



Sonoporation de cellules adhérentes sous microscope : visualisation de l'effet du champ acoustique stationnaire sur les bulles et les cellules

P. Labelle, M. Fouqueray, J. Ngo, A. Poizat, C. Vanbelle, C. Inserra et J.-C. Bera
INSERM U1032, 151 cours Albert Thomas, 69424 Lyon Cedex 03, France
pauline.labelle@inserm.fr

La sonoporation apparait comme une méthode de transfection prometteuse. Cependant, afin de contrôler les effets biologiques, les mécanismes mis en jeu durant l'insonification doivent être clarifiés. Dans ce but, nous avons développé un système de sonoporation adapté à la visualisation en temps réel sous microscope et dédié aux cellules adhérentes. Un processus de régulation de la cavitation inertielle a été mis en place afin d'assurer des effets biologiques plus reproductibles. Un taux de sonoporation de 12% a été obtenu avec ce système sur des cellules HT29 ainsi que 30% de détachement des cellules. Ce système a été utilisé pour avoir des informations sur les interactions entre les bulles, les cellules et le liquide environnant. Une étude au microscope a révélé que l'écoulement macroscopique dans le puits était composé de tourbillons à grande échelle probablement liés à du streaming d'Eckart et que cet écoulement n'est pas responsable du détachement des cellules. Les zones de détachement semblent plutôt reliées aux nœuds de pression du champ acoustique. Finalement, des observations sous microscope ont montré la présence de cellules sonoporées autour des zones de détachement ainsi que la présence de bulles de cavitation.

1 Introduction

La sonoporation, ou l'utilisation des ultrasons pour augmenter la perméabilité de la membrane plasmique des cellules, est une méthode alternative de transfection prometteuse [1, 2]. En effet, il existe d'autres méthodes pour transférer des gènes à l'intérieur des cellules mais les ultrasons ont l'avantage de pouvoir cibler une zone de transfection et d'être applicables de manière extracorporelle pour des expériences *in vivo*. Bien qu'il est généralement admis que la cavitation acoustique et plus principalement la cavitation inertielle joue un rôle important dans la sonoporation [3, 4], les mécanismes physiques mis en jeu durant l'insonification sont toujours mal compris. Nous avons donc développé un système de sonoporation avec visualisation en temps réel sous microscope, dédié aux cellules adhérentes, afin d'avoir des informations sur les interactions entre les bulles, les cellules et le milieu cellulaire durant les tirs ultrasonores. De plus, afin d'assurer une meilleure reproductibilité des effets biologiques, un système de régulation acoustique permettant d'assurer un niveau de cavitation inertielle constant au cours de l'excitation ultrasonore a été mis en place [5, 6, 7]. L'observation en temps réel implique l'utilisation de cellules adhérentes et, si l'efficacité de la régulation a été montrée sur les cellules en suspension par une meilleure reproductibilité des taux de sonoporation [7], elle doit être montrée pour des cellules adhérentes avec une régulation de la cavitation inertielle dans le volume.

Cette étude présente dans un premier temps une caractérisation du système de sonoporation en termes de sonoporation de cellules adhérentes et de champ de pression acoustique. Puis différentes études avec visualisation au cours des excitations ultrasonores sont présentées pour répondre à différentes questions : comment se déplacent les molécules à internaliser dans le milieu liquide ? Y a-t-il présence de bulles près du fond du puits ? A quel phénomène est dû le détachement des cellules ? Y a-t-il des zones de sonoporation privilégiées ?

2 Matériel et méthode

Le dispositif expérimental est un système compact de sonoporation (Figure 1) fixé dans une platine de microscope (16 x 11 cm), permettant l'observation durant l'insonification. Une double chambre de culture (Labtek, 2 puits, dimensions 20 x 20 mm, volume 2 mL) est placée au centre du système et deux transducteurs piézoélectriques

(Ferroperm PZ 26, fréquence 426.5 kHz, dimensions 18 x 3 mm) sont placés face à face de chaque côté de la chambre. Le signal émis est un signal sinusoïdal continu ou pulsé (pulses de 50 ms avec un temps off de 200 ms) de fréquence 426.5 kHz. Ce signal est synthétisé dans un système FPGA (circuit logique programmable, carte PXIe-7965R, NI) puis amplifié par le module amplificateur à gain variable du FPGA (16 bits, fréquence d'échantillonnage 100 MHz, module NI-5781R) et par un amplificateur de puissance (24 V, 4.8 A, 50 MHz, Kalmus). L'hydrophone (Onda HNR-0500) 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 FPGA. Le niveau de cavitation inertielle (CI) 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 [5]. Le CI est calculé et si celui-ci est différent de la consigne initiale, le gain de l'amplificateur à gain variable est modulé. Le niveau de cavitation inertielle moyen obtenu en fonction de l'intensité acoustique avec ce système est présenté sur la Figure 2. Pour les études ne nécessitant pas de bulles (comme pour la mesure du champ acoustique) ou peu de bulles (mesure de l'écoulement macroscopique) ont été choisies des intensités acoustiques faibles ($\leq 0.6 \text{ W/cm}^2$) ou des CI faibles (≤ 24). Des CI plus importants (>24) sont utilisés lorsque que des effets biologiques sont souhaités.

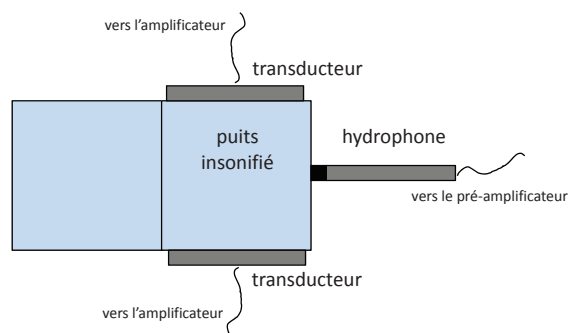


FIGURE 1 – Dispositif expérimental.

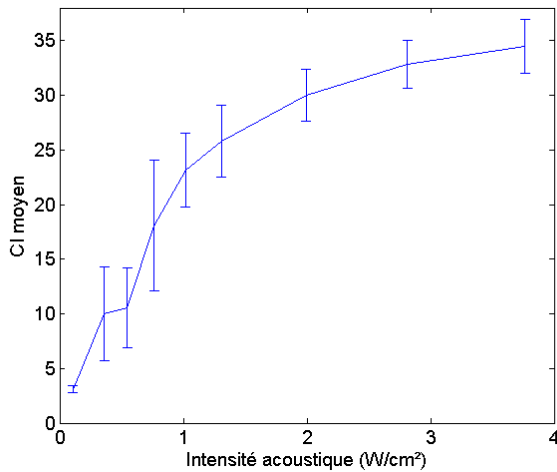


FIGURE 2 – Niveau de cavitation inertielle moyen obtenu en fonction de l'intensité acoustique dans l'eau.

3 Caractérisation du système

3.1 Sonoporation de cellules adhérentes

Pour valider le système en terme de sonoporation, des cellules adhérentes HT29 (lignée cellulaire humaine d'adénocarcinome colorectal) ont été utilisées. Les expériences de sonoporation consistent à internaliser du siRNA couplé au fluorochrome Alexa 488 (concentration = $0.12 \mu\text{M}$, $\lambda_{\text{excitation}} = 488 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{excitation}} = 530 \text{ nm}$, Invitrogen). Le taux de sonoporation et la mortalité (marqueur 7AAD) des cellules sont mesurés à l'aide d'un cytomètre de flux (FACS LSRII, Becton Dickinson, CA, USA). Des insonifications en excitation pulsée pendant 5 minutes et pour des indices de cavitation de 26 à 32 ont été réalisées à température ambiante. Les cellules toujours adhérentes à la fin du tir et celles qui se sont détachées sont traitées séparément. Les résultats de sonoporation des cellules toujours adhérentes à la fin du tir, de détachement et de mortalité sont présentés sur la Figure 3. Un taux de sonoporation des cellules adhérentes d'environ 12% est obtenu pour la condition CI 32. Ce taux est suffisant pour des observations sous microscope. La mortalité des cellules est autour de 20% ce qui est acceptable et le taux de détachement pour les CI intéressants (en terme de sonoporation) est de 30%. Les cellules mortes se détachent et donc comme le taux de détachement est supérieur au taux de mortalité pour les CI plus importants, il y a détachement de cellules vivantes au cours des tirs.

3.2 Champ acoustique

Le champ acoustique dans le puits a été mesuré à l'aide d'un hydrophone optique (Precision acoustic LTD). La Figure 4-a présente le puits de culture ainsi que les axes utilisés. 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 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) a été utilisé pour déplacer l'hydrophone, il est contrôlé par un programme Labview. Une mesure est prise tous les 0.5 mm . Un oscilloscope (Lecroy, Wave Surfer) est utilisé pour mesurer

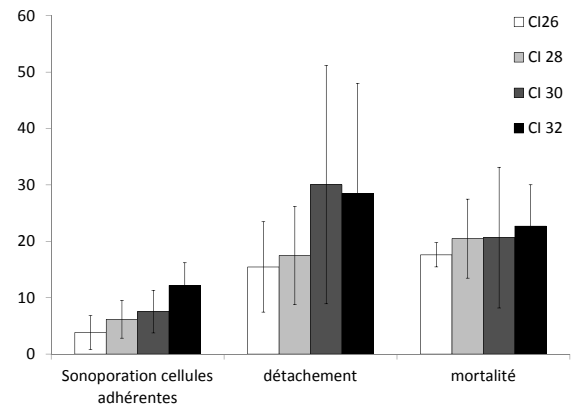


FIGURE 3 – Taux de sonoporation des cellules restant adhérentes, de détachement et de mortalité des cellules HT29 pour des insonifications de 5 min en excitation pulsée pour différents CI.

l'amplitude de la pression acoustique qui correspond à la valeur obtenue pour 20 moyennes. Le champ acoustique est composé d'ondes quasi-stationnaires comme attendu à la vue de la géométrie du puits. Un exemple de cartographie en (y, z) pour une position x au milieu du puits est présenté sur la Figure 4.

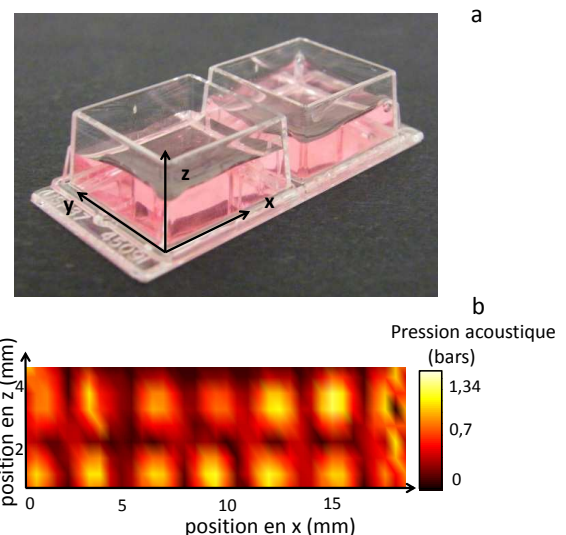


FIGURE 4 – Champ acoustique dans le puits dans le puits : a/ Une photo du puits avec les axes et b/ La pression acoustique mesurée dans le plan (y, z) au milieu du puits dans la direction x .

4 Visualisations durant l'insonification

Différentes études dans le but de mieux comprendre les interactions entre les bulles, les cellules et le liquide ont été réalisées sous microscope et macroscopie. Ces études portent sur l'écoulement macroscopique dans le puits afin de savoir comment les molécules à internaliser se comportent dans le milieu, sur la présence de bulles proches du fond du puits qui pourraient être responsables de la sonoporation des cellules adhérentes, sur les causes du détachement cellulaire et sur la localisation de zones de sonoporation des cellules.

4.1 Écoulement macroscopique

Afin d'avoir une idée de l'écoulement macroscopique et donc du comportement des molécules à internaliser 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 $\lambda_{excitation} = 515 \text{ nm}$, Invitrogen). Des insonifications de 30 secondes pour différents CI entre 10 et 24 ont été effectuées. En projetant toutes les images de chaque vidéo, il apparaît que l'écoulement macroscopique est composé de tourbillons à grande échelle (4 tourbillons la plupart du temps) (Figure 5-a) probablement lié à du streaming d'Eckart [8]. La vitesse moyenne de l'écoulement a ensuite été estimée en utilisant le logiciel PIVLab et celle-ci est de l'ordre du mm/s. Étonnamment, la vitesse des tourbillons semble être corrélée au CI plutôt qu'à l'intensité acoustique (Figure 5-b). Cela pourrait être dû à un effet d'entraînement du fluide par les bulles.

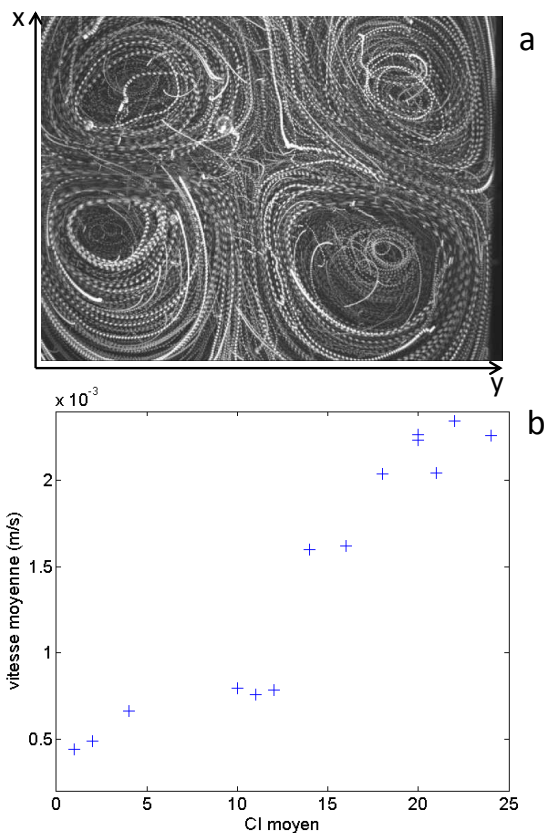


FIGURE 5 – Mesure de l'écoulement macroscopique : a/ projection de toutes les images d'une vidéo de l'écoulement macroscopique dans le puits entier pour un CI 14 (vu du dessus, les transducteurs sont placés à droite et à gauche de l'image) et b/ vitesse moyenne des tourbillons en fonction du CI moyen au cours du tir.

Pour déterminer si cet écoulement peut être responsable du détachement des cellules lors des tirs ultrasonores, la 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. En comparant cette contrainte induite par l'écoulement ($< 5 \text{ dynes/cm}^2$) avec celle nécessaire pour générer du détachement cellulaire ($> 50 \text{ dynes/cm}^2$) [9], il apparaît que l'écoulement ne semble pas être responsable du détachement des cellules.

4.2 Dynamique des bulles

Afin de s'assurer de la présence de bulles au fond du puits (près des cellules adhérentes), des observations sont faites dans de l'eau sous microscope confocal (Leica TCS SP5) pour des excitations continues. Des nuages de bulles près du fond du puits et qui se déplacent sont observés. Quelques images sont présentées sur la Figure 6. Des bulles de différentes tailles sont observées : à $t=26 \text{ s}$ le rayon des bulles est compris entre 4 et $18 \mu\text{m}$, tandis qu'à $t=40 \text{ s}$ ceux-ci sont de 2 à $10 \mu\text{m}$.

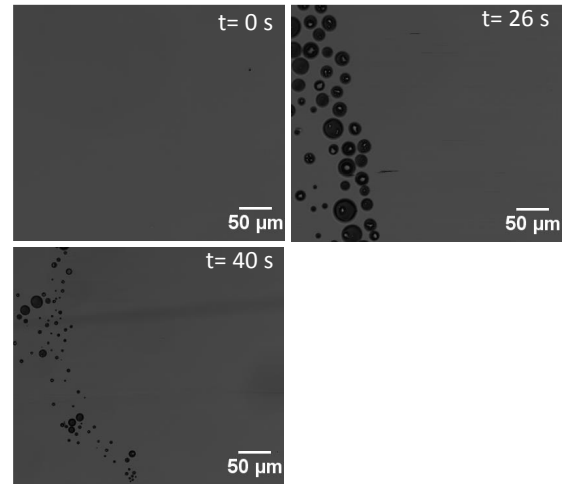


FIGURE 6 – Observation de bulles de cavitation au fond du puits pendant un tir ultrasonore continu à CI 20.

Dans un champ acoustique composé d'ondes stationnaires, les petites bulles (dont le rayon est inférieur au rayon de résonance $R < R_r$) sont attirées vers les ventres de pression acoustique alors que les grosses bulles ($R > R_r$) sont attirées vers les nœuds de pression acoustique d'après la première force de Bjerknes [10]. Dans notre cas, le rayon de résonance est environ $7 \mu\text{m}$. Dans le cas de fortes pressions acoustiques, les bulles peuvent se déplacer entre deux positions d'équilibre (soit dans la direction transverses des lignes nodales) [11, 12]. Dans notre configuration, des observations sous microscope (MacroFluo, Leica) ont mis en évidence la possibilité pour des grosses bulles ($R > R_r$) de se translater le long des lignes nodales. Un exemple de translation d'une bulle est présenté sur la Figure 7. Afin de vérifier si ces translations de bulles pourraient être liées à la présence simultanée du champ acoustique stationnaire et du champ hydrodynamique composé de tourbillons, des simulations du déplacement d'une bulle à proximité d'un tourbillon de Burger [13] et en présence d'un champ acoustique stationnaire ont été faites. En présence du champ acoustique uniquement, la bulle se déplace jusqu'à la ligne nodale la plus proche et la bulle se retrouve piégée à cette position. En présence du tourbillon de Burger uniquement, la bulle suit le tourbillon ou est piégée en son centre. 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 à une vitesse du même ordre que celle des tourbillons.

On peut donc constater que des bulles de cavitation sont présentes au fond du puits, près de la paroi, et dans le volume où les grosses bulles se translant sont observées.

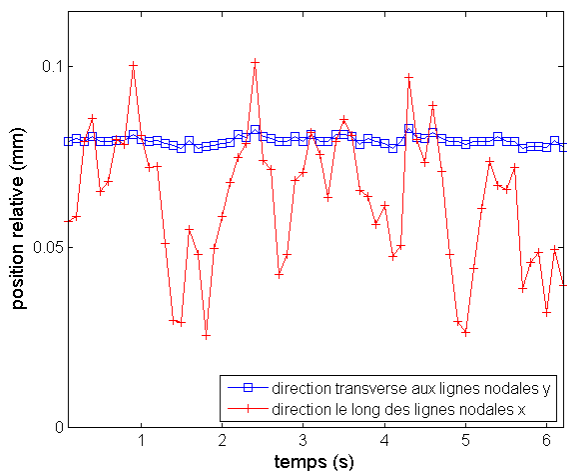


FIGURE 7 – Déplacement d'une bulle dans la direction des lignes nodales et dans la direction transverse.

4.3 Insonification de cellules adhérentes

4.3.1 Détachement des cellules

Lors des expériences de sonoporation, il y a détachement de cellules (observé sur les résultats de mortalité des cellules détachées). Afin de trouver si le détachement des cellules a lieu en des zones particulières et donc déterminer son origine, des expériences ont été faites sous microscope (MacroFluo) en lumière naturelle. Afin d'augmenter le contraste, les cellules ont été colorées avec de l'éosine. Afin de pouvoir déterminer les zones de détachement plus précisément et donc ne pas trop détacher les cellules, des tirs ultrasonores d'une minute en pulsé ont été réalisés pour des CI entre 24 et 32. Des photos du puits avant et après insonification sont présentées sur la Figure 8. Les zones de détachement apparaissent en clair et semblent correspondre des lignes de détachement à différentes position suivant y .

Les positions des zones de détachement ont été relevées pour tous les tirs et les positions moyennes de ces lignes sont tracées sur la Figure 9 en comparaison du champ acoustique réalisé sur la ligne ($x=10$ mm, $y, z=0.5$ mm). Les positions des lignes de détachement semblent liées au nœuds de pression acoustique et donc aux grosses bulles. 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 qui se trouvent à des positions particulières sur les ventres de pression acoustique (pour les petites bulles) ou sur les nœuds (pour les grosses bulles).

4.3.2 Sonoporation

Afin de vérifier si la sonoporation (comme le détachement) présente un caractère spatial, des observations du tapis cellulaire lors des insonifications ont été réalisées sous microscope confocal (Zeiss Confocal Laser Scanning Microscopy 780). Afin de mieux repérer les cellules, le cytoplasme de celles-ci a été coloré en rouge à l'aide de Vybrant DID. La molécule à internaliser est du dextran couplé au fluorochrome Alexa 488 (concentration = $0.24 \mu\text{M}$, $\lambda_{excitation} = 488$ nm et $\lambda_{excitation} = 530$ nm, Invitrogen). Après insonification, le milieu est rincé et du DAPI (marqueur de la mortalité cellulaire) est ajouté (concentration = $2 \mu\text{M}$, $\lambda_{excitation} = 340$ nm et

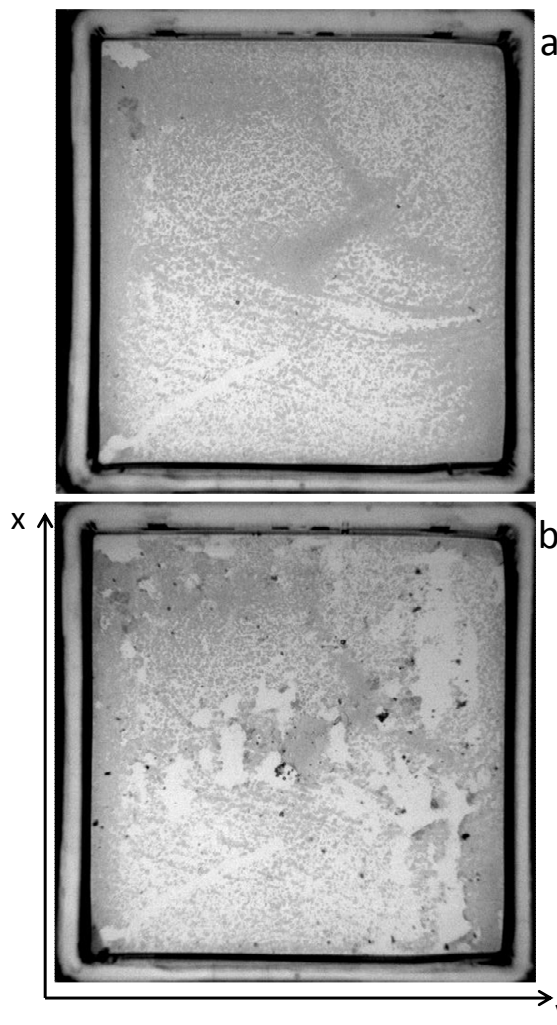


FIGURE 8 – Photos des cellules au fond du puits prises avant (a) et après (b) insonification pour un CI 28 en pulsé pendant 1 minute : il y a détachement des cellules à des positions particulières.

$\lambda_{excitation} = 488$ nm, Sigma). La figure 10 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 en train de mourir (en bleu). Ces dernières sont reconnaissables à leur forme arrondie.

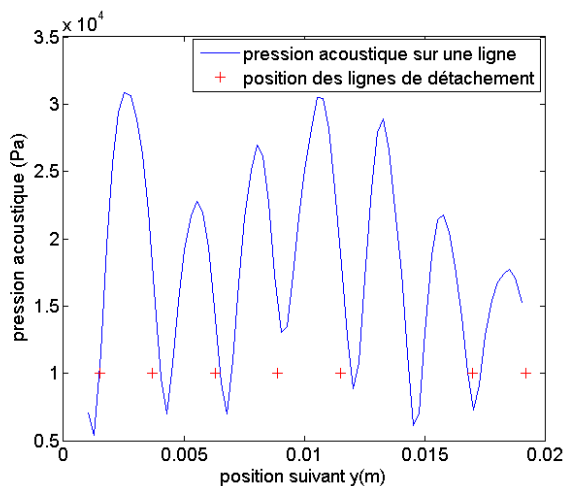


FIGURE 9 – Positions des lignes de détachement des cellules et du champ acoustique dans la direction y : les zones de détachements semblent liées aux positions des nœuds de pression acoustique.

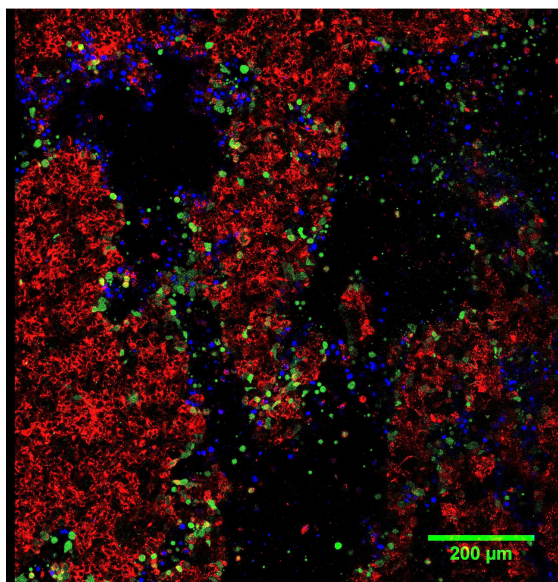


FIGURE 10 – Photos de cellules sous microscope après insonification : en rouge (le cytoplasme des cellules colorés au Vybrant DID), en vert les cellules sonoporées (dextran 10k Da couplé Alexa 488) et en bleu les cellules mortes (marquées au DAPI).

On peut également voir que les bulles de cavitation sont présentes autour des zones de détachement comme le montrent les photos avant et après insonification de la Figure 11. 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.

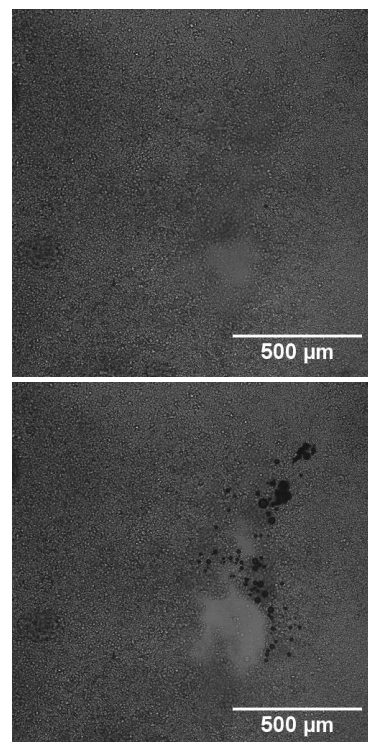


FIGURE 11 – Photos de cellules sous microscope avant (en haut) et après (en bas) insonification en lumière naturelle : on voit des bulles de cavitation qui se sont placées sur le bord de la zone détachée pour une excitation pulsée à CI 20 de 5 minutes.

5 Conclusion

Un système de sonoporation avec possibilité d'observation en temps réel sous microscope a été développé. Afin de s'assurer des effets biologiques plus reproductibles, un système de régulation de la cavitation inertielle a été mis en place. Une étude de sonoporation de cellules adhérentes avec ce système a permis d'atteindre des taux de sonoporation d'environ 12% et de mettre en évidence un effet de détachement des cellules lors de l'insonification. Différentes études sous microscope ont été menées. L'écoulement macroscopique dans le puits est composé de tourbillons à grande échelle résultant de streaming d'Eckart. Cet écoulement ne génère pas de détachement des cellules mais contribue avec le champ acoustique (ondes stationnaires) à la translation de grosses bulles le long des lignes nodales. Le détachement des cellules a lieu sur les nœuds de pression acoustique et est donc certainement dû aux grosses bulles. Des cellules sonoporées sont présentes autour des zones de détachement. Des bulles de cavitation ont également été observées autour des zones de détachement et pourraient être impliquées dans le détachement ainsi que dans la sonoporation.

Remerciements

Ce travail a été supporté par l'Agence Nationale de Recherche ANR (projet "SonInCaRe", n°2010-TECS-003-01) et a été conduit dans le cadre du LabEx CeLyA ("Centre Lyonnais d'Acoustique", ANR-10-LABX-0060/ANR-11-IDEX-0007).

Références

- [1] M. W. Miller, D. L. Miller, A. A. Brayman, A review of in vitro bioeffects of inertial ultrasonic cavitation from a mechanistic perspective, *Ultrasound in Medicine and Biology* 22 (9) (1996) 1131–1154.
- [2] K.-Y. Ng, Y. Liu, Therapeutic ultrasound : its application in drug delivery, *Medicinal research reviews* 22 (2) (2002) 204–223.
- [3] J. Sundaram, B. Mellein, S. Mitragotri, An experimental and theoretical analysis of ultrasound-induced permeabilization of cell membranes, *Biophysical Journal* 84 (5) (2003) 3087–3101.
- [4] Y. Zhou, J. Cui, C. X. Deng, Dynamics of sonoporation correlated with acoustic cavitation activities, *Biophysical Journal* 94 (7) (2008) L51–L53.
- [5] C. Desjoux, A. Poizat, B. Gilles, C. Inserra, 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) (2013) 1640–1646.
- [6] L. Reslan, J.-L. Mestas, S. Herveau, J.-C. Béra, C. Dumontet, Transfection of cells in suspension by ultrasound cavitation, *Journal of Controlled Release* 142 (2) (2010) 251–258.
- [7] C.-W. Lo, C. Desjoux, S.-R. Chen, J.-L. Lee, C. Inserra, J.-C. Béra, W.-S. Chen, Stabilizing in vitro ultrasound-mediated gene transfection by regulating cavitation, *Ultrasonics Sonochemistry* 21 (2014) 833–839.
- [8] C. Eckart, Vortices and streams caused by sound waves, *Physical Review* 73 (1) (1948) 68–76.
- [9] M. M. Peel, P. A. DiMilla, Effect of cell-cell interactions on the observable strength of adhesion of sheets of cells, *Annals of Biomedical Engineering* 27 (2) (1999) 236–246.
- [10] A. Eller, Force on a bubble in a standing acoustic wave, *The Journal of the Acoustical Society of America* 43 (1) (1968) 170–171.
- [11] C. Desjoux, P. Labelle, B. Gilles, J.-C. Béra, C. Inserra, Orbital trajectory of an acoustic bubble in a cylindrical resonator, *Physical Review E* 88 (3) (2013) 033006.
- [12] A. A. Doinikov, Translational motion of a spherical bubble in an acoustic standing wave of high intensity, *Physics of Fluids* 14 (4) (2002) 1420–1425.
- [13] G. Oweis, I. van der Hout, C. Iyer, G. Tryggvason, C. S.L, Capture and inception of bubbles near line vortices, *Physics of Fluids* 17 (2) (2005) 022105.