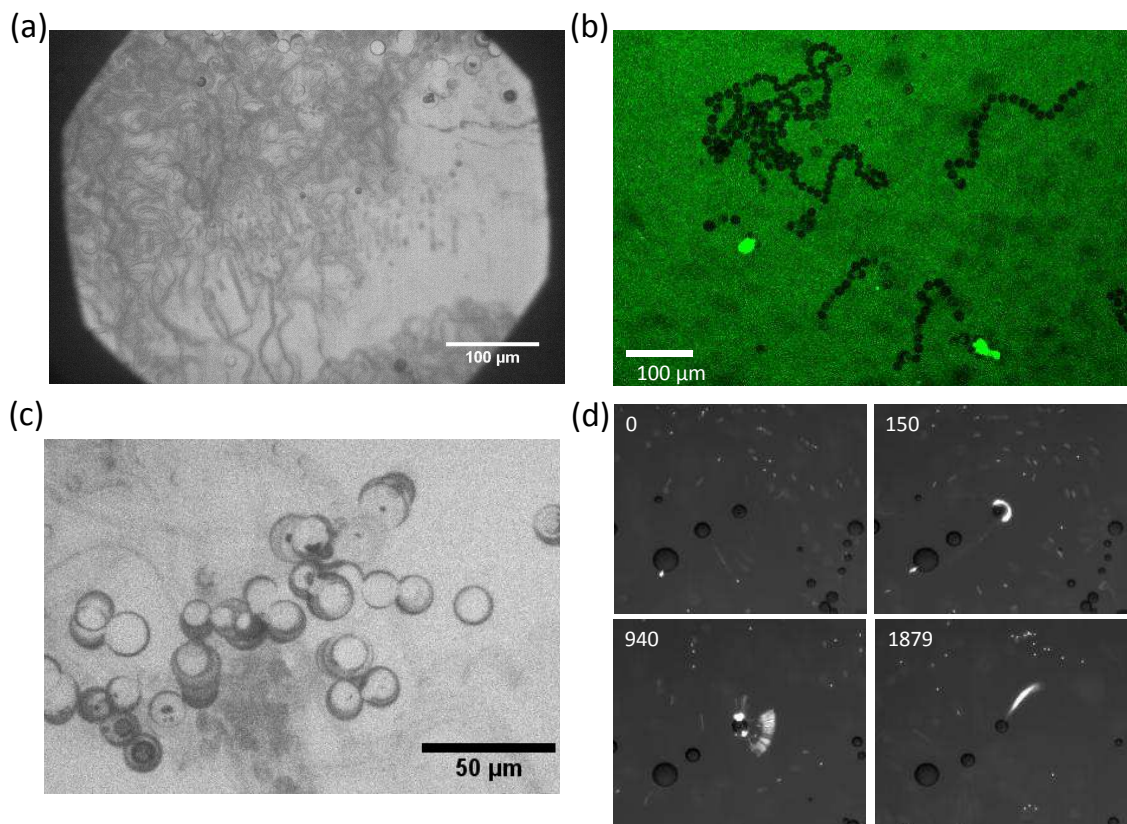


FIGURE 4.4 – Différents types de dégâts liés aux interactions bulles-membrane et observation de l'écoulement en présence des bulles de cavitation : a/ des fissures, b/ des impacts circulaires en formes de colliers de perles, c/ des impacts circulaires et annulaires et d/ observation de l'écoulement près des bulles par ajout de microbilles.

Après insonification de la membrane (tirs continus), différents types de dégâts sont observés sur la membrane : des fissures et différents types d'impacts. Un exemple de fissures est présenté sur la Figure 4.4a. Les impacts observés sont soit sous forme de disque (tous les lipides ont disparu) soit sous forme d'anneau (seuls des lipides sur la périphérie de la bulle ont été arrachés) (Figures 4.4b et c) ainsi que des successions d'impacts en forme de collier de perles, dégâts plutôt étonnants, dont un exemple est présenté sur la Figure 4.4b.

Pendant les excitations acoustiques, les bulles sont observées sur la membrane et sont posées au fond du puits. En raison de la cadence d'acquisition (environ 30 images/s), les oscillations de ces bulles ne sont pas observables (à 426 kHz, la période étant de l'ordre de $2 \mu\text{s}$), celles-ci semblent donc immobiles. Cependant, en ajoutant des microbilles fluorescentes dans le puits (diamètre= $0,5 \mu\text{m}$, concentration= $2,3 \cdot 10^6$ microbilles/mL, $\lambda_{excitation} = 580 \text{ nm}$ et $\lambda_{émission} = 605 \text{ nm}$), du microstreaming autour des bulles est observé (Figure 4.4d), ce qui montre que les bulles oscillent bien. Sur ces images les microbilles sont attirées vers la bulle (à 150 ms) puis éjectées au bout d'un moment (à 940 et 1879 ms).

Dans la suite, les fissures et les bulles "sauteuses", impliquées dans les impacts en colliers de perles, sont étudiées plus en détails.

4.2.3 Analyse des fissures membranaires

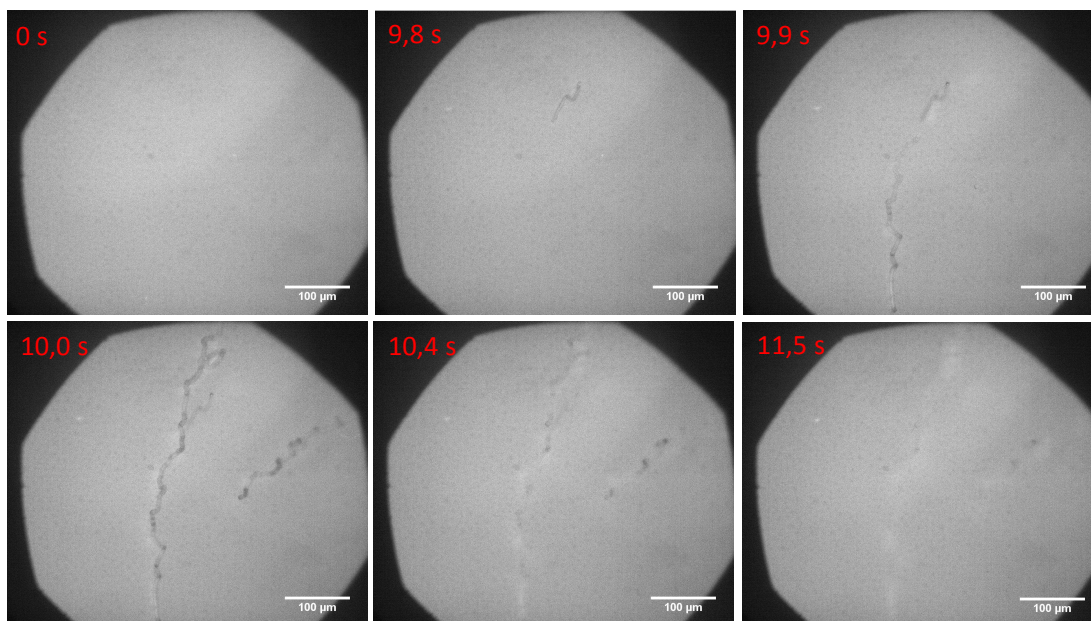


FIGURE 4.5 – Exemple d'images d'une vidéo où les fissures créées par les bulles de cavitation à 9,8, 9,9 et 10 secondes vont progressivement se refermer jusqu'à disparaître à 11,5 secondes.

Des fissures laissant des dégâts permanents ont été observées sur la membrane (Figure 4.4a). Il est intéressant de noter que dans certains cas, ces fissures disparaissent en quelques secondes. Un exemple de ce type de fissures est présenté sur la Figure 4.5. Sur ces images, des fissures apparaissent à 9,8,

9,9 et 10,0 secondes puis s'estompent progressivement jusqu'à s'être complètement refermées à 11,5 secondes. Ces observations de fissures transitoires ou permanentes sont particulièrement intéressantes en imaginant l'analogie avec la poration des cellules : les fissures transitoires pouvant donner lieu à des pores réversibles dans la membrane cellulaire et les fissures permanentes correspondant à des pores non réversibles entraînant la mort de la cellule. Avant d'aller plus loin dans cette analogie, une étude paramétrique des fissures a été réalisée afin de déterminer s'il y a une corrélation entre le temps que met la fissure à se refermer et des paramètres liés aux membranes et aux fissures (largeur, profondeur).

Étude paramétrique des fissures

Avant d'insonifier les membranes, leur caractéristique en terme de diffusion de lipides a été mesurée en utilisant une méthode de Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) exposée ci-dessous. En présence d'une distribution homogène d'une population moléculaire fluorescente, on peut inhiber de manière irréversible sa fluorescence dans une zone restreinte de l'échantillon par photoblanchiment (destruction irréversible d'un fluorochrome excité par la lumière en présence d'oxygène) à l'aide d'un flash lumineux obtenu en exposant cette zone avec un laser. Deux populations de molécules sont alors présentes (une fluorescente, l'autre pas) spatialement distinctes. Si les molécules sont capables de se déplacer dans le milieu, il y a redistribution des deux populations jusqu'à homogénéisation : la zone blanchie redevient progressivement fluorescente. L'analyse de la cinétique de récupération de fluorescence permet de déduire le coefficient de diffusion latérale, caractéristique de la vitesse de déplacement des molécules dans le milieu (Wikipédia, 2014).

Afin d'avoir une idée du temps de diffusion des membranes (en cas d'extinction des fluorochromes et non de disparition des lipides) utilisées, l'intensité du laser est mise au maximum et le faisceau est appliqué sur une petite zone de la membrane pendant quelques secondes (en réglant la taille du diaphragme au minimum) ; puis le laser est éteint et le diaphragme ouvert pour observer la fluorescence de la zone blanchie sur son contour, où les lipides diffusent et donc où la fluorescence revient progressivement (Figure 4.6a). Pour en extraire un temps caractéristique, nous réalisons un suivi temporel de l'intensité de fluorescence moyenne sur une petite ligne à la limite de la zone photoblanchie. L'intensité sur une zone non photoblanchie a été également mesurée et l'intensité de la fluorescence décroît progressivement en fonction du temps. Ceci est dû au photoblanchiment occasionné sur la membrane par le laser lors de la vidéo. Après soustraction de ce photoblanchiment intrinsèque de la membrane, l'intensité de fluorescence de la zone mesurée est interpolée par une fonction exponentielle $f(t) = A + B \exp(-t/C)$. On en déduit un temps caractéristique de diffusion : le temps nécessaire pour retrouver 95% du niveau d'intensité avant diffusion. Un exemple de l'évolution de l'intensité sur une ligne est présenté sur la Figure 4.6a.

De la même manière, pour chaque fissure analysée, l'intensité moyenne de fluorescence sur toute la surface de la fissure est mesurée en fonction du temps afin de déterminer un temps caractéristique de recouvrement (le photoblanchiment sur le temps de la vidéo est mesuré sur une zone qui reste fluorescente et est soustrait à l'intensité moyenne sur la fissure avant interpolation) (Figure 4.6b). A priori, il est attendu que le temps de recouvrement d'une fissure soit lié à sa largeur et/ou sa profondeur. En effet, le coefficient de diffusion des lipides est une constante pour chaque membrane et

plus la fissure est large, plus la diffusion pour un recouvrement complet de la fissure devrait être long.

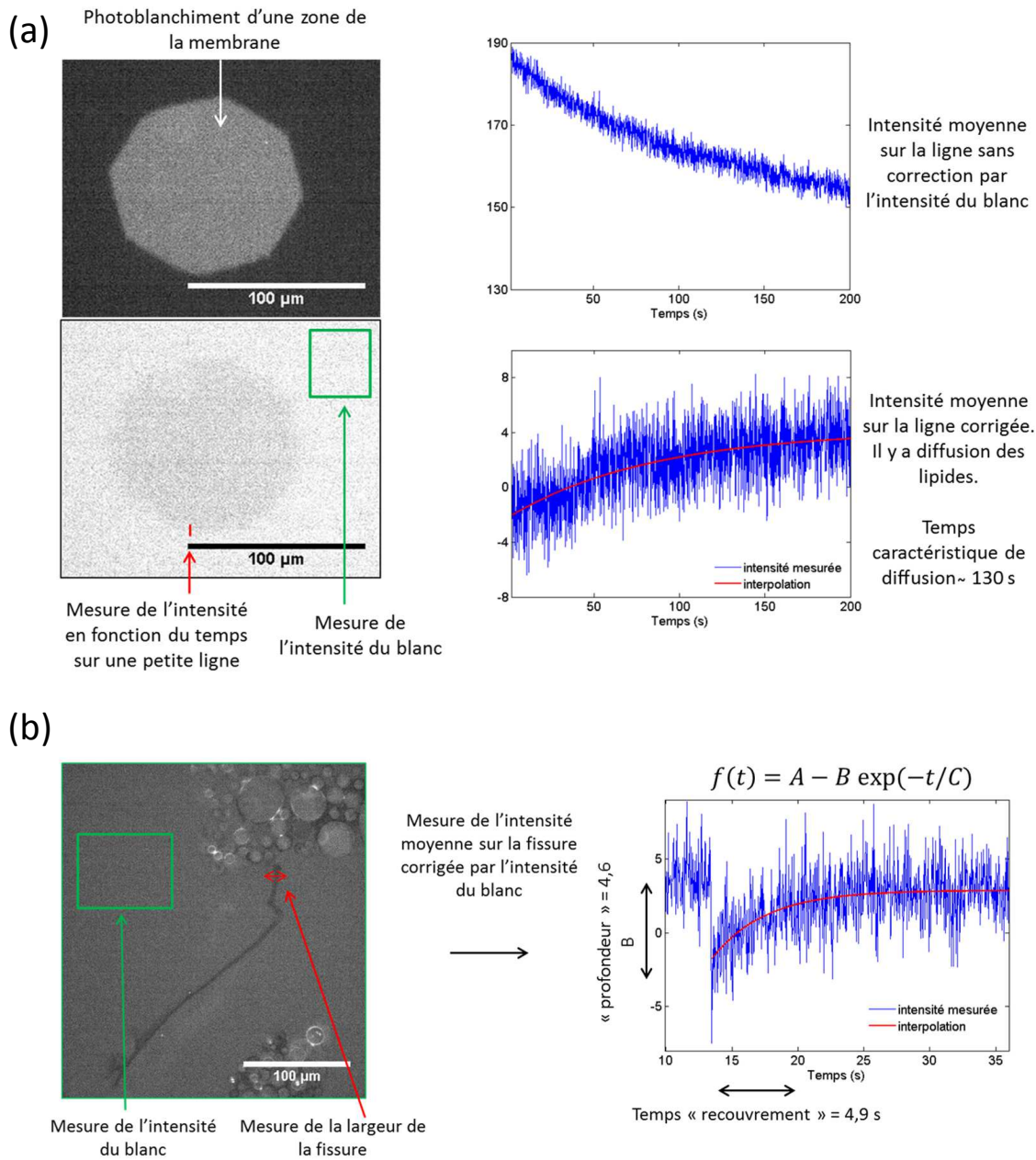


FIGURE 4.6 – Protocole de traitement des images de fissures. a/ pour chaque membrane, un "temps" lié à la diffusion des lipides avec FRAP est mesuré. Pour cela, la membrane est photoblanchie sur une petite zone et l'intensité est ensuite mesurée sur une petite ligne. Afin de s'affranchir du photoblanchiment inhérent à l'éclairage de la membrane pendant la vidéo, l'intensité du blanc est mesurée puis soustraite à l'intensité mesurée sur la ligne. Le temps de diffusion des lipides est interpolé par une fonction exponentielle. b/ De la même manière, pour chaque fissure, l'intensité en fonction du temps est mesurée sur toute la surface de la fissure ainsi que sa largeur et l'intensité du blanc; le "temps de recouvrement" de la fissure est interpolé par la même fonction exponentielle.

Pour chaque fissure, différents paramètres sont mesurés : la largeur de la fissure (mesurée sur la vidéo), un paramètre de "profondeur" (écart entre l'intensité juste avant la fissure et juste après, correspondant au paramètre B de l'interpolation). Pour chaque membrane, un état initial avant tir est estimé par l'intensité moyenne sur toute l'image normalisé par la dynamique d'intensité de fluorescence (max-min) ainsi qu'un état final (même chose après tir). Plus une membrane comporte de dégâts, plus la valeur de son état est élevée. Le temps caractéristique de recouvrement des fissures est déterminé comme étant le temps nécessaire pour que l'intensité après fissure atteigne 95% du niveau avant fissuration.

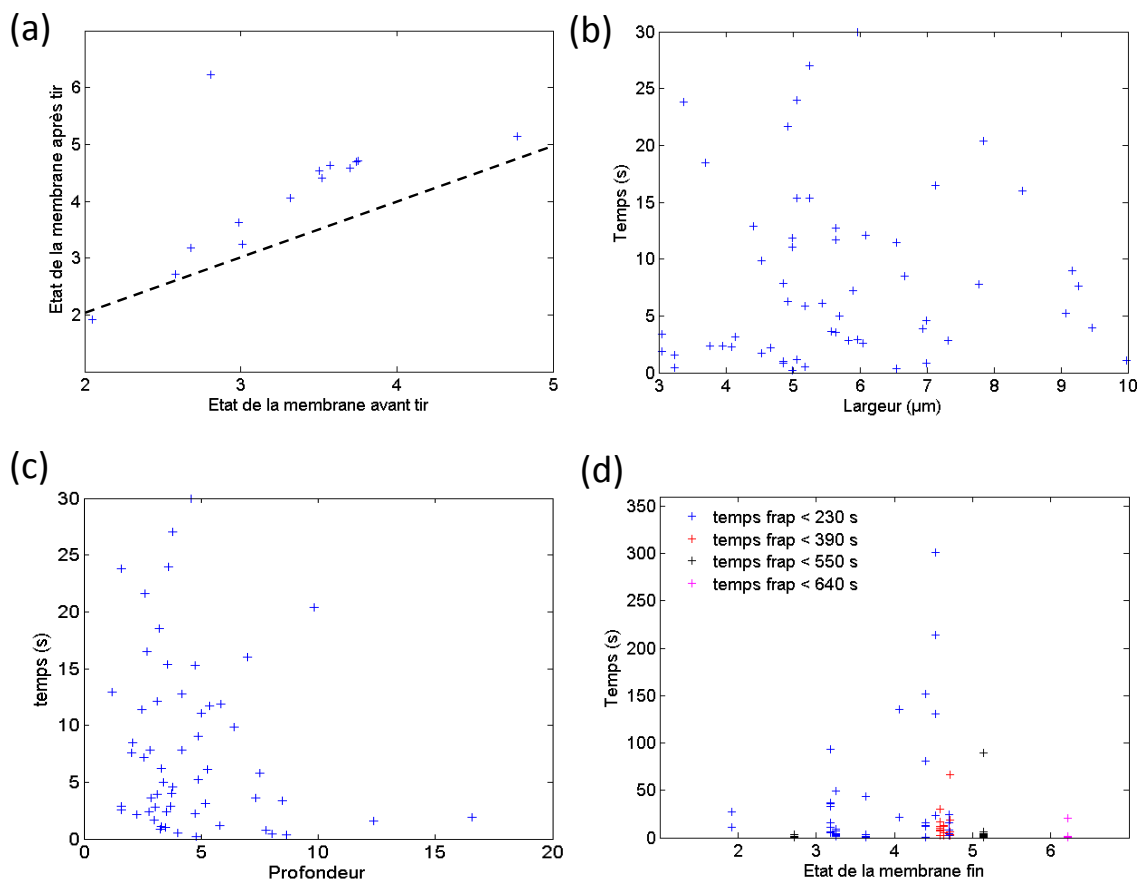


FIGURE 4.7 – Résultats des mesures sur les fissures : a/ état de la membrane après tir en fonction de l'état de la membrane avant tir, b/ et c/ temps de recouvrement des fissures, respectivement, en fonction de la largeur et de la profondeur des fissures pour des temps de recouvrement inférieurs à 30 secondes et d/ temps de recouvrement des fissures en fonction de l'état de la membrane après tir en fonction des différents temps de diffusion des lipides des membranes.

Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 4.7. Tout d'abord, sur la Figure 4.7a, les paramètres d'état initial et final des membranes sont tracés. Les états initiaux sont variables car plusieurs tirs ont été réalisés sur la même membrane. L'état final de la membrane est plus élevé (la membrane est plus endommagée) que l'état initial ce qui permet de valider ces paramètres d'interprétation. Les temps de recouvrement de moins de 30 secondes (fissures qui se referment) sont

analysés en fonction de la largeur et de la profondeur des fissures (Figures 4.7b et c). Étonnamment, il ne semble pas y avoir de corrélation simple entre ces paramètres. Ceci pourrait être expliqué par le grand nombre de paramètres mis en jeu : les membranes ne présentent pas toutes le même temps de diffusion des lipides après FRAP, et les fissures relevées ne présentent pas toutes le même état initial ou final. Le temps de recouvrement des fissures en fonction de l'état final de la membrane et pour les différents temps de diffusion des lipides des membranes est présenté sur la Figure 4.7d. Il apparaît que les membranes où les fissures peuvent mettre plus de temps à se refermer sont celles dont le temps de diffusion est le plus court, de plus lorsque les fissures mettent plus longtemps à se refermer, l'état final de la membrane n'est pas à sa valeur maximale. On pourrait s'attendre à ce qu'une membrane trop endommagée, où trop de lipides ont été arrachés, ne puisse plus "remplir" les trous ; mais il est envisageable que celle-ci soit endommagée sur la zone de la fissure et non pas sur toute l'image. De même, la membrane présentant le temps de diffusion le plus long présente également un état final élevé mais les fissures présentes se referment. La corrélation simple entre le temps de recouvrement d'une fissure et sa largeur et/ou sa profondeur attendue n'a donc pas été retrouvée. Ceci pourrait être dû aux origines diverses du phénomène de fissuration, en termes de comportements de bulles en proche paroi.

Hypothèse de formation des fissures

La différence de comportement observée, fissuration permanente ou transitoire, pourrait être induite par un arrachement différent des lipides. En effet, on pourrait supposer que seuls des lipides du feuillet supérieur de la bicouche soient arrachés dans les cas d'une fissure transitoire alors que dans le cas d'une fissure permanente des lipides des deux feuillets manqueraient. En observant à meilleure résolution ces fissures (Figure 4.8), il apparaît que les lipides ne sont pas arrachés de manière homogène. Les observations de Malghani (1998) coïncident avec cette observation de fissures non homogènes sur la membrane, mais cependant à bien plus petite échelle.

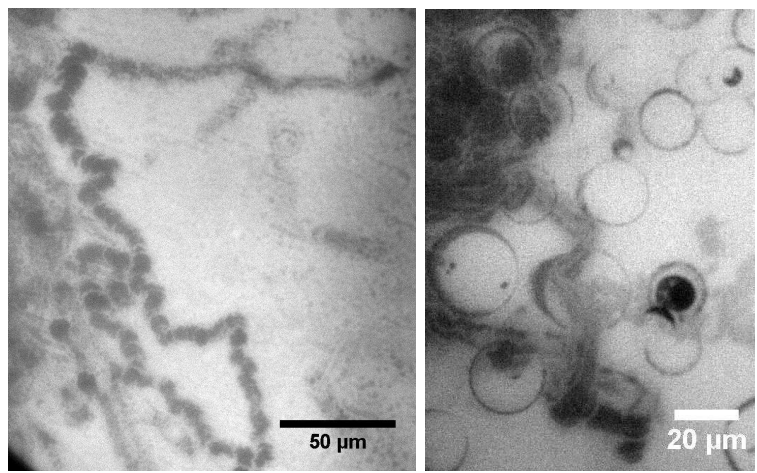


FIGURE 4.8 – Deux exemple de fissures à plus forte résolution : celles-ci ne sont pas homogènes.

Les différences de fissuration peuvent être induites par des comportements divers de bulles en

proche paroi. Par exemple, une bulle passant au dessus de la membrane en oscillant pourrait générer une contrainte de cisaillement sur la membrane susceptible d'arracher ou de désorganiser les lipides, et ce principalement sur le feuillet supérieur (Figure 4.9a). Un autre comportement de bulle pouvant mener à des fissures est celui d'une bulle s'écrasant au fond du puits et roulant sur la membrane avant de s'y poser (Figure 4.9b). Ce comportement pourrait engendrer plus de dégâts et mener possiblement à l'arrachement de lipides des deux feuillets.

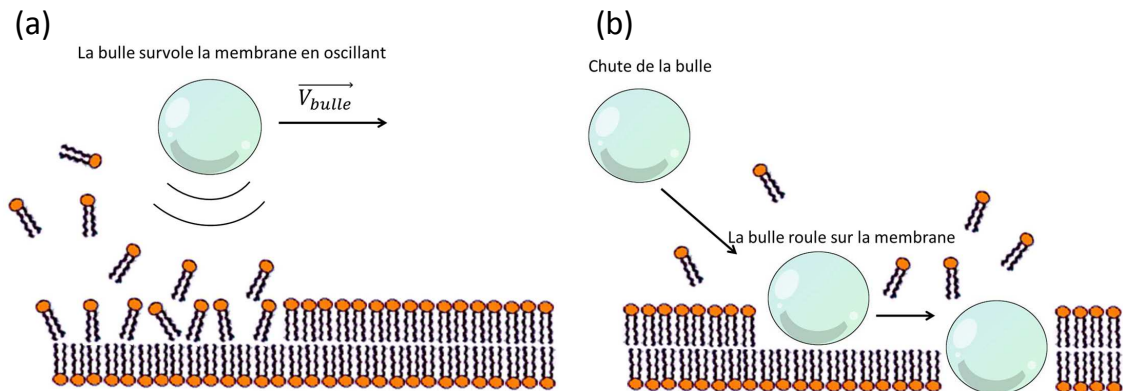


FIGURE 4.9 – Hypothèses de formation des fissures : a/ la bulle passe au dessus de la membrane à grande vitesse en oscillant ce qui génère une contrainte sur la membrane et b/ la bulle s'écrase sur la membrane en roulant dessus.

Afin de vérifier ces hypothèses, des vidéos à la caméra rapide en lumière naturelle ont été réalisées et une image finale en fluorescence a été relevée. Les deux comportements de bulles illustrés sur la Figure 4.9 ont été observés : des bulles survolant la membrane à grande vitesse, nommées dans la suite bulles fusées, puis dans certains cas se posant sur la membrane (en s'y écrasant).

La trajectoire de bulles fusées a été relevée sur deux vidéos où apparaissaient des fissures sur l'image en fluorescence après tir. Sur chacune de ces vidéos, les trajectoires de 15 bulles fusées ont été relevées (Figure 4.10).

Sur la première vidéo, les bulles fusées décrivent des trajectoires plutôt sinueuses avant de se poser au fond du puits. Ces trajectoires relevées à la caméra ultra-rapide (Figure 4.10c et d) sont superposées à l'image de fluorescence obtenue après excitation acoustique (Figure 4.10a et b), et pourraient être responsables des dégâts présents à gauche de l'image (une accumulation de fissures résultant en une zone très endommagée). Pour la deuxième vidéo, seule une partie des trajectoires de bulles fusées semblent responsables des fissures observées sur l'image en fluorescence (Figure 4.10b). Les trajectoires des bulles fusées responsables des fissures et les trajectoires de celles non responsables des fissures sont tracées sur la Figure 4.10d. Les bulles ne générant pas de fissures décrivent des trajectoires beaucoup plus rectilignes, alors que les autres se déplacent de manière plus aléatoire surtout au début de leur déplacement (vers le milieu de l'image). Il est à noter que toutes ces bulles se déplacent beaucoup plus vite que celles étudiées au chapitre 2, décrivant des translations induites par la présence simultanée du champ acoustique d'ondes stationnaires et du champ hydrodynamique composé de tourbillons à grande échelle. Les bulles en translation (cf chapitre 2) ont une vitesse de l'ordre du dixième de mm/s

contre plusieurs dizaines de mm/s dans le cas des bulles fusées.

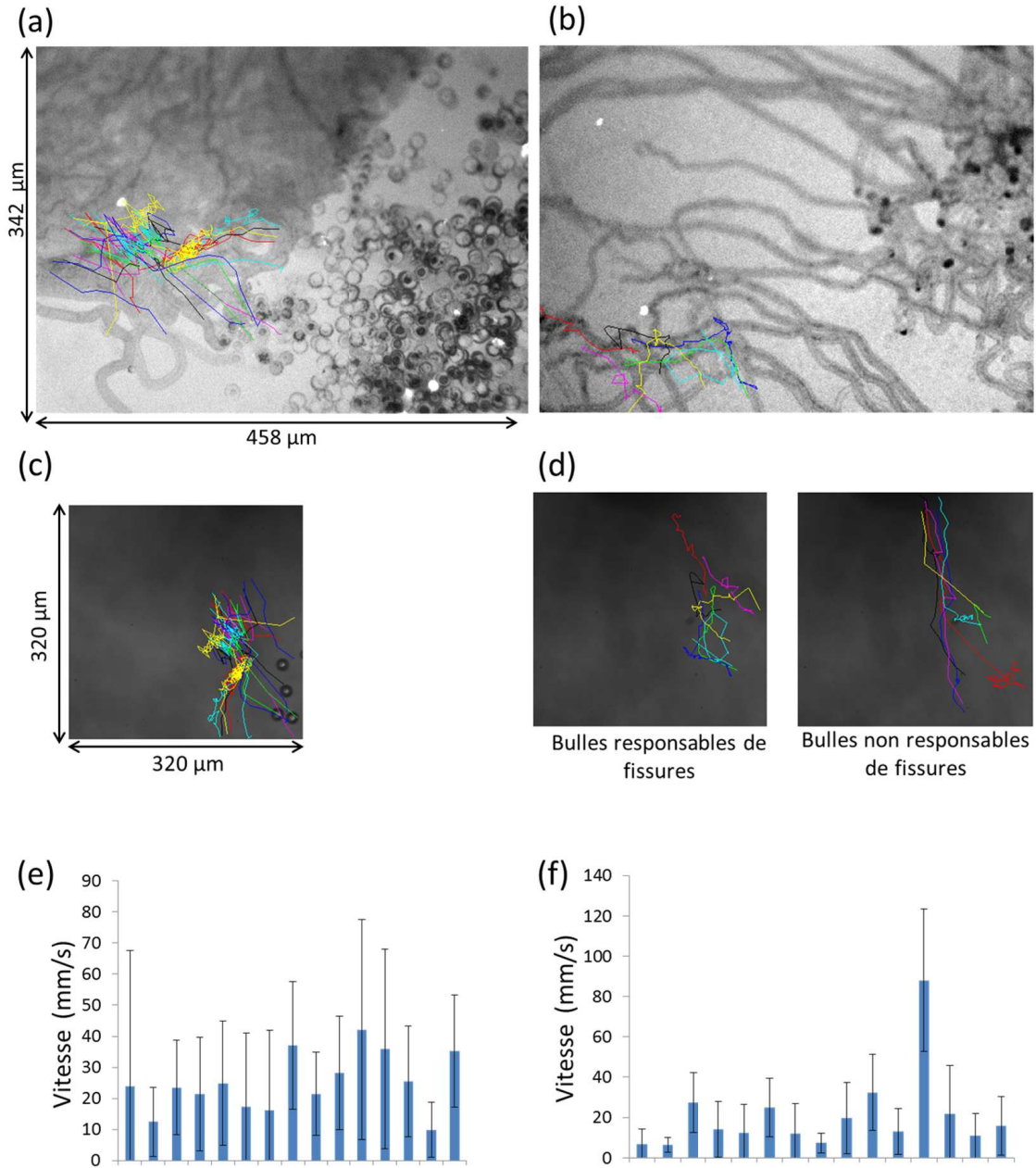


FIGURE 4.10 – Trajectoires des bulles fusées et possibles dégâts sur la membrane liés au passage de ces bulles pour deux exemples a/ et c/. Le premier exemple en a/ et c/ montre respectivement la trajectoire des bulles fusées suivies sur l'image en fluorescence obtenue après tir et sur l'image en lumière naturelle où la trajectoire des bulles a été relevée : les bulles fusées ont des trajectoires plutôt chahutées avant de se poser au fond du puits et leurs mouvement pourrait être la cause des dégâts observés à gauche des impacts de bulles (a). Le deuxième exemple montre respectivement la trajectoire de bulles qui semblent être la cause des fissures observées sur l'image en fluorescence en b/ et d/ ainsi que les trajectoires de bulles qui ne semblent pas avoir laissé de fissures. Les vitesses (moyenne et écarts-types) pour les trajectoires des différentes bulles relevées en a/ et b/ sont présentées en e/ et f/.

Les effets d'une bulle sphérique à proximité d'une paroi ont été déterminés par Doinikov et Bouakaz (2010) pour le cas d'une bulle immobile qui exerce, sous l'effet de ses oscillations radiales, une contrainte de cisaillement sur la paroi. Dans notre cas, la bulle se déplace et on peut supposer qu'elle exerce une contrainte de cisaillement sur la membrane lorsqu'elle oscille mais cette contrainte explique-t-elle l'arrachement des lipides ? A notre connaissance, des bulles roulant sur des membranes n'ont jamais été observées auparavant mais des vésicules surfant sur des membranes l'ont été (Solon *et al.*, 2006), mais à très faible vitesse cependant, de l'ordre du μ/s .

4.2.4 Bulles sauteuses

Des dégâts particuliers présentant une succession d'impacts de même diamètre (en forme de collier de perles) ont été observés (Figure 4.4b). Ces diamètres de bulles semblent correspondre à des petites bulles (de rayon inférieur au rayon résonant). Ces impacts pourraient résulter d'un grand nombre de bulles qui se sont posées les unes près des autres sur la membrane (ce qui serait quand même plutôt étonnant car ces impacts ont tous un diamètre très voisin) ou bien d'une bulle seule qui saute d'une position à une autre sur la membrane. Afin de vérifier si ces impacts ont été laissés par une bulle unique qui "saute" sur la membrane, des vidéos pendant les excitations acoustiques ont été réalisées.

Une bulle unique ?

Lors d'une insonification continue, des observations au microscope avec l'objectif 10x ont permis de valider que les dégâts en colliers de perles sont bien laissés par une bulle unique qui saute sur la membrane (Figure 4.11a). Cette figure montre la dynamique d'une bulle qui saute sur une durée d'environ 18 secondes. La bulle observée apparaît en surfluorescence car elle réquisitionne des lipides de la membrane. La Figure 4.11b présente l'évolution de l'intensité de fluorescence de la bulle en fonction du temps sur trois positions. L'intensité de fluorescence est normalisée par celle de la bicouche : une intensité de 2 par exemple correspond à 2 fois l'intensité de la bicouche intacte. Pour chacune de ces positions, avant l'arrivée de la bulle, l'intensité est de 1 car la membrane est intacte. Suite à l'arrivée de la bulle, l'intensité augmente jusqu'à atteindre une valeur critique (environ 2,5 bicouches). Une fois que cette valeur critique est atteinte, la bulle saute à une autre position et recommence à collecter les lipides de la membrane en emportant avec elle les lipides collectés à la position où elle se trouvait.

Les bulles sauteuses ne présentent, à priori, pas d'intérêt particulier pour les applications thérapeutiques mais sont un phénomène physique surprenant et intéressant à étudier. Ces bulles sauteuses semblent rebondir sur la membrane à la manière d'une balle en caoutchouc sur une table rigide plane ou bien comme des gouttes d'eau sur une interface air-eau vibrante (Couder *et al.*, 2005). Différentes hypothèses sur ce comportement peuvent être avancées :

- Les ondes acoustiques pourraient être à l'origine de vibration de la lame de verre au fond du puits comme dans le cas des gouttes d'eau qui rebondissent sur un lit fluide vibrant. Cependant, les temps caractéristiques des sauts et de l'excitation acoustique sont différents ($t_{saut} \sim s$ alors $t_{acoustique} \sim \mu s$).
- Les oscillations de surface de la bulle ou alors l'écoulement hydrodynamique au fond du puits

pourraient être impliqués dans le détachement de la bulle, mais pourquoi celle-ci réadhère t-elle au fond du puits ?

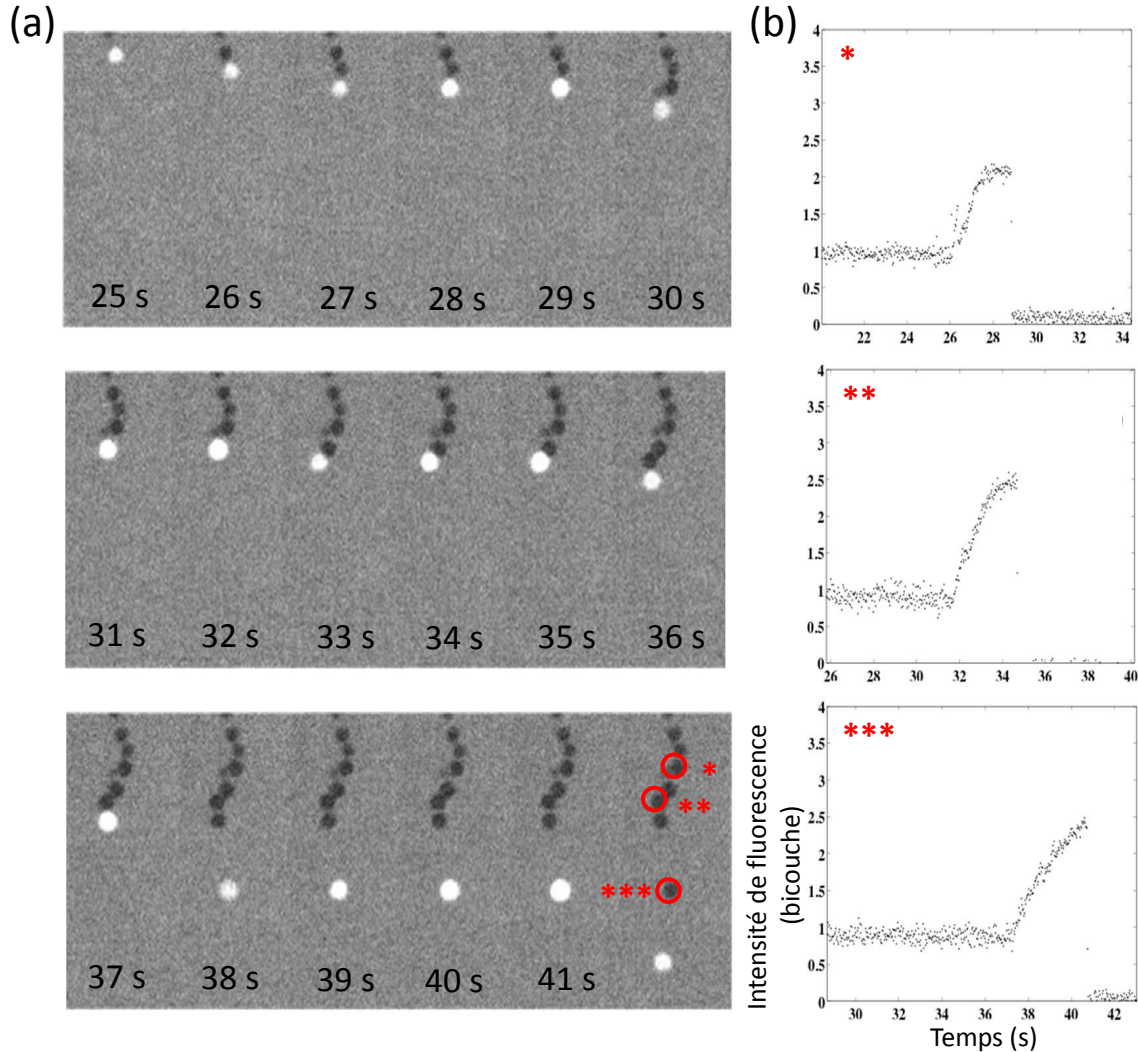


FIGURE 4.11 – Série d’images présentant le déplacement d’une bulle qui saute : a/ observations réalisées avec l’objectif 10x, le diamètre de la bulle est $12 \mu\text{m}$ et b/ l’augmentation de l’intensité de fluorescence sur la surface de la bulle normalisée par l’intensité d’une bicouche intacte est représentée pour 3 positions repérées en a/.

Afin de déterminer les mécanisme impliqués dans ces rebonds de bulles sur la membrane, des observations du phénomène à meilleure résolution spatiale sont nécessaires.

Zoom sur une bulle sauteuse

Lorsque le déplacement de la bulle est observé avec une meilleure résolution spatiale (objectif 40x, 18 images/s), la surfluorescence macroscopique observée sur la Figure 4.11 présente une intensité de fluorescence hétérogène liée à des structures internes au sein de la bulle (Figure 4.12). Moins d’une demi-seconde après contact de la bulle sur la membrane, ces structures apparaissent puis grossissent avant de se regrouper pour former une grande poche dans (sous ?) la bulle d’air. Lorsque cette poche

atteint approximativement le diamètre de contact bulle-bicouche, la bulle se détache et saute à une autre position. L'ensemble de ce processus dure entre 1 et 3 secondes suivant la bulle.

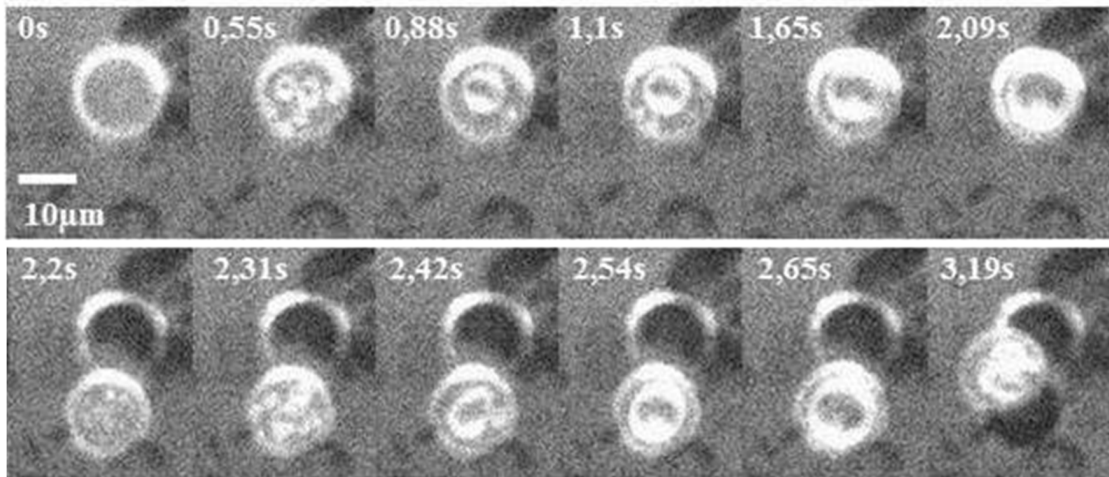


FIGURE 4.12 – Série d'images présentant le déplacement d'une bulle qui saute : observations réalisées avec l'objectif 40x, le diamètre de la bulle est 12 μm .

Composition de ces structures internes

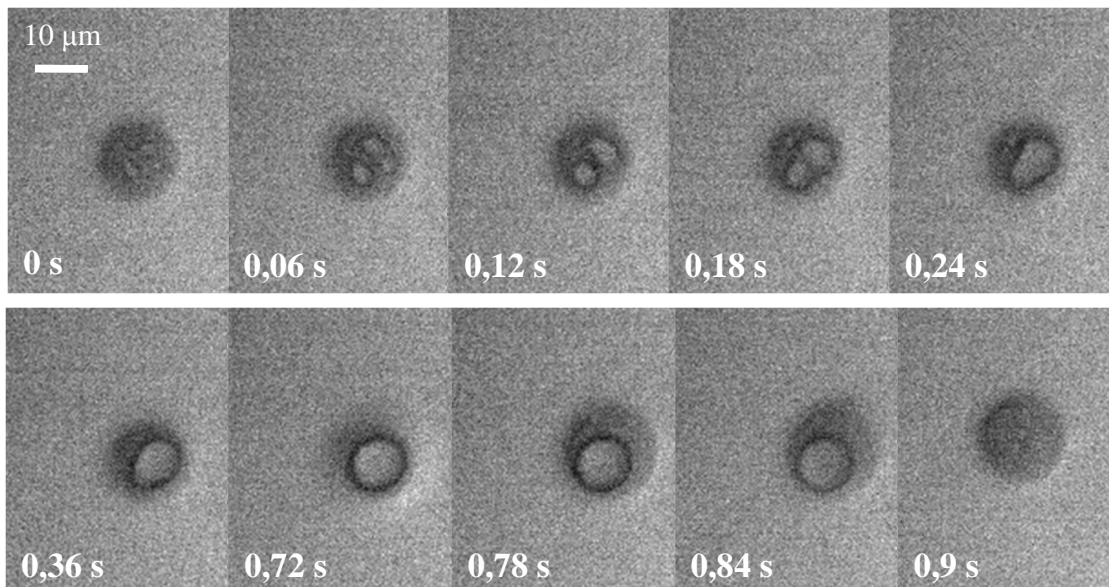


FIGURE 4.13 – Série d'images présentant le déplacement d'une bulle qui saute avec ajout de SulfoRhodamine dans le milieu : observations réalisées avec l'objectif 40x, le diamètre de la bulle est 14 μm .

Afin de déterminer la nature (eau ou air) de ces structures internes dans/sous les bulles sauteuses, un fluorophore de SulfoRhodamine ($\lambda_{excitation} = 586 \text{ nm}$ et $\lambda_{émission} = 605 \text{ nm}$), différent de celui

utilisé pour colorer les lipides, est ajouté dans l'eau. L'observation des bulles sauteuses met en évidence que les poches observées sont constituées d'eau car apparaissant en surfluorescence par rapport au reste de la bulle (Figure 4.13). Le même phénomène de coalescence des petites poches en une plus grosse goutte suivi par le saut de la bulle à une autre position est observé.

Mécanismes du saut

1ère phase : de l'adhésion au détachement

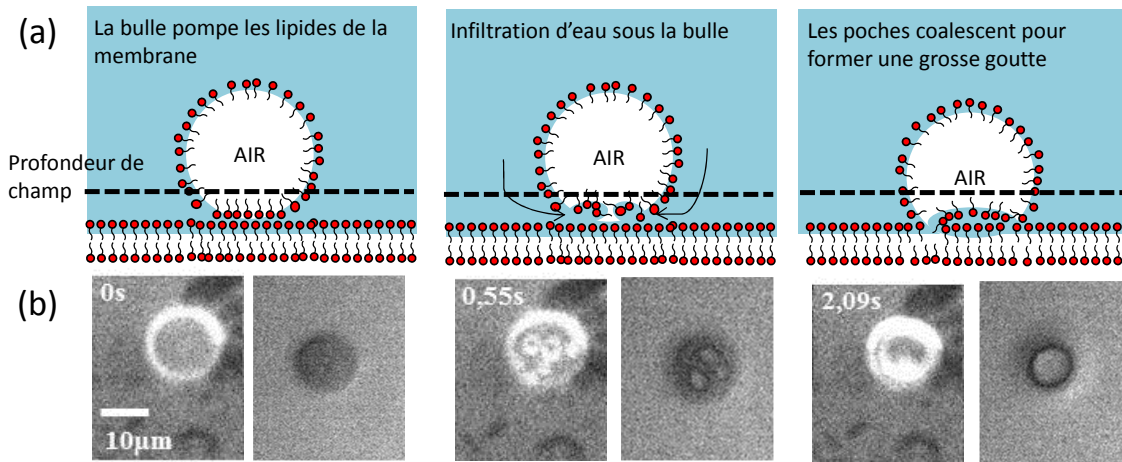


FIGURE 4.14 – Scénario de la configuration des lipides définie par les observations de l'intensité de fluorescence à l'objectif x40 (la ligne pointillée représente la profondeur de champ avec cet objectif) : a/ schémas de la disposition des lipides et b/ images de fluorescences correspondantes à ces dispositions de lipides pour le marquage des lipides (à gauche) et de l'eau (à droite).

Pour chaque étape du processus du saut de la bulle, l'intensité le long d'une ligne qui passe à travers la bulle est mesurée. Lorsque la bulle se pose sur la membrane, elle est immédiatement (en moins d'une image) couverte de lipides. Les lipides se concentrent sur la périphérie de la bulle et l'intensité de fluorescence y est 3 fois supérieure à celle de la membrane intacte. Au centre de la bulle, l'intensité y est 1,5 fois supérieure à celle de la membrane intacte. Après la fusion des gouttes d'eau, les mêmes caractéristiques sont observées. Les bords de la flaque d'eau présentent la même intensité de fluorescence que les bords de la bulle. Les schémas représentant ce scénario de la configuration des lipides est présenté sur la Figure 4.14.

Une bulle, en adhésion avec la membrane, sera stable sous l'effet de la force de Van der Waals, agissant entre les lipides de la bicouche et ceux recouvrant la bulle, force bien supérieure à celle d'Archimède. En effet, la force de Van der Waals s'écrit :

$$F_{VdW} = -\frac{AH}{6\pi} \frac{1}{d_{eau}^3} \quad (4.1)$$

où A désigne l'aire en vis à vis des lipides, H est la constante de Hamaker et $d_{eau} = 2.5$ nm est l'épaisseur d'eau d'équilibre entre les 2 feuilletts. Lorsque la bulle est posée, le paramètre A correspond à l'aire de la bulle en contact, soit l'aire d'un disque de rayon R_{bulle} (dans le cas d'une adhésion

hémisphérique). Pour une bulle de $5 \mu\text{m}$ de rayon, $F_{VDW} \sim 10^{-6} \text{ N}$. Par comparaison, la force d'Archimède vaut :

$$\vec{F}_a = V_{bulle}(\rho_{air} - \rho_{eau})\vec{g} \quad (4.2)$$

où $V_{bulle} = \frac{4}{3}\pi R_{bulle}^3$ désigne le volume de la bulle de rayon R_{bulle} , ρ_{air} et ρ_{eau} sont respectivement les densités de l'air et du liquide, g est l'accélération de la gravité. Pour la même bulle de $5 \mu\text{m}$ de rayon, $F_a \sim 10^{-12} \text{ N}$, et est donc bien inférieure à la force de Van der Waals : la bulle est stable sur la bicouche.

Sous l'action du champ acoustique, la bulle oscille radialement, résultant en une ligne de contact bicouche/eau/air dynamique qui excite naturellement les modes de surface de la bulle (Shklyaev et Straube, 2008; Fayzrakhmanova *et al.*, 2011; Prabowo et Ohl, 2011). L'excitation de ces modes de surface pourrait être à l'origine du phénomène de pompage des lipides, et le caractère dynamique de la ligne de contact à la périphérie de la bulle, couplée à une possible adhésion inhomogène des lipides, pourrait être responsable de l'infiltration de poches d'eau sous la bulle. Lorsque ces poches d'eau grossissent et coalescent, l'aire de contact A entre la bulle et la bicouche diminue et tend vers un anneau périphérique. En considérant que cet anneau soit de l'ordre de $0,1 \mu\text{m}$, la force de Van der Waals peut décroître jusqu'à $\sim 10^{-8} \text{ N}$.

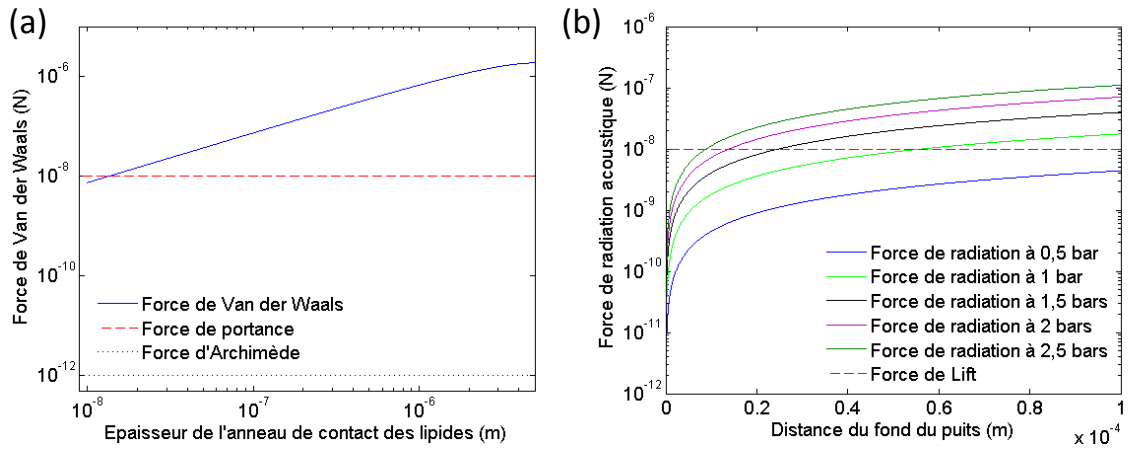


FIGURE 4.15 – a/ Évolution de la force de Van der Waals pour une bulle de $5 \mu\text{m}$ de rayon en fonction de la proportion de lipides en vis à vis (en fonction de l'épaisseur de l'anneau de lipides) ainsi que l'ordre de grandeur des forces d'Archimède et de portance (pour une bulle à $10 \mu\text{m}$ du fond du puits), et b/ Évolution de la force de radiation acoustique pour une bulle de même rayon en fonction de la pression acoustique et de la distance de la bulle à la paroi.

Pour détacher la bulle, une force opposée à la force d'adhésion doit exister et dépasser ces 10^{-8} N (tout en étant inférieure au 10^{-6} N lorsque $A = 4\pi R_{bulle}^2$). Une force de portance agissant sur la bulle et due aux écoulements au fond du puits pourrait contrebalancer la force de Van der Waals. La force de portance s'écrit :

$$\vec{F}_L = C_L \rho_{eau} V_{bulle} (\vec{U}_{eau} - \vec{U}_{bulle}) \wedge (\vec{\nabla} \wedge \vec{U}_{eau}) \quad (4.3)$$

où C_L est une constante qui vaut environ 0,65 dans nos conditions d'écoulement (Legendre *et al.*, 2008) et \vec{U}_{eau} et \vec{U}_{bulle} sont respectivement les vitesses du liquide et de la bulle. La bulle est considérée immobile donc $U_{bulle} = 0$. L'écoulement a été considéré comme un écoulement de cisaillement (dont la vitesse augmente de manière linéaire en fonction de la hauteur). Pour déterminer la vitesse de l'écoulement, des vidéos réalisées à la caméra rapide au fond du puits et en présence de microbilles ont été utilisées. Des vitesses du milieu jusqu'à une dizaine de cm/s ont été relevées, ce qui mène à F_L pouvant aller jusqu'à $\sim 10^{-8}$ N à environ 10 μm du fond du puits. La Figure 4.15a présente les forces de portance, d'Archimède et de Van der Waals lorsque l'aire d'adhésion (estimée en fonction de l'épaisseur de l'anneau périphérique de contact de la bulle) diminue. Il apparaît que l'extension des poches d'eau sur une aire proche de celle de l'aire initiale de contact de la bulle (Figures 4.12 et 4.13) peut être à l'origine du détachement de la bulle.

2ère phase : saut de la bulle

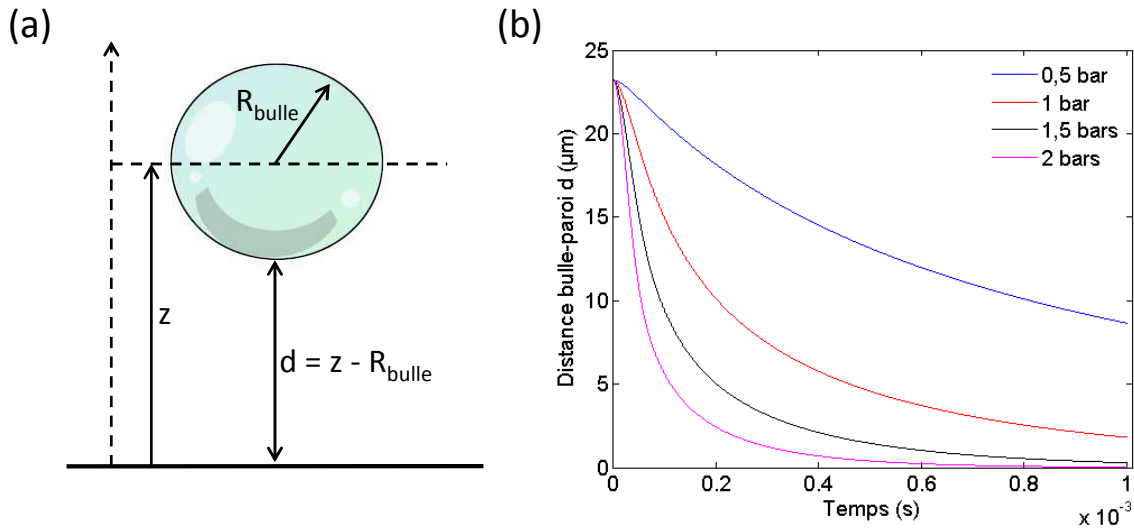


FIGURE 4.16 – Temps de descente d'une bulle soumise à la force de Bjerknes primaire et à une force de Reynolds : a/ schéma du paramètre de distance d et b/ distance de la bulle (rayon 6,8 μm) en fonction du temps pour différentes pressions acoustiques.

Lorsque la bulle commence à remonter, la force de radiation acoustique primaire, qui était nulle au fond du puits pour une bulle de rayon inférieur au rayon résonant, va pousser la bulle vers le fond du puits (vers le ventre de pression acoustique, position d'équilibre stable de la bulle). Cette force, moyennée sur une période acoustique, vaut (comme vu au chapitre 1) :

$$\langle F_{Bj} \rangle_T = \frac{-2\pi^2 P_a^2 \sin\left(\frac{4\pi z}{L}\right) R_{bulle}^3}{L\rho R_{bulle}^2 (\omega_{bulle}^2 - \omega^2)} \quad (4.4)$$

où P_a est la pression acoustique, $L = 4\text{mm}$ la hauteur d'eau, R_{bulle} le rayon de la bulle, $\omega_{bulle}^2 = \frac{3kP_{stat}}{\rho R_{bulle}^2}$ (où k est l'exposant polytropique et P_{stat} la pression hydrostatique) et $\omega = 2\pi f_{ac}$. Cette force pour une bulle de 5 μm de rayon en fonction de la pression acoustique et de la distance au fond du puits

est tracée sur la Figure 4.15b. Cette force pourrait contrebalancer la force de portance et permettre à la bulle de se rapprocher suffisamment de la bicouche pour que la force de Van der Waals stabilise la bulle au fond du puits. Des vidéos à la caméra ultra-rapide de bulles sauteuses ont montré que la durée du saut est de l'ordre de la milliseconde. Des simulations numériques d'une bulle soumise à la force de Bjerknes et à une force trainée de Reynolds (force prenant en compte la paroi et évitant l'interpénétration bulle-paroi) ont été réalisées afin de déterminer si le temps de descente d'une bulle soumise à ces forces est bien du même ordre de grandeur que le temps du saut d'une bulle. La force de Reynolds est définie par $F_R = -6\pi\mu R_{bulle}^2 \frac{\dot{z}}{z - R_{bulle}}$, où μ est la viscosité dynamique du liquide, z la distance entre le centre de la bulle et la paroi et \dot{z} la vitesse d'approche de la bulle (Charlaix *et al.*, 2011). Des exemples du temps de descente d'une bulle de rayon $6,8 \mu\text{m}$ partant d'une hauteur de $30 \mu\text{m}$ et pour différentes pressions acoustiques sont tracés sur la Figure 4.16. Pour des pressions acoustiques suffisantes, la bulle descend près du fond du puits sur un temps caractéristique d'une milliseconde.

Un résumé des forces s'appliquant sur la bulle lors du saut est présenté sur la Figure 4.17. L'ensemble du scénario proposé, par l'intermédiaire de la compétition entre les forces de Van der Waals, de portance et acoustique, permet bien de retrouver la physique du phénomène.

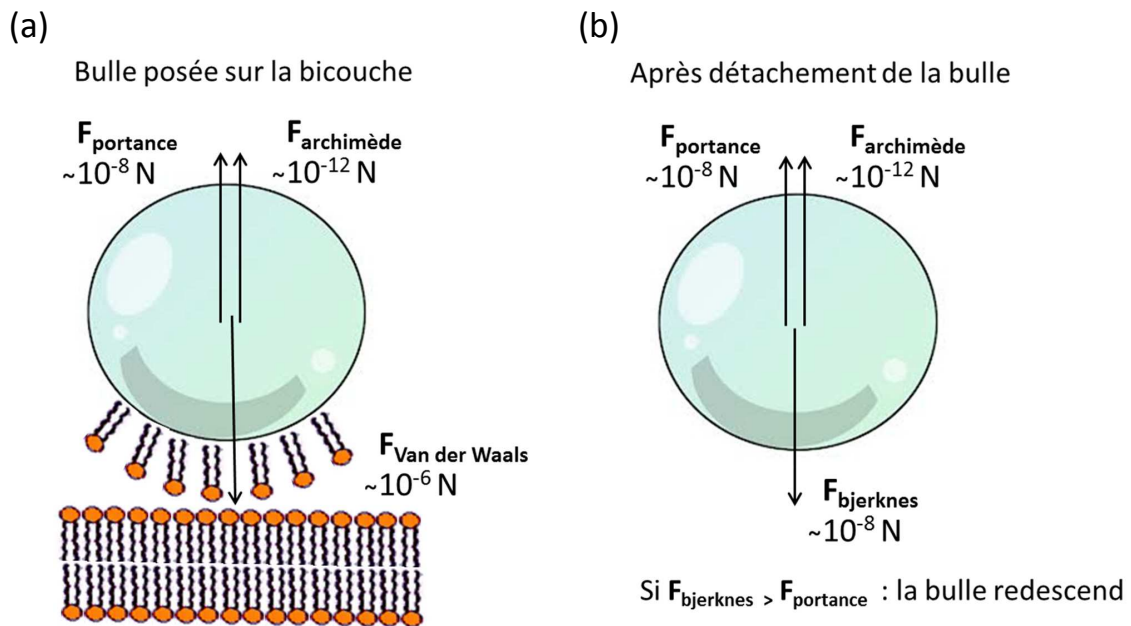


FIGURE 4.17 – Résumé des forces s'appliquant sur la bulle lors du saut de la bulle.

4.2.5 Cartographie des interactions bulles-membranes

Les observations précédentes, que ce soit sur les fissures ou les impacts, mettent en avant une grande zoologie de type de dégâts. La bicouche lipidique se révèle un bon marqueur des interactions bulles-membrane. Dans le chapitre précédent, une dépendance spatiale de la sonoporation des cellules liée au champ de pression acoustique a été mise en avant. Afin de déterminer s'il existe une dépendance spatiale des dégâts, des cartographies du puits complet sont réalisées.

Une cartographie d'état de la membrane, avant et après insonification, est réalisée par "scanning" d'images élémentaires (de dimension $1,4 \times 1,7 \text{ mm}^2$ avec l'objectif $\times 10$) avec un recouvrement de 50%. Pour observer des états intermédiaires de dégâts durant le tir, des cartographies sont réalisées aux temps 0, 30 et 60 secondes pour une même membrane insonifiée. Les excitations acoustiques sont des tirs continus à CI consigne fixé (CI 16, 20 et 24) pendant 30 secondes. Des exemples de cartographies réalisées sont présentés sur la Figure 4.18.

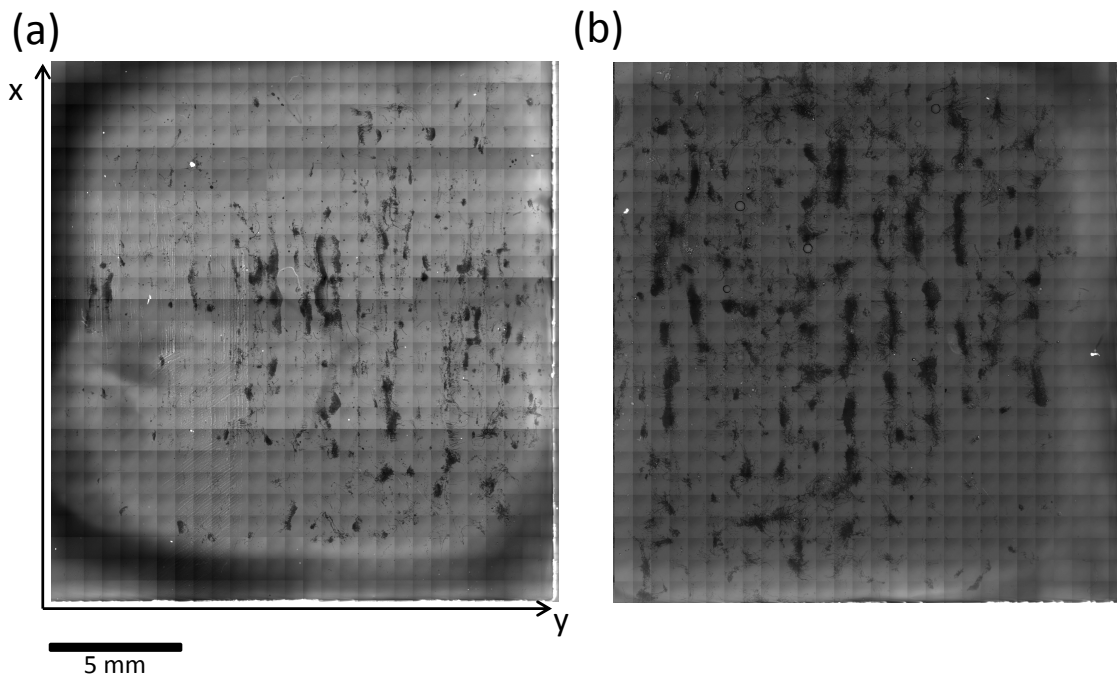


FIGURE 4.18 – Exemple de cartographies obtenus après excitation acoustique continue à CI 20 pendant 60 secondes (a/) et CI 24 pendant 30 secondes (b/). La bicouche de lipides est en gris clair et les zones de dégâts en noir.

Le pourcentage de dégâts des différents cartographies (mesuré sur le quart central du puits) est présenté sur la Figure 4.19c. Il apparaît que les membranes insonifiées à CI 24 présentent plus de dommages qu'aux autres CI et que les seconds tirs continuent à générer des dommages sur la membrane.

Un caractère spatial le long de y étant clairement observé sur ces images, les intensités de fluorescence sont sommées pour tous les x et cette intensité est comparée au champ de pression acoustique mesuré suivant y (x au milieu du puits et z à 0.5 mm du fond du puits) (Figure 4.19a). Les zones de dégâts où les lipides ont été arrachés présentent une intensité plus faible. Ces zones endommagées sont présentes aux ventres et nœuds de pression acoustique mais également entre ces positions. La périodicité spatiale des dégâts a été déterminée par transformée de Fourier de l'intensité moyennée sur une ligne. Des raies spectrales apparaissent pour les périodicités $\lambda/4$ (dommages aux nœuds et aux ventres de pression) et $\lambda/8$. Le pic de période spatiale $\lambda/8$ apparaît sur les spectres de toutes les conditions et son amplitude ne semble pas particulièrement liée ni au CI ni à la durée

d'insonification. Il est à noter que le second tir continue principalement à augmenter les dégâts dans les mêmes zones que le premier tir.

Les observations des images obtenues pour les cartographies montrent des patterns pouvant être à l'origine des observations de la période spatiale $\lambda/8$ (Figure 4.20). Sur ces images, entre deux zones fortement endommagées sont observées des zones de dégâts moins accentués. Ceux-ci pourraient être dus à des bulles qui sont attirées d'une position d'équilibre stable ou instable à une autre, et à leur passage rapide au dessus de la membrane qui pourrait être à l'origine de fissures (comme celles laissées par les bulles fusées).

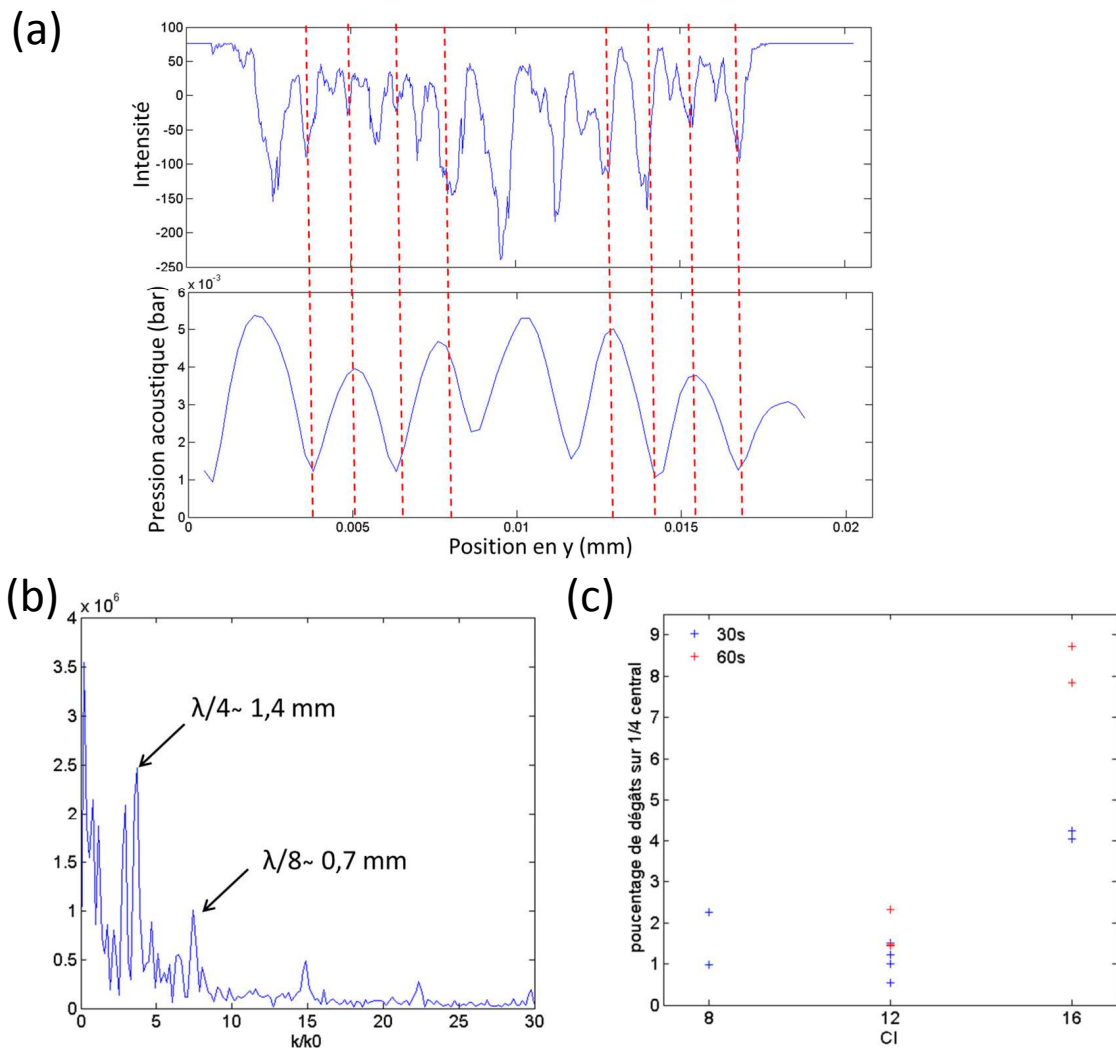


FIGURE 4.19 – Traitement des résultats des cartographies (exemple d'une excitation CI 24 de 30 secondes) : a/ somme sur x (direction orthogonale à l'axe acoustique) des intensités de fluorescence des cartographies après insonification, ainsi que la pression acoustique mesurée suivant y (x au milieu du puits et z à 0.5 mm du fond du puits), b/ transformée de Fourier de cette somme des intensités et c/ pourcentage de dégâts pour les différentes conditions de CI et de temps d'insonification.

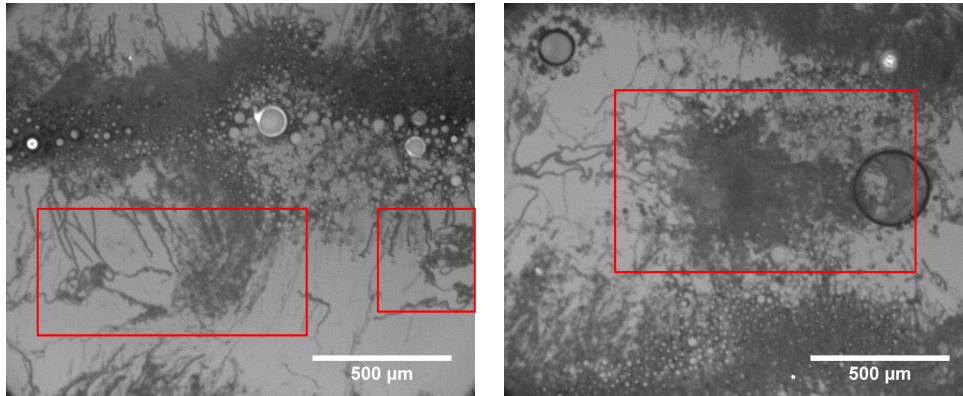


FIGURE 4.20 – Images montrant des zones endommagées pouvant correspondre à la période spatiale $\lambda/8$.

4.3 Cellules

Dans cette partie, des expériences de sonoporation sont réalisées sous microscope sur deux problématiques principales : le détachement des cellules, observé lors des expériences de sonoporation présentées dans le chapitre 3, et la sonoporation. Afin de mieux comprendre quel est le mécanisme impliqué dans le détachement des cellules, des images avant et après insonification sont réalisées sous microscope (qui permet d'avoir une image du puits entier) puis sous microscope. En ce qui concerne la sonoporation, des insonifications sous microscope sont réalisées afin de répondre à plusieurs questions : peut-on observer des cellules sonoporées et existe-t-il des localisations particulières à ces cellules sonoporées ? où sont les bulles de cavitation ?

4.3.1 Paramètres des observations

Dans cette partie les observations de détachement de cellules ont été réalisées sous microscope (MacroFluo, Leica) (1 pixel=40,60 μm) et sous microscope (Eclipse TE2000E, Nikon) (objectif 10x, 1 pixel=0.658 μm). Les observations de sonoporation ont été réalisées sous microscope confocal (Confocal Laser Scanning Microscopy 780, Zeiss) (objectif 10x et 20x, 1 pixel=0.658 μm et 1 pixel=0.329 μm) et sous microscope (Eclipse TE2000E, Nikon) (objectif 10x, 1 pixel=0.658 μm) pour les cartographies.

Les fluorochromes utilisés sont :

- AlexaFluo 488 attaché au siRNA ou au dextran (marqueur de la sonoporation), $\lambda_{excitation} = 488 \text{ nm}$ et $\lambda_{émission} = 530 \text{ nm}$, concentration=400 nM, Qiagen et Invitrogen
- Vybrant DID (marqueur du cytoplasme de la cellule), $\lambda_{excitation} = 586 \text{ nm}$ et $\lambda_{émission} = 605 \text{ nm}$, concentration=5 μM , Sigma
- DAPI (marqueur de la mortalité cellulaire), $\lambda_{excitation} = 340 \text{ nm}$ et $\lambda_{émission} = 488 \text{ nm}$, concentration=2 μM , Sigma.
- cellROX (marqueur des dérivés réactifs de l'oxygène dont les radicaux hydroxyde qui peuvent être utilisés comme marqueurs de la cavitation inertielle), $\lambda_{excitation} = 586 \text{ nm}$ et $\lambda_{émission} = 605 \text{ nm}$,

concentration=100 nM, Invitrogen.

Sauf indication contraire, les excitations acoustiques utilisées pour les insonifications de cellules sont des signaux pulsés de rapport cyclique 0,2 et de durée de cycle de 250 ms.

Protocole d'ensemencement et de marquage des cellules

Les cellules (HT-29) sont ensemencées 24h avant l'expérience comme pour les expériences de sonoporation présentées dans le chapitre 3.

Les cellules sont colorées à l'éosine afin d'augmenter le contraste pour les observations au microscope du détachement cellulaire. Pour cela, le milieu cellulaire est retiré avant d'ajouter de l'éosine, puis les cellules sont rincées et du milieu cellulaire RPMI est ajouté. Ceci est réalisé juste avant insonification.

La coloration du cytoplasme des cellules en rouge à l'aide de Vybrant DID est réalisée sur le tapis cellulaire quelques heures avant insonification. Pour cette coloration, 5 μL de solution pour 10^6 cellules sont ajoutés sur le tapis cellulaire à 1 mL de milieu de culture sans rouge de phénol¹ avant incubation pendant 20 minutes à 37 °C. Le milieu est ensuite retiré et 1 mL de milieu de culture frais est ajouté (rinçage) avant de remettre le puits à l'incubateur pendant 10 minutes. Ce rinçage est réalisé 3 fois.

De la même manière que lors des expériences de sonoporation présentées au chapitre 3, les molécules à internaliser et le marqueur de la cavitation inertielle sont ajoutés dans le milieu environ 10 minutes avant insonification (siRNA-AlexaFluor488 ou de dextran-AlexaFluor488 et cellROX). Dans le cas des expériences avec le dextran-AlexaFluor488, le milieu est rincé après insonification et du DAPI, marqueur de la mortalité cellulaire, est ajouté au milieu.

4.3.2 Le détachement cellulaire

Lors des expériences de sonoporation présentées au chapitre 3, il a été constaté du détachement cellulaire, dont il est important d'en déterminer la cause pour potentiellement diminuer les pertes de cellules et augmenter le taux de sonoporation.

Écoulement macroscopique ?

Une première hypothèse est que l'écoulement macroscopique pourrait être impliqué dans le détachement cellulaire. Afin de le déterminer, la contrainte de cisaillement générée par cet écoulement macroscopique est estimée. En partant d'un écoulement dont la vitesse est nulle au fond du puits comme présenté sur la Figure 4.21a, cette contrainte de cisaillement au fond du puits a été estimée comme étant $\tau = \mu V/h$, où μ est la viscosité dynamique du fluide, V est la vitesse du fluide le long de la paroi et h la distance à la paroi. Avec nos données, la contrainte de cisaillement induite par l'écoulement est inférieure à 5 dynes/cm² (soit 0,5 Pa). Selon les données de Peel et DiMilla (1999) (Figure 4.21b), qui montre la fraction de cellules toujours adhérentes après application d'une contrainte

1. Le rouge de phénol dans le milieu de culture cellulaire est un marqueur du pH et donc de la "santé" des cellules en culture (le milieu est naturellement rose, devient de plus en plus jaune à mesure que les cellules se multiplient tout en puisant leur besoin nutritif dans le milieu). Du milieu de culture sans rouge de phénol est utilisé pour ne pas avoir de signal de fluorescence parasite dans le même canal que le Vybrant DID.

durant 5 minutes, la contrainte de cisaillement nécessaire au détachement des cellules est supérieure à 50 dynes/cm^2 .

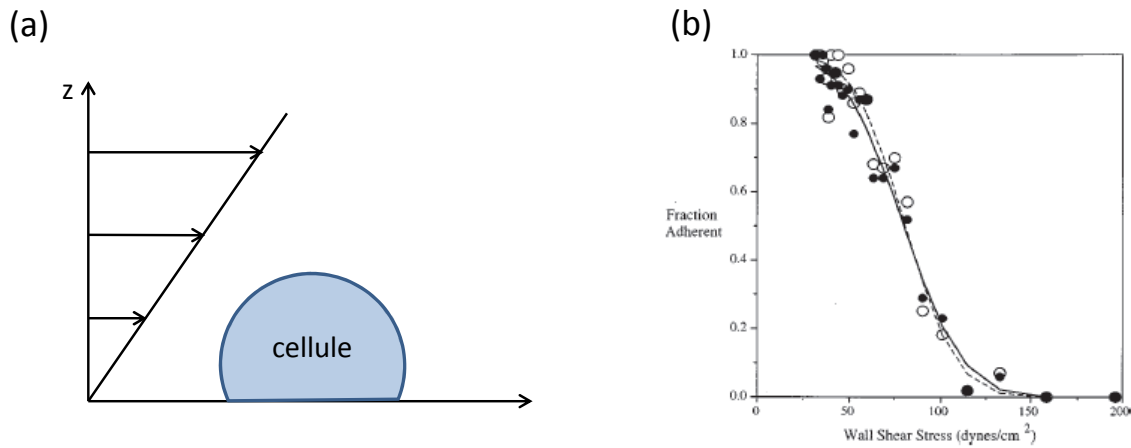


FIGURE 4.21 – a/ schéma de l'écoulement macroscopique au fond du puits pour l'estimation de la contrainte de cisaillement généré par cet écoulement au fond du puits et b/ la fraction de cellules toujours adhérentes en fonction de la contrainte de cisaillement au fond du puits pour une contrainte appliquée pendant 5 minutes (Peel et DiMilla, 1999).

La contrainte générée par l'écoulement semble donc trop faible pour être responsable (du moins seule) du détachement des cellules.

Présence des bulles de cavitation

Le détachement pourrait être causé par la présence de bulles de cavitation acoustique. En effet, Ohl et Wolfrum (2003), Ohl *et al.* (2006) et Dijkink *et al.* (2008) attribuent le détachement des cellules adhérentes aux jets formés par l'implosion non sphérique de bulles près d'une paroi qui génèrent une contrainte de cisaillement suffisante au détachement. Afin de savoir si le détachement des cellules, dans notre cas, peut être dû à la présence des bulles de cavitation, il est intéressant de vérifier si celui-ci a lieu en des positions particulières, comme sur les ventres (respectivement les nœuds) de pression acoustique, qui sont des positions d'équilibres stables pour les bulles de rayon inférieur (respectivement supérieur) au rayon résonant, et où pourrait avoir tendance à se concentrer les bulles. Pour cela, dans un premier temps, des observations sous microscope ont été réalisées, le microscope présentant l'avantage de fournir une image du puits complet en une seule image.

Afin d'augmenter le contraste, les cellules ont été colorées avec de l'éosine. Les excitations acoustiques sont des tirs pulsés de 60 secondes pour des CI consignés entre 24 et 32. Les tirs sont courts afin de ne pas trop détacher les cellules car si de trop grandes zones sont détachées il sera plus difficile de déterminer la position précise de cette zone. Un exemple de photos avant et après insonification est présenté sur la Figure 4.22a et b. Le pourcentage de détachement (Figure 4.22d) est plutôt variable à part pour la condition CI 21. Sur la photo après insonification, des zones détachées sont observées et semblent être sur des lignes à différentes positions de y .

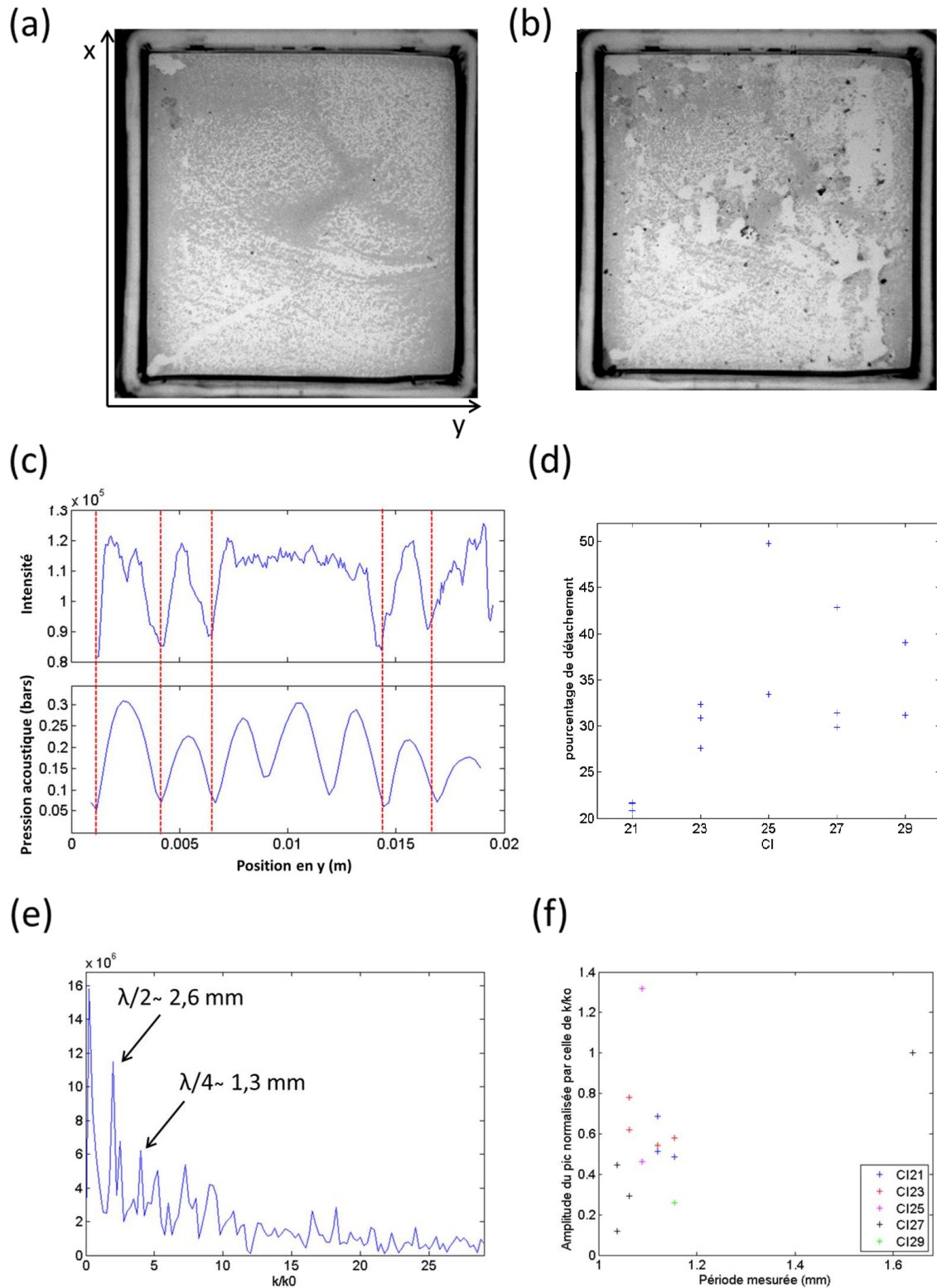


FIGURE 4.22 – Détachement des cellules après insonification : a/ et b/ photo du puits (avec cellules colorées à l'éosine) respectivement avant et après excitation acoustique de 60 secondes en pulsé à CI 27. c/ somme des intensités en x des images après insonification ainsi que la pression acoustique mesurée suivant y (x au milieu du puits et z à 0.5 mm du fond du puits), les zones de cellules détachées (minima d'intensités) correspondent aux nœuds de pression acoustique. d/ Pourcentage de détachement pour les différents CI. e/ Exemple de transformée de Fourier de l'intensité sur l'image sommée dans la direction x et f/ amplitudes des pics autour de $\lambda/4$ normalisées par celle de $\lambda/2$ pour les différentes conditions de CI.

Afin de vérifier si la position de ces zones de détachement est corrélée avec le champ de pression acoustique, l'intensité sur l'image après insonification a été sommée dans la direction x (après binarisation). Cette intensité en fonction de la position en y est présentée Figure 4.22c avec la pression acoustique mesurée le long de y (x au milieu du puits et z à 0.5 mm du fond du puits). Les zones de détachement présentent une intensité plus faible que le reste du puits. Il semble que les zones détachées apparaissent plutôt aux nœuds de pression acoustique. Cependant, il y a présence sur cette courbe d'intensité de minima d'intensité autour de 2.4 et 17 mm qui eux seraient corrélés à des ventres de pression acoustique. La période spatiale des zones de détachement a été déterminée plus finement en traçant la transformée de Fourier de l'intensité le long de y et il en ressort que celle-ci est principalement de l'ordre de $\lambda/2$ (sur tous les nœuds de pression acoustique) mais qu'il y a une composante en $\lambda/4$ (soit sur les ventres et nœuds de pression). Cette dernière correspond aux observations de minimas locaux sur les ventres de pression acoustique. En reportant pour tous les puits, l'amplitude des raies spectrales en $\lambda/4$ normalisée par l'amplitude de la raie à $\lambda/2$ (Figure 4.22 f), leur niveau relativement faible (inférieure à 1 après normalisation) confirme que le détachement a principalement lieu autour des nœuds de pression acoustique. Les positions des lignes de détachement semblent principalement liées au nœuds de pression acoustique et apparaissent donc à des positions d'équilibre stables pour les grosses bulles (bulles de rayon supérieur au rayon résonant). Ce lien entre les zones de détachement et le champ acoustique met en évidence l'implication, dans le processus de détachement des cellules, des bulles de cavitation acoustique.

Afin d'avoir une résolution spatiale plus fine et d'investiguer les effets d'une insonification plus longue, des cartographies sont réalisés sous microscope. Des lignes de détachement ayant été observées à différentes positions de y , les cartographies sont réalisés selon la longueur du puits dans la direction y (soit environ 20 mm) et seulement un quart du puits dans la direction x (soit environ 5 mm). Ces cartographies ont été effectuées avec l'objectif 10x et avec un recouvrement de 50 %. Les excitations acoustiques sont des tirs pulsés avec comme conditions les couples (CI consignes, temps d'exposition) suivant : (24, 5), (28, 5) et (30,1), ce dernier cas ayant un temps d'exposition plus court afin de limiter le détachement cellulaire. Pour chaque condition, les mesures ont été réalisées au moins 4 fois. Un exemple de cartographie obtenue après insonification est présenté sur la Figure 4.23a avec les zones de détachement entourées en rouge. Le pourcentage de détachement en fonction des conditions est tracé sur la Figure 4.23c. Lorsqu'il y a excitation acoustique, il y a plus de détachement que pour les puits témoins. Pour les tirs de durée équivalente, il y a plus de détachement lorsque le CI augmente (pour les CI 24 et 28). Il y a presque autant de détachement à CI 30 qu'à CI 28 alors que le tir ne dure qu'une minute. Ceci suggère soit qu'il y aurait eu beaucoup plus de détachement pour un tir de 5 minutes à CI 30 ou bien qu'une bonne partie du détachement apparait dans la première minute. En traitant les images comme pour celles obtenues au microscope, l'intensité sommée en x peut être comparée à la pression acoustique mesurée (Figure 4.23b). Il apparait que les zones de détachement semblent corrélées à la fois aux ventres et aux nœuds de pression acoustique. Pour cet exemple, la transformée de Fourier de l'intensité est présentée sur la Figure 4.23d. Des pics pour des périodes spatiales de détachement sont relevés à $\lambda/2$ et $\lambda/4$ (surtout à $\lambda/4$ pour cet exemple).

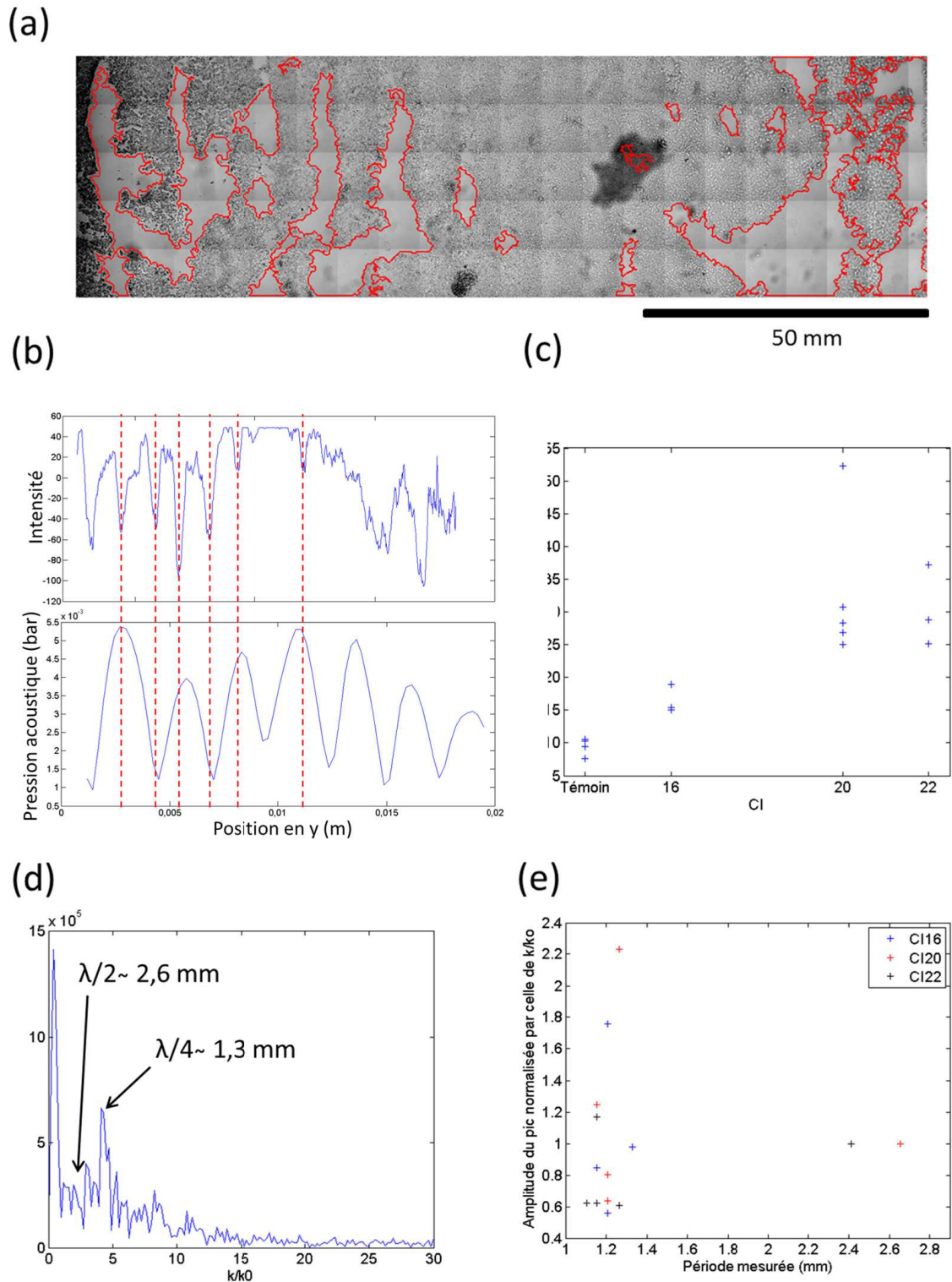


FIGURE 4.23 – Détachement des cellules au microscope : a/ exemple de cartographie obtenue après insonification pulsée de CI 28 pendant 5 minutes, les zones de détachement sont entourées en rouge, b/ somme des intensités en x sur l'image de a/ en fonction de y et comparée à la pression acoustique mesurée suivant y (x au milieu du puits et z à 0.5 mm du fond du puits), les zones de cellules détachées (minima d'intensité) correspondent aux nœuds et ventres de pression acoustique. c/ pourcentage de détachement sur les cartographies pour les différentes conditions de CI, d/ Transformée de Fourier de l'intensité de b/ et e/ amplitudes des pics autour de $\lambda/4$ normalisée par celles de $\lambda/2$ pour les différentes conditions de CI.

Les amplitudes spectrales pour les périodes autour de $\lambda/2$ et $\lambda/4$ normalisées par l'amplitude du pic à $\lambda/2$ sont présentées pour les différentes conditions de CI sur la Figure 4.23e. L'amplitude normalisée de la raie spectrale à $\lambda/4$ apparaît bien plus importante que pour les mesures réalisées au microscope. Une hypothèse pour expliquer ces résultats est que pour des tirs plus courts, les zones de détachement commencent à apparaître plutôt aux positions des nœuds de pression acoustique mais que pour des tirs plus longs, le détachement peut également apparaître de manière marquée aux positions des ventres de pression acoustique. Il est à noter que comme il y a génération de cavitation inertielle dans le puits, il n'est pas possible de se référer uniquement aux positions d'équilibres linéaires stables des bulles. Si le détachement apparaît aux nœuds, il pourrait être causé par des grosses bulles en translation qui "raclent" le fond du puits en détachant les cellules (ce qui pourrait expliquer les lignes de détachement). Cependant, puisque le détachement apparaît également aux ventres de pression acoustique, cela mettrait en cause également les bulles en dessous du rayon résonant qui imploseraient près du fond, et générant des jets qui pourraient détacher les cellules comme observé par Ohl et Wolfrum (2003), Ohl *et al.* (2006) et Dijkink *et al.* (2008).

4.3.3 Sonoporation

Diverses questions se posent pour l'étude de la sonoporation sous microscope : est-on capable d'observer des cellules sonoporées et y a-t-il des positions particulières où vont les molécules à internaliser ? Y a-t-il des zones particulières de sonoporation ? Peut-on observer des bulles de cavitation impliquées dans la sonoporation ?

Observations au microscope

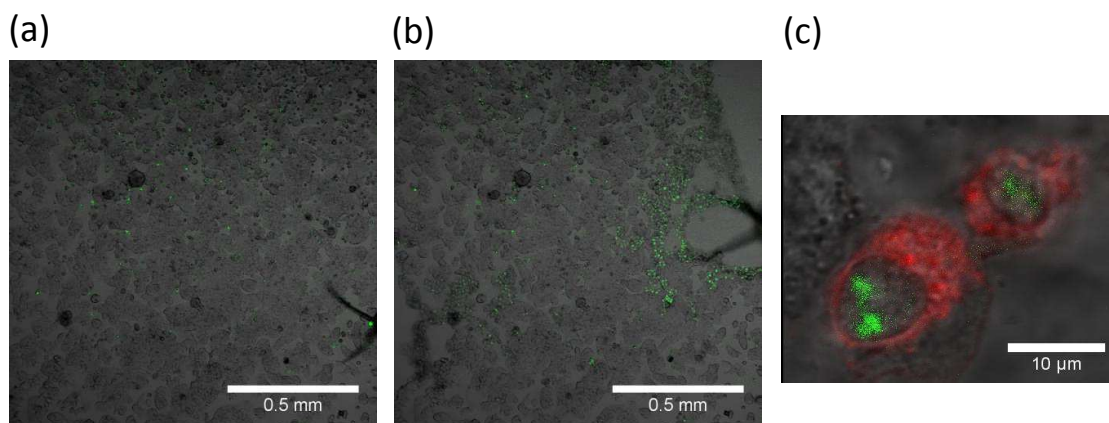


FIGURE 4.24 – Sonoporation des cellules HT-29 avec du siRNA-AlexaFluor 488 : a/ et b/ images des cellules et du siRNA-AlexaFluor 488 (en vert) respectivement avant et après excitation acoustique (CI consigne 24 pendant 2 minutes) : après tir, les molécules sont regroupées près de la zone de détachement. c/ deux cellules sonoporées (le cytoplasme des cellules est coloré au Vybrant DID et apparaît en rouge, les molécules (en vert) sont présentes dans les cellules et même dans le noyau des cellules.

Les expériences sont faites sous microscope confocal. En effet, le microscope confocal permet des

observations pour des épaisseurs très faibles. Dans notre cas, ce n'est pas l'épaisseur faible mais le contrôle de cette épaisseur qui est intéressant. En effet, cette épaisseur est définie à $10\ \mu\text{m}$ afin d'avoir une vision de toute l'épaisseur de la cellule, sans milieu cellulaire au dessus, pour vérifier que les molécules sont bien internalisées.

Une première expérience de sonoporation sous microscope a été réalisée avec du siRNA comme molécule à internaliser. Des photos avant et après excitation acoustique (CI consignes de 24, 26, 28 et 30 pour des tirs en excitation continu de 2 minutes) montrent que le siRNA-AlexaFluor 488 (initialement distribué de manière homogène) se retrouve regroupé autour de la zone de détachement (Figures 4.24a et b). Ceci suggère qu'autour des zones de détachement se trouvent des zones de sonoporation potentielle. Des cellules sonoporées ont été observées dans cette zone comme présenté sur la Figure 4.24c. Afin de vérifier que les molécules ne se trouvent pas au dessus de la cellule, un balayage en z a été réalisé : les molécules (en vert) sont présentes dans la cellule et même dans le noyau de la cellule.

La même expérience a été réalisée avec du dextran-AlexaFluor 488 en prenant en compte de plus grandes zones d'observation après excitation acoustique, afin de vérifier la concordance zone de sonoporation/ détachement. La figure 4.25 est une photo obtenue après excitation ultrasonore de CI 32 pendant 5 minutes en excitation pulsée. On peut y voir le tapis cellulaire en rouge, avec des zones de détachement en noir. Principalement à la périphérie des zones de détachement, des cellules fortement sonoporées (en vert) sont présentes ainsi que des cellules mourante (en bleu). Dans cette expérience, le milieu a été rincé et les zones avec présence d'AlexaFluor 488 sont des zones où les cellules ont été sonoporées.

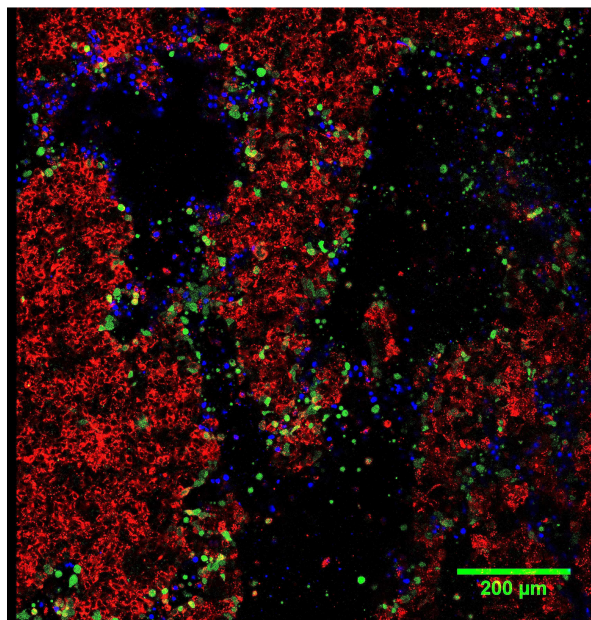


FIGURE 4.25 – Photos de cellules sous microscope après insonification : en rouge (le cytoplasme des cellules colorés au Vybrant DID), en vert les cellules sonoporées (dextran-AlexaFluor 488) et en bleu les cellules mortes (marquées au DAPI).

Ces observations semblent en accord avec celles de Ohl et Wolfrum (2003) et Ohl *et al.* (2006) qui

remarquent que les cellules près de l'aire de détachement (causées, selon eux, par les microjets d'une bulle oscillante/implosante près d'une paroi) sont porées de manière permanente (poration irréversible, mort assurée) alors que celles situées plus loin peuvent être porées de manière réversible. De même, d'après Zhang *et al.* (2012), seules les cellules près des zones de détachement sont sonoporées.

Si les cellules sonoporées se trouvent près des zones de détachement, on peut se demander où sont les bulles de cavitation. Des observations annexes en excitations continues ont permis de montrer que les bulles de cavitation sont présentes autour des zones de détachement (Figure 4.26). Les bulles près de la zone détachée ont un diamètre de 10 à 25 μm . Ceci pourrait suggérer que le détachement est dû à ces bulles ainsi que la sonoporation observée près des zones de détachement. On peut donc se demander si ces bulles de cavitation sont impliquées dans le détachement des cellules, la sonoporation dans ces zones ou bien les deux ?

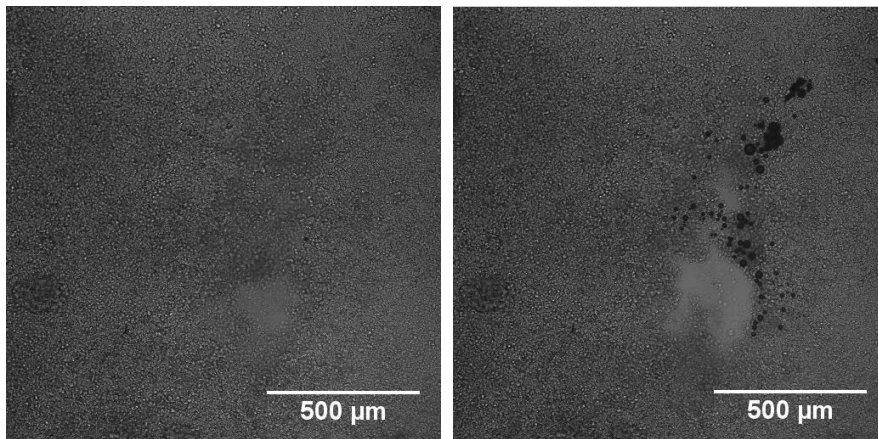
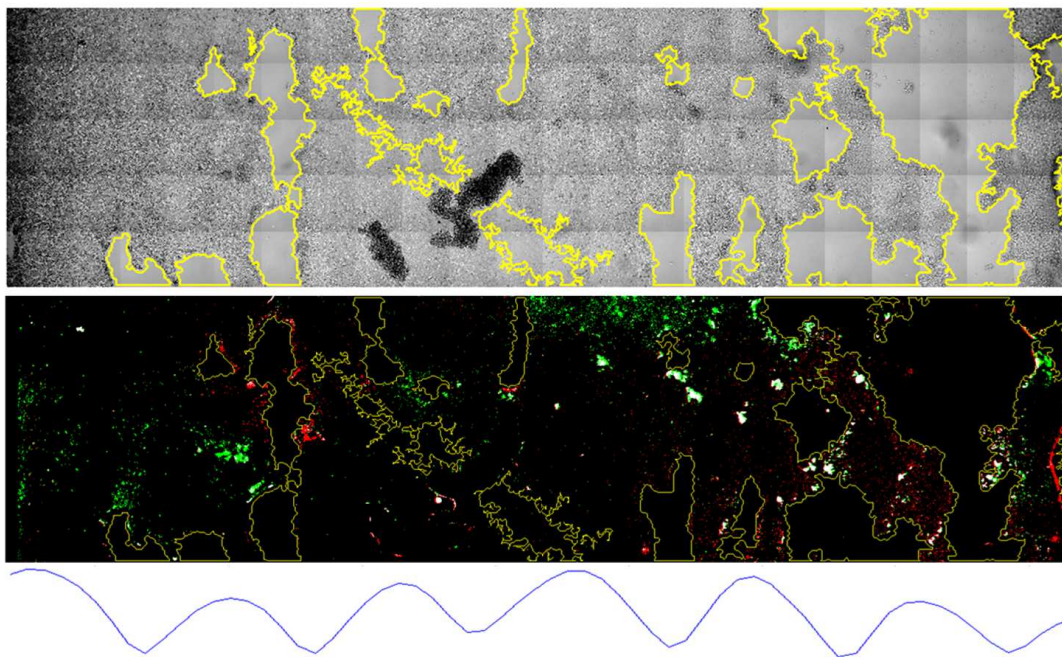


FIGURE 4.26 – Photos de cellules sous microscope avant (à gauche) et après (à droite) insonification en lumière naturelle : on voit des bulles de cavitation qui se sont placées sur le bord de la zone détachée pour une excitation pulsée à CI 28 de 5 minutes.

Cartographies des cellules après insonification

Afin de déterminer de manière plus globale où se trouvent les zones de cellules sonoporées et de les comparer aux zones où il y a eu de la cavitation inertielle, des cartographies au 10x avec 50 % de recouvrement ont été réalisées après insonification. Ces cartographies ont été réalisées pour des excitations acoustiques pulsées de CI 24 et 28 pendant 5 minutes et CI 30 pendant 1 minute. Les cartographies ont été réalisées successivement pour l'image en lumière naturelle, celle en fluorescence de l'AlexaFluor 488 et enfin celle du cellROX. Pour chaque cartographie, la mise au point a été réalisée à peu près au milieu de la zone à cartographier (cependant les puits n'étant pas parfaitement plans il peut y avoir des zones qui sont plus ou moins hors focus). Deux exemples de cartographies obtenues après insonification à CI 28 pendant 5 minutes sont présentés sur les Figures 4.27a et b.

(a)



(b)

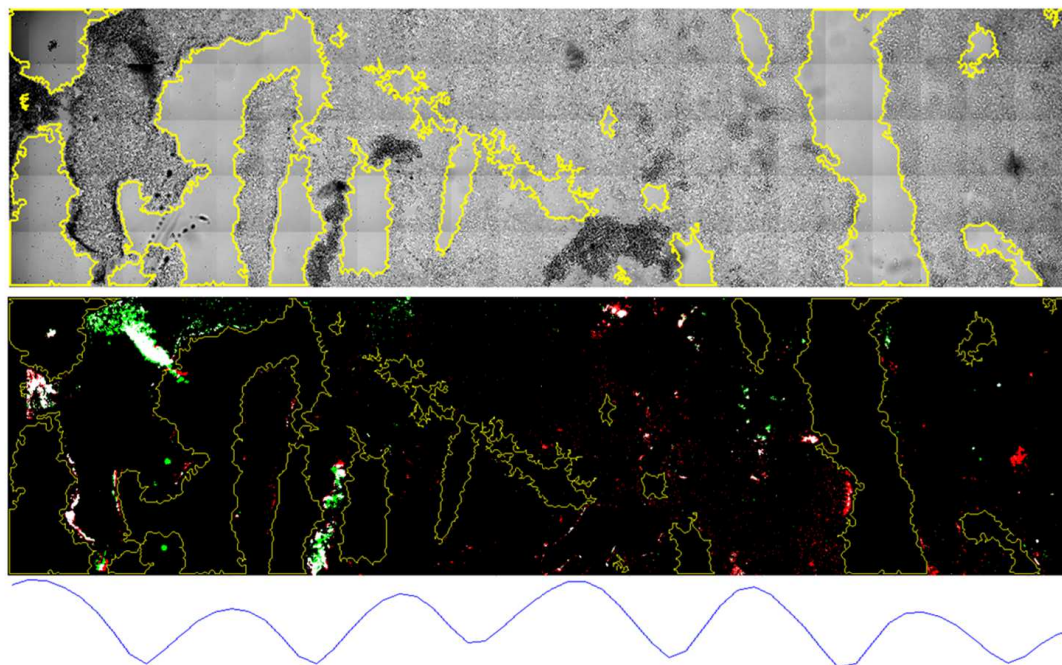


FIGURE 4.27 – Deux exemples de cartographies de cellules après insonification à CI 28 pendant 5 minutes : pour chaque exemple (a et b), en haut est tracé la cartographie en lumière naturelle avec en jaune les zones détachées, au milieu la même cartographie avec en rouge les zones de cellROX, en vert les zones d’AlexaFluor 488, en blanc les zones marquées par les deux et en jaune les zones de détachement. En bas est représentée la pression acoustique mesurée le long de y (x au milieu du puits et z à 0.5 mm du fond du puits).

Pour chaque exemple sont tracés, en haut, la cartographie en lumière naturelle où les zones détachées sont entourées en jaune ; au milieu, la cartographie présentant le marquage de la cavitation inertielle seule (en rouge), de la sonoporation seule (en vert) et de la cavitation inertielle et sonoporation (en blanc), avec en jaune le contour des zones de cellules détachées. Finalement, sous chaque figure est tracée pour comparaison la pression acoustique mesurée le long de y (x au milieu du puits et z à 0.5 mm du fond du puits).

Tout d'abord, il est à noter qu'il y a très peu de zones sonoporées (vertes) où il n'y a pas eu de cavitation inertielle (rouge). Les points vert isolés en haut de la Figure 4.27a sont des artéfacts de mesures dus à une surfluorescence de cette zone sur la cartographie de l'AlexaFluor 488 qui est peut-être dû au fait que la mise au point de cette zone est meilleure. Ceci confirme que la cavitation inertielle est bien un élément clé dans la processus de sonoporation cellulaire. On remarque quelques zones de cavitation inertielle (rouge) où il n'y a pas eu de sonoporation (vert).

Ces cartographies montrent la présence de zones de sonoporation autour des zones de détachement, ce qui est en accord avec nos précédentes observations et celles de Ohl et Wolfrum (2003), mais également dans des zones où les cellules sont toujours adhérentes. Les positions de ces dernières sont liées aux nœuds et ventres du champ de pression acoustique et correspondent certainement à des zones qui n'ont pas encore été détachées. Ceci met en avant la colocalisation des zones de détachement et de sonoporation, limitant les taux de sonoporation pouvant être obtenus. Afin de sonoporer de manière plus efficace, il faudrait donc limiter le détachement cellulaire. Pour cela, les cartographies de dégâts générés par les bulles de cavitation sur bicouches lipidiques pourraient être exploitées. En effet, tout d'abord, il y a des dégâts sur les bicouches entre les nœuds et ventres de pression acoustique qui pourraient résulter de bulles attirées par ces positions d'équilibres stables et instables. Du détachement cellulaire et de la sonoporation n'ont pas été retrouvés pour ces positions intermédiaires, ce qui pourrait signifier que ce type d'interactions bulles-membrane ne génère ni détachement ni sonoporation. Il faudrait donc pouvoir dissocier les types de dégâts et donc les comportements de bulles liés au détachement de ceux liés à la sonoporation, et ceci, dans le but à terme de pouvoir contrôler la génération de ce(s) type(s) d'interaction(s) bulles-membrane afin de mieux contrôler la sonoporation cellulaire.

4.4 Conclusion

Les observations sous microscope des interactions entre les bulles de cavitation et une membrane bicouche de lipides ont mis en avant différents types de dommages laissés sur la membrane par les bulles : des fissures et des impacts. Les fissures observées sont pour certaines permanentes alors que d'autres se referment en quelques secondes. Ces dernières semblent particulièrement intéressantes par analogie aux cellules porées dont les pores se referment. Le grand nombre de paramètres en jeu et leur variabilité n'a pas permis de mettre en avant une corrélation entre le temps de recouvrement de la fissure et sa largeur ou sa profondeur. Ces fissures pourraient être causées par le passage au dessus de la membrane de "bulles fusées" dont la vitesse est de quelques dizaines de mm/s. Les impacts, quant à eux, sont pour certains laissés par des bulles qui sautent sur la membrane alors que d'autres sont laissés par des bulles posées au fond du puits et qui semblent immobiles (à la vitesse

d'acquisition des images utilisées). Des cartographies du puits complets ont montrés que les dégâts sur la membrane apparaissent sur les nœuds et les ventres de pression acoustique mais que ceux-ci sont présents également entre ces positions privilégiées (en terme d'acoustique) et pouvant résulter du passage de bulles attirées par ces deux positions d'équilibres stable ou instable.

Le détachement des cellules est lié à la présence de bulles de cavitation et apparait principalement sur les nœuds de pression acoustique. Pour des excitations acoustiques plus longues, celui-ci a également lieu sur les ventres de pression acoustique. La sonoporation des cellules ainsi que des cellules mourantes sont observées autour des zones de détachement. Des bulles de cavitation se trouvent également autour des zones de détachement. Ces bulles sont donc certainement impliquées dans le détachement et/ou la sonoporation des cellules. Afin de déterminer plus finement le comportement de ces bulles et leur implication soit dans la sonoporation soit dans le détachement, il serait intéressant de réaliser des acquisitions avec à la fois une caméra rapide (pour une meilleur résolution de la dynamique des bulles) et une caméra en fluorescence (pour visualiser les cellules sonoporées à la fin du tir). Les cartographies de cellules après tirs ont montré que la sonoporation apparait dans des zones où il y a eu de la cavitation inertielle. Ces zones se trouvent autour des lieux de détachement mais également dans des zones correspond aux ventres et aux nœuds de pression où les cellules n'ont pas été détachées. Afin de sonoporer les cellules tout en limitant le détachement cellulaire, il faudrait relier la sonoporation à un ou des type(s) de dégâts sur la bicouche lipidique et donc à un ou des comportement(s) de bulle particulier(s), afin de ne générer que ce type de comportement(s) de bulle et donc de mieux contrôler la sonoporation.

Conclusion

La sonoporation, ou l'utilisation d'ultrasons pour augmenter la perméabilité de la membrane cellulaire, est une technique prometteuse pour la thérapie génique. En effet pour les applications in vivo, les ultrasons présentent l'avantage d'une possible action ciblée et extracorporelle. Cependant, la cavitation acoustique qui est le principal mécanisme impliqué dans la sonoporation est un phénomène complexe impliquant divers phénomènes cités dans la littérature comme liés à la sonoporation. Les mécanismes sous-jacents à la sonoporation ne sont donc pas encore clairement identifiés. Pourtant, l'utilisation de la sonoporation comme méthode de thérapie génique nécessite le contrôle des effets biologiques et donc notamment une meilleure compréhension des interactions bulles-cellules-milieu environnant. Dans cette optique, nous avons développé un système de sonoporation adapté à la visualisation en temps réel sous microscope et dédié aux cellules adhérentes.

Ce système présente un champ acoustique composé d'ondes quasi-stationnaires dû à la géométrie du dispositif. Afin de s'affranchir du caractère aléatoire de la cavitation inertielle, un système de régulation de l'activité de cavitation inertielle, constitué d'une boucle de contrôle rétroactive sur la mesure du niveau de bruit large bande, permet d'assurer l'initiation et le maintien d'un indice de cavitation inertielle ainsi que de s'affranchir de l'utilisation d'agents de contrastes ultrasonores. Cet indice est bien corrélé aux mesures effectuées par un dosage d'acide téréphtalique qui permet de quantifier la sonolyse de l'eau, conséquence de la cavitation inertielle. Le puits de culture cellulaire insonifié possède des positions d'équilibre pour les bulles de cavitation au fond du puits, donc à proximité des cellules, et également dans le volume. Les bulles dans le volume exhibent des mouvements de translations liés à la présence simultanée du champ acoustique d'ondes stationnaires et d'un champ hydrodynamique composé de tourbillons fluctuants résultant du streaming d'Eckart.

Le système de sonoporation a été validé en termes de sonoporation de cellules adhérentes, de détachement et de mortalité pour les cellules HT-29. Ces résultats montrent tout d'abord que notre système permet de sonoporer des cellules adhérentes puisque que les taux de sonoporation (environ 15 % pour une excitation acoustique de CI 30 pendant 5 minutes par exemple) sont bien supérieurs à l'endocytose (environ 0,8 % sans excitation acoustique). Les résultats de sonoporation sont plus reproductibles en utilisant la régulation de l'activité de cavitation inertielle plutôt que des excitations en intensités acoustiques fixées, et ceci malgré une régulation de l'activité de cavitation inertielle dans le volume pour une sonoporation surfacique. L'utilisation de la régulation permet également de travailler

dans un milieu à température ambiante au lieu de la température physiologique. La dépendance spatiale de la sonoporation dans le cas d'un champ acoustique composé d'ondes stationnaires est mis en évidence par l'augmentation du taux de sonoporation (de 15 à 25 % environ) lorsque plusieurs modes acoustiques sont excités successivement sur la même durée totale que pour un seul mode. Il est intéressant d'étudier l'effet des ultrasons à moyen terme sur les cellules afin de s'assurer que les cellules toujours vivantes après excitation ne vont pas mourir peu de temps après. Les cellules insonifiées par des ultrasons de faible intensité (LIPUS) ou de la cavitation stable montrent un comportement de reprise de croissance différent des témoins et des cellules insonifiées avec de la cavitation inertielle. Ceci pourrait être expliqué par une différence d'adhésion de ces cellules. Les cellules sonoporées, qu'elles soient restées adhérentes ou bien ayant été détachées lors de l'insonification, montrent un temps de latence avant la reprise de croissance plus important que les témoins, qui pourrait être expliqué par le stress de ces cellules. Cependant, il n'y a pas de différence entre les cellules sonoporées ou non et les témoins sur le nombre de cellules, leur surface ou leur adhérence, ce qui montre qu'au niveau de la reprise de croissance, la sonoporation des cellules n'induit pas d'effets particuliers, qu'ils soient positifs ou négatifs.

Les interactions bulles-membrane ont été étudiées en utilisant un modèle idéal de membrane : une bicouche de lipides liés à des fluorochromes. Ces bicouches déposées au fond du puits ont permis de montrer des effets des interactions bulles-membranes qui sont caractérisés par différents types de dégâts : principalement des fissures et des impacts. Les fissures observées sont temporaires ou permanentes et il n'a pas été possible de montrer une corrélation directe entre le temps que mettent les fissures à se refermer et la largeur ou la profondeur des fissures. Les bulles qui passent juste au dessus de la membrane à une vitesse de plusieurs dizaines de millimètres par seconde pourraient être la cause de ces fissures. Les impacts de bulles, quant à eux, présentent deux formes principales : les lipides sont arrachés sur un disque ou sur un anneau. Différents comportements de bulles posées au fond du puits sont également observés : des bulles immobiles qui se dissolvent lors de la fin de l'excitation acoustique et des bulles qui sautent sur la membrane. Ces sauts de bulles pourraient être dus à la force de Bjerknes primaire qui "attirerait" la bulle près de la membrane, et à l'infiltration d'eau entre la bulle et la membrane, possible conséquence des oscillations de la bulle. Ces dégâts sont localisés à la fois sur les nœuds et ventres de pression acoustique, positions d'équilibre des bulles de cavitation, mais également entre les nœuds et ventres de pression, possible conséquence du passage des bulles près de la membrane entre deux positions d'équilibre.

Le détachement des cellules a lieu principalement sur les nœuds de pression acoustique, mettant en avant l'implication des bulles de rayons supérieurs au rayon résonant pour qui les nœuds de pression acoustique sont une position d'équilibre stable. Cependant, lorsque la durée des excitations acoustiques augmente, il y a également détachement des cellules sur les ventres de pression acoustique. Autour des zones de cellules détachées sont observées des cellules sonoporées et mourantes ainsi que des bulles de cavitation. Il y a néanmoins présence de zones de sonoporation dans des zones de cellules non détachées, ces zones semblant tout de même liées aux ventres et aux nœuds de pression acoustique et plutôt bien corrélées avec les zones où il y a eu de la cavitation inertielle. En comparant avec les

cartographies de membranes de bicouches lipidiques où des dégâts sont observés sur les ventres et nœuds de pression acoustique mais également entre ces positions, il semble que les interactions des zones intermédiaires ne génèrent pas de pores transitoires dans la membrane cellulaire. De plus, afin de sonoperer les cellules tout en limitant le détachement cellulaire, il faudrait relier la sonoporation à un ou des type(s) de dégâts sur la bicouche lipidique et donc à un ou des comportement(s) de bulle particulier(s), dans le but de ne générer que ce type de comportement(s) de bulle afin de mieux contrôler la sonoporation.

Le système de sonoporation développé ne permet la sonoporation que d'environ 17% de cellules dans le cas où seule une fréquence est appliquée et jusqu'à 25% dans le cas d'une excitation acoustique composée de plusieurs fréquences successives. Ces taux de sonoporation qui ne semblent pas très efficaces, sont suffisants pour les observations sous microscope (jusqu'à 1 cellule sur 4), objectif principal de ces travaux. Ces expériences de sonoporation de cellules adhérentes ont également mis en évidence du détachement cellulaire lors de l'insonification du puits. Le détachement des cellules est localisé en des positions particulières : les nœuds et ventres du champ de pression acoustique. Cependant, comme la sonoporation a également lieu à ces positions, le détachement cellulaire pourrait expliquer en partie les taux de sonoporation faibles. Afin de pouvoir augmenter les taux de sonoporation, il faudrait donc limiter le détachement cellulaire lors des insonifications ainsi qu'appliquer un balayage en fréquence le plus efficace possible afin d'exposer le maximum de zones du puits à des nœuds et ventres de pression acoustique.

Ce système, bien qu'efficace pour la visualisation et la sonoporation, pourrait être amélioré. Une première modification consisterait à mieux contrôler le champ acoustique dans la cavité qui est quasi-stationnaire mais qui présente également une composante propagative (qui est à l'origine de streaming d'Eckart dans la cavité). Pour cela, le puits insonifié devrait être un guide d'onde, présentant un champ acoustique dans une seule dimension par exemple. De plus, même si la sonoporation est plus reproductible lors de l'utilisation de la régulation de l'activité de cavitation inertielle, une régulation surfacique (sur le fond du puits seulement) au lieu du puits dans son ensemble permettrait certainement d'améliorer la reproductibilité des résultats.

Chapitre 5

Annexe : statistiques

Statistiques

Les différents tests utilisés pour les études statistiques des mesures effectuées sont présentées sur la Figure 5.1. Dans la mesure du possible (normalité des groupe et homogénéité de la variance) des études paramétriques sont réalisées car celles-ci permettent de mettre en évidence des différences plus fines que les études non paramétriques. Les différents tests utilisés sont des tests conservateurs et les différences qui en ressortent sont sûres.

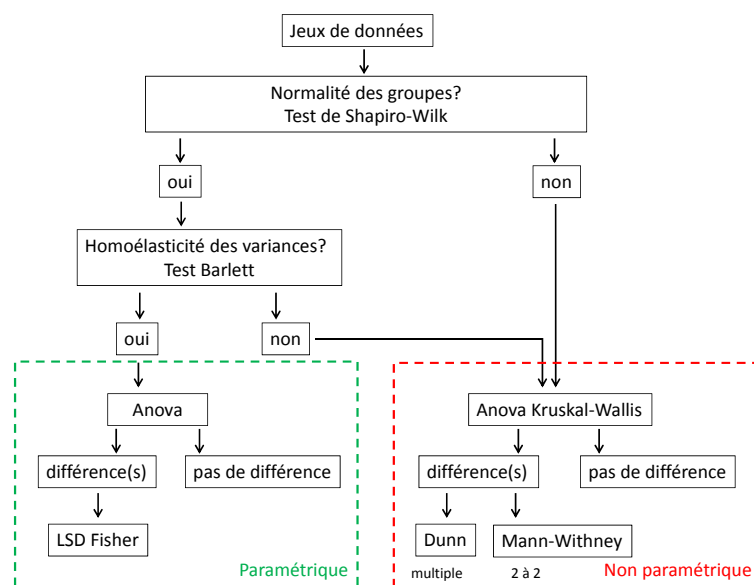


FIGURE 5.1 – Schéma des différents tests utilisés pour les statistiques du chapitre 3.

Statistiques pour l'étude de la reprise de croissance des cellules après exposition à différentes stimulations

Les résultats des statistiques de l'étude de la reprise de croissance des cellules après exposition à différentes stimulations sont présentées sur les Figures 5.2 et 5.3. La Figure 5.2 concerne les résultats après excitation acoustique en terme de sonoporation de cellules adhérentes, de détachement et des mortalité. La Figure 5.3 présente les résultats de l'analyse statistique pour les mesures de la pente du cell index, des cell index au plateau et maximum ainsi que du nombre de cellules à j4, paramètres ayant montré des différences.

Détachement				
Comparaisons multiples suivant le test de Différence Significative Minimale (LSD) de Fisher				
p-values :	lipus	stable	inertielle	témoin
lipus		0,325695	0,000107	0,524178
stable	0,325695		0,000585	0,118625
inertielle	0,000107	0,000585		0,000039
témoin	0,524178	0,118625	0,000039	

Mortalité				
Comparaisons multiples suivant le test de Différence Significative Minimale (LSD) de Fisher				
p-values :	lipus	stable	inertielle	témoin
lipus		0,425436	0,001259	0,987836
stable	0,425636		0,000303	0,433991
inertielle	0,001259	0,000303		0,001225
témoin	0,987836	0,433991	0,001225	

Sonoporation				
Comparaisons multiples par paires suivant la procédure de Dunn / Test bilatéral :				
p-values :	Var1 lipus	Var1 stable/ar1	inertie	Var1 témoin
Var1 lipus	1	0,117	0,003	0,737
Var1 stable	0,117	1	0,146	0,218
Var1 inertiel	0,003	0,146	1	0,007
Var1 témoin	0,737	0,218	0,007	1
Niveau de signification corrigé de Bonferroni : 0,0083				

FIGURE 5.2 – Résultats des analyse statistique pour le détachement, la mortalité et la sonoporation des cellules adhérentes.

penne Cell Index				
Comparaisons multiples suivant le test de Différence Significative Minimale (LSD) de Fisher				
p-values :	lipus	stable	inertielle	témoin
lipus		0,903170	0,043082	0,024954
stable	0,903170		0,046628	0,028164
inertielle	0,043082	0,046628		0,763719
témoin	0,024954	0,028164	0,763719	

Cell Index Plateau				
Comparaisons multiples suivant le test de Différence Significative Minimale (LSD) de Fisher				
p-values :	lipus	stable	inertielle	témoin
lipus		0,986621	0,008037	0,016628
stable	0,986621		0,012704	0,024920
inertielle	0,008037	0,012704		0,691727
témoin	0,016628	0,024920	0,691727	

Cell Index max				
Comparaisons multiples suivant le test de Différence Significative Minimale (LSD) de Fisher				
p-values :	lipus	stable	inertielle	témoin
lipus		0,801836	0,002675	0,001888
stable	0,801836		0,006928	0,004967
inertielle	0,002675	0,006928		0,842527
témoin	0,001888	0,004967	0,842527	

Nombre de cellules à J4				
Comparaisons multiples par paires suivant la procédure de Dunn / Test bilatéral				
p-values :	Var1 lipus	Var1 stable/ar1 inertie	Var1 témoin	
Var1 lipus	1	0,526	0,080	0,007
Var1 stable	0,526	1	0,263	0,040
Var1 inertiel	0,080	0,263	1	0,351
Var1 témoin	0,007	0,040	0,351	1
Niveau de signification corrigé de Bonferroni : 0,0083				

FIGURE 5.3 – Résultats des analyse statistique pour les mesures de la pente du cell index, des cell index au plateau et maximum ainsi que du nombre de cellules à j4.

Statistiques pour l'étude de l'effet de la cavitation inertielle sur la reprise de croissance des cellules adhérentes sonoporées ou non et détachées

Les résultats des statistiques de l'étude de l'effet de la cavitation inertielle sur la reprise de croissance des cellules adhérentes sonoporées ou non et détachées sont présentés sur la Figure . Cette figure présente les résultats de l'analyse statistique pour les mesures des temps de latence et temps seuil ainsi que la surface des cellules à j12, paramètres ayant montré des différences.

Temps de latence				
Comparaisons multiples suivant le test de Différence Significative Minimale (LSD) de Fisher				
p-values :	témoin	adhérente	adhérente sonoporée	suspension
témoin		0,062170	0,034223	0,000001
adhérente	0,062170		0,630476	0,000016
adhérente sonoporée	0,034223	0,630476		0,000065
suspension	0,000001	0,000016	0,000065	

Temps seuil				
Comparaisons multiples par paires suivant la procédure de Dunn / Test bilatéral :				
p-values :	témoin	adhérente	adhérente sonoporée	suspension
témoin	1	0,143	0,156	0,001
adhérente	0,143	1	0,951	0,062
adhérente sonoporée	0,156	0,951	1	0,096
suspension	0,001	0,062	0,096	1
Niveau de signification corrigé de Bonferroni : 0,0083				

Surface cellulaire à j12				
Comparaisons multiples par paires suivant la procédure de Dunn / Test bilatéral :				
p-values :	adhérente sonoporée	adhérente	suspension	témoin
adhérente sonoporée	1	0,006	0,568	0,007
adhérente	0,006	1	0,030	0,945
suspension	0,568	0,030	1	0,035
témoin	0,007	0,945	0,035	1
Niveau de signification corrigé de Bonferroni : 0,0083				

FIGURE 5.4 – Résultats des analyse statistique pour les mesures des temps de latence et temps seuil ainsi que la surface des cellules à j12, paramètres ayant montré des différences.

Bibliographie

- K. A. ATHANASIOU, B. S. THOMA, D. R. LANCTOT, D. SHIN, C. M. AGRAWAL et R.G. LEBARON : Development of the cytodetachment technique to quantify mechanical adhesiveness of the single cell. *Biomaterials*, 20(23-24):2405–2415, 1999.
- V. BOTTON, B. MOUDJED, D. HENRY, H. BEN HADID, J-P. GARANDET et A. POTHERAT : Acoustic streaming and jets in liquids. *In Proceedings of the 4th Joint US-European Fluids Engineering Summer Meeting*, 2014.
- A. A. BRAYMAN, M. L. COPPAGE, S. VAIDYA et M. W. MILLER : Transient poration and cell surface receptor removal from human lymphocytes in vitro by 1 MHz ultrasound. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 25(6):999–1008, 1999.
- C. E. BRENNEN : *Cavitation and Bubble Dynamics*. Oxford university press édition, 1995.
- C. E. BRENNEN : Fission of collapsing cavitation bubbles. *Journal of Fluid Mechanics*, 472:153–166, 2002.
- C. E. BRENNEN : *Fundamentals of Multiphase Flow*. Cambridge University Press, 2005.
- A.A. BRIAN et H.M. MCCONNELL : A allogeneic stimulation of cytotoxic t cells by supported planar membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6159–6163, 1984.
- MD BROWN, AG SCHATZLEIN et IF UCHEGBU : Gene delivery with synthetic (non viral) carriers. *International Journal of Pharmaceutics*, 229(1-2):1–21, 2001.
- P. CANADAS : *Modèle de tenségrité viscoélastique pour l'étude de la réponse dynamique des cellules adhérentes*. Thèse de doctorat, Université Paris XII, Val de Marne, Mai 2003.
- E. CHARLAIX, C. COTTIN-BIZONNE, J. CRASSOUS, S. LEROY, F. RESTAGNO et A. STEINBERGER : Propriétés hydrodynamiques au voisinage d'une surface. *Reflats de la Physique*, 22:14–18, 2011.
- W-S. CHEN, X. LU, Y. LIU et P. ZHONG : The effect of surface agitation on ultrasound-mediated gene transfer in vitro. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 116(4):2440–2450, 2004.
- X. CHEN, J. M. F. WAN et A. C. H. YU : Sonoporation as a cellular stress : Induction of morphological repression and developmental delays. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 39(6):1075–1086, 2013.

- J. E. CHOMAS, P. DAYTON, D. MAY et K. FERRARA : Threshold of fragmentation for ultrasonic contrast agents. *Journal of Biomedical Optics*, 6(2):141–150, 2001.
- C. C. CHURCH : Frequency, pulse length, and the mechanical index. *Acoustics Research Letters Online-Arlo*, 6(3):162–168, 2005.
- Y. COUDER, E. FORT, C. H. GAUTIER et A. BOUDAOU : From bouncing to floating : Noncoalescence of drops on a fluid bath. *Physical Review Letters*, 94(17), 2005.
- C. C. COUSSIOS et R. A. ROY : Applications of acoustics and cavitation to noninvasive therapy and drug delivery. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 40(1):395–420, 2008.
- L. A. CRUM : Bjerknes forces on bubbles in a stationary sound field. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 57(6):1363–1370, 1975.
- L. A. CRUM : Measurements of the growth of air bubbles by rectified diffusion. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 68(1):203–211, 1980.
- L. A. CRUM et A. I. ELLER : Motion of bubbles in a stationary sound field. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 48(1B):181–189, 1970.
- P. DEBESSE : *Vers une mesure du vent thermoacoustique*. Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie (UPMC) - Paris VI, décembre 2008.
- C. X. DENG, F. SIELING, H. PAN et J. M. CUI : Ultrasound-induced cell membrane porosity. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 30(4):519–526, 2004.
- C. DESJOUY, P. LABELLE, B. GILLES, J-C. BERA et C. INSERRA : Orbital trajectory of an acoustic bubble in a cylindrical resonator. *Physical Review E*, 88:033006, 2013a.
- C. DESJOUY, A. POIZAT, B. GILLES, C. INSERRA et J.-C. BÉRA : Control of inertial acoustic cavitation in pulsed sonication using a real-time feedback loop system. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 134(2):1640–1646, 2013b.
- Y. T. DIDENKO, W. B. MCNAMARA et K. S. SUSLICK : Hot spot conditions during cavitation in water. *Journal of the American Chemical Society*, 121(24):5817–5818, 1999.
- R. DIJKINK, S. LE GAC, E. NIJHUIS, A. van den BERG, I. VERMES, A. POOT et C-D. OHL : Controlled cavitation-cell interaction : trans-membrane transport and viability studies. *Physics in Medicine and Biology*, 53(2):375–390, 2008.
- A. A. DOINIKOV : Translational motion of a spherical bubble in an acoustic standing wave of high intensity. *Physics of Fluids*, 14(4):1420–1425, 2002.
- A. A. DOINIKOV et A. BOUAKAZ : Theoretical investigation of shear stress generated by a contrast microbubble on the cell membrane as a mechanism for sonoporation. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 128(1):11–19, 2010.

- S. Frey E. KALB et L.K. TAMM : Formation of planar bilayers by fusion of vesicles to supported phospholipid monolayers. *Biochim. Biophys. Acta*, 1103:307–316, 1992.
- S. A. ELDER : Cavitation microstreaming. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 31 (1):54–64, 1959.
- A. ELLER : Force on a bubble in a standing acoustic wave. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 43(1):170–171, 1968.
- P.S. EPSTEIN et M.S. PLESSET : On the stability of gaz bubbles in liquid-gas solutions. *The journal of chemical physics*, 18(11):1505–1509, 1950.
- J. M. ESCOFFRE, K. KADDUR, M. P. ROLS et A. BOUAKAZ : In vitro gene transfer by electrosonoporation. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 36(10):1746–1755, 2010.
- I. S. FAYZRAKHMANOVA, A. V. STRAUBE et S. SHKLYAEV : Bubble dynamics atop an oscillating substrate : Interplay of compressibility and contact angle hysteresis. *Physics of Fluids*, 23(10), 2011.
- PM FISCHER, E KRAUSZ et DP LANE : Cellular delivery of impermeable effector molecules in the form of conjugates with peptides capable of mediating membrane translocation. *Bioconjugate Chemistry*, 12(6):825–841, 2001.
- H. G. FLYNN : Cavitation dynamics .2. free pulsations and models for cavitation bubbles. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 58(6):1160–1170, 1975.
- H. G. FLYNN : A mechanism for the generation of cavitation maxima by pulsed ultrasound. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 76(2):505–512, 1984.
- M. M FORBES, R.L STEINBERG et W.D. O'BRIEN : Examination of inertial cavitation of optison in producing sonoporation. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 34(12):2009–2018, 2008.
- G. W. FRANCIS, L. R. FISHER, R. A. GAMBLE et D. GINGELL : Direct measurement of cell detachment force on single cells using a new electromechanical method. *Journal of Cell Science*, 87:519–523, 1987.
- J. FROHLY, S. LABOURET, C. BRUNEEL, I. LOOTEN-BAQUET et R. TORGUET : Ultrasonic cavitation monitoring by acoustic noise power measurement. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 108(5):2012–2020, 2000.
- R. M. HOCHMUTH : Micropipette aspiration of living cells. *Journal of Biomechanics*, 33(1):15–22, 2000.
- N. HOCKHAM, C. C. COUSSIOS et M. ARORA : A real-time controller for sustaining thermally relevant acoustic cavitation during ultrasound therapy. *IEEE Transactions on Ultrasonics Ferroelectrics and Frequency Control*, 57(12):2685–2694, 2010.

- Y IIDA, K YASUI, T TUZIUTI et M SIVAKUMAR : Sonochemistry and its dosimetry. *Microchemical Journal*, 80(2):159–164, 2005.
- IMAGEJ-PROGRAMMPAKET : Fluorescentcells, juillet 2010. [http ://rsb.info.nih.gov/ij/images/\(21/08/2014\)](http://rsb.info.nih.gov/ij/images/(21/08/2014)).
- M JOHNSON-SALIBA et DA JANS : Gene therapy : Optimising DNA delivery to the nucleus. *Current Drug Targets*, 2(4):371–399, 2001.
- J. B. KELLER : Bubble oscillations of large amplitude. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 68(2):628–633, 1980.
- H. J. KIM, J. F. GREENLEAF, R. R. KINNICK, J. T. BRONK et M. E. BOLANDER : Ultrasound-mediated transfection of mammalian cells. *Human Gene Therapy*, 7(11):1339–1346, 1996.
- M. KINOSHITA et K. HYNYNEN : Key factors that affect sonoporation efficiency in in vitro settings : The importance of standing wave in sonoporation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 359(4):860–865, 2007.
- I KRAMER et G. TRAMU : Le cytosquelette, mars 2003. [http ://www.ulyse.u-bordeaux.fr/atelier/ikramer/biocell_diffusion/gbb.cel.fa.104.b3/index.htm](http://www.ulyse.u-bordeaux.fr/atelier/ikramer/biocell_diffusion/gbb.cel.fa.104.b3/index.htm) (21/08/2014).
- B. KRATOCHVIL et V. MORNSTEIN : Use of chemical dosimetry for comparison of ultrasound and ionizing radiation effects on cavitation. *Physiological Research*, 56(1):S77–S84, 2007.
- N. KUDO, K. OKADA et K. YAMAMOTO : Sonoporation by single-shot pulsed ultrasound with microbubbles adjacent to cells. *Biophysical Journal*, 96(12):4866–4876, 2009.
- T. G. KUZNETSOVA, M. N. STARODUBTSEVA, N. I. YEGORENKOV, S. A. CHIZHIK et R. I. ZHDANOV : Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron*, 38(8):824–833, 2007.
- V. LAURENT, E. PLANUS, D. ISABEY, C. LACOMBE et C. BUCHERER : *Mécanotransduction 2000 - Matériaux et Structures des Sciences de l'Ingénieur et du Vivant*, chapitre Propriétés mécaniques de cellules épithéliales évaluées par micromanipulation cellulaire et magnétocytométrie., pages 373–379. 2000.
- T. LAUTERBORN, W. and Kurz : Physics of bubble oscillations. *Reports on Progress in Physics*, 73 (10), 2010.
- W. LAUTERBORN : Numerical investigation of nonlinear oscillations of gas bubbles in liquids. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 59(2):282–293, 1976.
- W. LAUTERBORN : Cavitation bubble dynamics - new tools for an intricate problem. *Applied Scientific Research*, 38:165–178, 1982.

- A. LAWRIE, A. F. BRISKEN, S. E. FRANCIS, D. WYLLIE, E. KISS-TOTH, E. E. QWARNSTROM, S. K. DOWER, D. C. CROSSMAN et C. M. NEWMAN : Ultrasound-enhanced transgene expression in vascular cells is not dependent upon cavitation-induced free radicals. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 29(10):1453–1461, 2003.
- S. LE GAC, E. ZWAAN, A. van den BERG et C-D. OHL : Sonoporation of suspension cells with a single cavitation bubble in a microfluidic confinement. *Lab on a Chip*, 7(12):1666–1672, 2007.
- C. C. LEE, C-C. WU et F-C. SU : The technique for measurement of cell adhesion force. *Journal of Medical and Biological Engineering*, 24(1):51–55, 2004.
- J. L. LEE, C. W. LO, C. INSERRA, J-C. BÉRA et W. S. CHEN : Ultrasound enhanced peptide-mediated gene delivery through increasing the intracellular calcium level and pkc- protein expression. *Pharmaceutical Research*, 13, 2014.
- D. LEGENDRE, C. COLIN et T. COQUARD : Lift, drag and added mass of a hemispherical bubble sliding and growing on a wall in a viscous linear shear flow. *Philosophical Transactions of the Royal Society a-Mathematical Physical and Engineering Sciences*, 366(1873):2233–2248, 2008.
- T.G. LEIGHTON : *4 - The Forced Bubble*. Academic Press, 1994.
- T.G. LEIGHTON : Bubble population phenomena in acoustic cavitation. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2(2):S123–S136, 1995.
- Y. LIU, J. YAN et M. R. PRAUSNITZ : Can ultrasound enable efficient intracellular uptake of molecules ? a retrospective literature review and analysis. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 38(5):876–888, 2012.
- C-W. LO, C. DESJOUY, S-R. CHEN, J-L. LEE, C. INSERRA, J-C BÉRA et W-S. CHEN : Stabilizing in vitro ultrasound-mediated gene transfection by regulating cavitation. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21:833–839, 2014.
- M. LOKHANDWALLA, J. A. MCATEER, J. C. WILLIAMS et B. STURTEVANT : Mechanical haemolysis in shock wave lithotripsy swl : Ii. in vitro cell lysis due to shear. *Physics in Medicine and Biology*, 46(4):1245–1264, 2001.
- X.C. LU et P. ZHONG : Ultrasound-induced cell detachment and gene transfection in adherent cells. *Acoustics Research Letters Online*, 6(3):195–200, 2005.
- M. S. MALGHANI : Generation and growth of bilayer defects induced by ultrasound. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 103(3):1682–1685, mars 1998.
- P. MARMOTTANT et S. HILGENFELDT : Controlled vesicle deformation and lysis by single oscillating bubbles. *Nature*, 423(6936):153–156, 2003.

- T. J. MASON, J. P. LORIMER, D. M. BATES et Y. ZHAO : Dosimetry in sonochemistry - the use of aqueous terephthalate ion as a fluorescence monitor. *Ultrasonics Sonochemistry*, 1(2):S91–S95, 1994.
- S. MEHIER-HUMBERT, T. BETTINGER, F. YAN et R. H. GUY : Plasma membrane poration induced by ultrasound exposure : Implication for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 104(1):213–222, 2005a.
- S. MEHIER-HUMBERT, T. BETTINGER, F. YAN et R. H. GUY : Ultrasound-mediated gene delivery : Kinetics of plasmid internalization and gene expression. *Journal of Controlled Release*, 104(1):203–211, 2005b.
- R. Z. MILENKOVIC, B. SIGG et G. YADIGAROGLU : Bubble clustering and trapping in large vortices. Part 1 : Triggered bubbly jets investigated by phase-averaging. *International Journal of Multiphase Flow*, 33(10):1088–1110, 2007.
- D. L. MILLER et J. QUDDUS : Lysis and sonoporation of epidermoid and phagocytic monolayer cells by diagnostic ultrasound activation of contrast agent gas bodies. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 27(8):1107–1113, 2001.
- M. W. MILLER, D. L. MILLER et A. A. BRAYMAN : A review of in vitro bioeffects of inertial ultrasonic cavitation from a mechanistic perspective. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 22(9):1131–1154, 1996.
- S. M. NEJAD, S. HOSSEINI, R. HAMID, H. AKIYAMA et K. TACHIBANA : Optical observation of cell sonoporation with low intensity ultrasound. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 413(2):218–223, 2011.
- B. E. NOLTINGK et E. A. NEPPIRAS : Cavitation produced by ultrasonics. *Proceedings of the Physical Society, Section B*, 63(9):674–685, 1950.
- C-D. OHL, M. ARORA, R. IKINK, N. de JONG, M. VERSLUIS, M. DELIUS et D. LOHSE : Sonoporation from jetting cavitation bubbles. *Biophysical Journal*, 91(11):4285–4295, 2006.
- C. D. OHL et R. IKINK : Shock-wave-induced jetting of micron-size bubbles. *Physical Review Letters*, 90(21), 2003.
- C-D. OHL et B. WOLFRUM : Detachment and sonoporation of adherent hela-cells by shock wave-induced cavitation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1624(1-3):131–138, 2003.
- K. OKADA, N. KUDO, K. NIWA et K. YAMAMOTO : A basic study on sonoporation with microbubbles exposed to pulsed ultrasound. *Journal of Medical Ultrasonics*, 32:3–11, 2005.

- R. OMTA : Oscillations of a cloud of bubbles of small and not so small amplitude. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 82(3):1018–1033, SEP 1987. ISSN 0001-4966.
- GF OWEIS, IE van der HOUT, C IYER, G TRYGGVASON et SL CECCIO : Capture and inception of bubbles near line vortices. *Physics of Fluids*, 17(2), 2005.
- H. PAN, Y. ZHOU, O. IZADNEGAHDAR, J. CUI et C.X. DENG : Study of sonoporation dynamics affected by ultrasound duty cycle. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 31(6):849–856, 2005.
- J. PARK, Z. FAN et C. X. DENG : Effects of shear stress cultivation on cell membrane disruption and intracellular calcium concentration in sonoporation of endothelial cells. *Journal of Biomechanics*, 44(1):164–169, 2011.
- U. PARLITZ, R. METTIN, S. LUTHER, I AKHATOV, M. VOSS et W. LAUTERBORN : Spatio-temporal dynamics of acoustic cavitation bubble clouds. *Philosophical Transactions of the Royal Society a-Mathematical Physical and Engineering Sciences*, pages 313–334, 1999.
- M. M. PEEL et P. A. DIMILLA : Effect of cell-cell interactions on the observable strength of adhesion of sheets of cells. *Annals of Biomedical Engineering*, 27(2):236–246, 1999.
- M. S. PLESSET : The dynamics of cavitation bubbles. *Journal of Applied Mechanics*, 16:277–282, 1949.
- H. PORITSKY : The collapse or growth of a spherical bubble or cavity in a viscous fluid. *Proceedings of the First U. S. National Congress on Applied Mechanics*, pages 813–821, 1952.
- M. POSTEMA, A. VAN WAMEL, C. T. LANCEE et N. DE JONG : Ultrasound-induced encapsulated microbubble phenomena. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 30(6):827–840, 2004.
- F. PRABOWO et C-D. OHL : Surface oscillation and jetting from surface attached acoustic driven bubbles. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(1):431–435, 2011.
- P. PRENTICE, A. CUSCHIERI, K. DHOLAKIA, M. R. PRAUSNITZ et P. CAMPBELL : Membrane disruption by optically controlled microbubble cavitation. *Nature physics*, 1:107–110, 2005.
- G. J. PRICZ et E. J. LENZ : The use of dosimeters to measure radical production in aqueous sonochemical systems. *Ultrasonics*, 31(6):451–456, 1993.
- Y. QIU, Y. LUO, Y. ZHANG, W. CUI, D. ZHANG, J. WU, J. ZHANG et J. TU : The correlation between acoustic cavitation and sonoporation involved in ultrasound-mediated DNA transfection with polyethylenimine (PEI) in vitro. *Journal of Controlled Release*, 145(1):40–48, 2010.
- Y. QIU, C. ZHANG, J. TU et D. ZHANG : Microbubble-induced sonoporation involved in ultrasound-mediated DNA transfection in vitro at low acoustic pressures. *Journal of Biomechanics*, 45(8):1339–1345, 2012.

- M. RASTELLO, J-L. MARIE et M. LANCE : Drag and lift forces on clean spherical and ellipsoidal bubbles in a solid-body rotating flow. *Journal of Fluid Mechanics*, 682:434–459, 2011.
- J RENSEN, D BOSMAN, J MAGNAUDET, CD OHL, A PROSPERETTI, R TOGEL, M VERSLUIS et D LOHSE : Spiraling bubbles : How acoustic and hydrodynamic forces compete. *Physical Review Letters*, 86(21):4819–4822, 2001.
- L. RESLAN, J-L. MESTAS, S. HERVEAU, J-C. BÉRA et C. DUMONTET : Transfection of cells in suspension by ultrasound cavitation. *Journal of Controlled Release*, 142(2):251–258, 2010.
- P. ROGERS et A. NEILD : Selective particle trapping using an oscillating microbubble. *Lab on a Chip*, 11(21):3710–3715, 2011.
- J. P. ROSS, X. CAI, J. F. CHIU, J. YANG et J. R. WU : Optical and atomic force microscopic studies on sonoporation. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 111(3):1161–1164, 2002.
- R. A. ROY, S. I. MADANSHETTY et R. E. APFEL : An acoustic backscattering technique for the detection of transient cavitation produced by microsecond pulses of ultrasound. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 87(6):2451–2458, 1990.
- A. SABRAOUI : *Régulation de la cavitation acoustique appliquée à la transfection ultrasonore*. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard- Lyon 1, janvier 2012.
- A. SABRAOUI, C. INSERRA, B. GILLES, J-C. BÉRA et J-L. MESTAS : Feedback loop process to control acoustic cavitation. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(2):589–594, 2011.
- A. SAEZ, M. GHIBAUDO, B. LADOUX, A. BUGUIN et P. SILBERZAN : Les cellules vivantes répondent à la rigidité de leur substrat. *Images de la physique*, pages 94–100, 2007.
- G. SAGVOLDEN, I. GIAEVER, E. O. PETTERSEN et J. FEDER : Cell adhesion force microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(2):471–476, 1999.
- G. N. SANKIN, F. YUAN et P. ZHONG : Pulsating tandem microbubble for localized and directional single-cell membrane poration. *Physical Review Letters*, 105(7), 2010.
- M SCHNEIDER : SonoVue, a new ultrasound contrast agent. *European Radiology*, 9(3):S347–S348, 1999.
- S. SHKLYAEV et A. V. STRAUBE : Linear oscillations of a compressible hemispherical bubble on a solid substrate. *Physics of Fluids*, 20(5), 2008.
- J. SOLON, P. STREICHER, R. RICHTER, F. BROCHARD-WYART et P. BASSEREAU : Vesicles surfing on a lipid bilayer : Self-induced haptotactic motion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(33):12382–12387, 2006.

- J. SUNDARAM, B.R MELLEIN et S. MITRAGOTRI : An experimental and theoretical analysis of ultrasound-induced permeabilization of cell membranes. *Biophysical Journal*, 84(5):3087–3101, 2003.
- R. P. TALEYARKHAN, C. D. WEST, J. S. CHO, R. T. LAHEY, R. I. NIGMATULIN et R. C. BLOCK : Evidence for nuclear emissions during acoustic cavitation. *Science*, 295(5561):1868–1873, 2002.
- L.K. TAMM et H.M. MCCONNELL : Supported phospholipid bilayers. *Biophys. J.*, 47:105–113, 1985.
- M. TAMOSIUNAS, R. JURKONIS, L. M. MIR, A. LUKOSEVICIUS, M. S. VENSLAUSKAS et S. SATKAUSKAS : Adjustment of ultrasound exposure duration to microbubble sonodestruction kinetics for optimal cell sonoporation in vitro. *Technology in cancer research & treatment*, 11(4):375–387, 2012.
- P. THO, R. MANASSEH et A. OOI : Cavitation microstreaming patterns in single and multiple bubble systems. *Journal of Fluid Mechanics*, 576:191–233, 2007.
- C. R. THOMAS, C. H. FARNY, C. C. COUSSIOS, R. A. ROY et R. G HOLT : Dynamics and control of cavitation during high-intensity focused ultrasound application. *Acoustics Research Letters Online*, 6(3):182–187, 2005.
- E. VAN BAVEL : Effects of shear stress on endothelial cells : Possible relevance for ultrasound applications. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 93(1-3):374–383, 2007.
- A. van WAMEL, A. BOUAKAZ, M. VERSLUIS et N. de JONG : Micromanipulation of endothelial cells : ultrasound-microbubble-cell interaction. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 30(9):1255–1258, 2004.
- A. van WAMEL, K. KOOIMAN, M. HARTEVELD, M. EMMER, F. J. ten CATE, M. VERSLUIS et N. de JONG : Vibrating microbubbles poking individual cells : Drug transfer into cells via sonoporation. *Journal of Controlled Release*, 112(2):149–155, 2006.
- L. VILLENEUVE, L. ALBERTI et J. and Mestas J-L. STEGHENS, J. and Lancelin : Assay of hydroxyl radicals generated by focused ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16(3):339–344, 2009.
- Z. WANG, M. GERSTEIN et M. SNYDER : RNA-Seq : a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, 10(1):57–63, 2009.
- WIKIPÉDIA : Redistribution de fluorescence après photoblanchiment, juillet 2014. http://fr.wikipedia.org/wiki/Redistribution_de_fluorescence_après_photoblanchiment.
- B. WOLFRUM, R. METTIN, T. KURZ et W. LAUTERBORN : Observations of pressure-wave-excited contrast agent bubbles in the vicinity of cells. *Applied Physics Letters*, 81(26):5060–5062, 2002.
- A. YAMAMOTO, S. MISHIMA, N. MARUYAMA et M. SUMITA : A new technique for direct measurement of the shear force necessary to detach a cell from a material. *Biomaterials*, 19(7-9):871–879, 1998.

- F. YANG, N. GU, D. CHEN, X. XI, D. ZHANG, Y. LI et J. WU : Experimental study on cell self-sealing during sonoporation. *Journal of Controlled Release*, 131(3):205–210, 2008.
- K. YASUI : Alternative model of single-bubble sonoluminescence. *Physical Review E*, 56(6):6750–6760, 1997.
- K. YASUI, Y. IIDA, T. TUZIUTI, T. KOZUKA et A. TOWATA : Strongly interacting bubbles under an ultrasonic horn. *Physical Review E*, 77(1), 2008.
- K. YASUI, T. TUZIUTI, J. LEE, T. KOZUKA, A. TOWATA et Y. IIDA : Numerical simulations of acoustic cavitation noise with the temporal fluctuation in the number of bubbles. *Ultrasonics Sonochemistry*, 17(2):460–472, 2010.
- E. YILMAZ : Cavitation inception thresholds in water and nuclei spectra by light-scattering technique. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 59(2):329–338, 1976.
- D. E. YOUNT : On the evolution, generation, and regeneration of gas cavitation nuclei. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 71(6):1473–1481, 1982.
- J-Z. ZHANG, J. K. SAGGAR, Z-L. ZHOU et B-H. : Different effects of sonoporation on cell morphology and viability. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 12(2):64–68, 2012.
- Y-Z. ZHAO, Y-K. LUO, C-T. LU, J-F. XU, J. TANG, M. ZHANG, Y. ZHANG et H-D. LIANG : Phospholipids-based microbubbles sonoporation pore size and reseal of cell membrane cultured in vitro. *Journal of Drug Targeting*, 16(1):18–25, 2008.
- W. ZHONG, W. H. SIT, J. M. F. WAN et A. C. H. YU : Sonoporation induces apoptosis and cell cycle arrest in human promyelocytic leukemia cells. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 37(12):2149–2159, 2011.
- Y. ZHOU, J. CUI et C. X. DENG : Dynamics of sonoporation correlated with acoustic cavitation activities. *Biophysical Journal*, 94(7):L51–L53, 2008.
- Y. ZHOU, R. E. KUMON, J. CUI et C. X. DENG : The size of sonoporation pores on the cell membrane. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 35(10):1756–1760, 2009.
- Y. ZHOU, K. YANG, J. CUI, J. Y. YE et C. X. DENG : Controlled permeation of cell membrane by single bubble acoustic cavitation. *Journal of Controlled Release*, 157(1):103–111, 2012.