

Streaming acoustique dans un puits de culture cellulaire : application à la sonoporation

A. Sabraoui, C. Inserra, C. Vanbelle, J.-L. Mestas, J.-C. Béra

INSERM, U1032, Lyon F-69003, France; Université de Lyon 1, Lyon F-69003, France

Resumé

Le phénomène de sonoporation est intimement lié à l'interaction entre une cellule, des micro-écoulements et une bulle de cavitation. Pour obtenir une information sur ces écoulements générés par les ultrasons et en vue de la transfection de cellules adhérentes dans un puits de culture biologique, des visualisations optiques ont été réalisées sur une cavité approximativement rectangulaire correspondant à un puits de culture soumise à un champ ultrasonore. Pour ce faire, des particules fluorescentes ($2\ \mu\text{m}$) sont utilisées sous microscope et permettent de quantifier le champ de déplacement fluide dans le milieu et les micro-écoulements au voisinage des bulles. Pour les faibles intensités ultrasonores ($0,48\ \text{W}/\text{cm}^2$), on observe des écoulements stationnaires et reproductibles, et les particules se déplacent à une vitesse qui peut atteindre $6\ \text{mm}/\text{s}$ (au milieu du puits). Pour les fortes intensités ultrasonores ($3,34\ \text{W}/\text{cm}^2$), un effet d'attraction et d'éjection des particules est remarqué autour des bulles de cavitation.

Abstract

The sonoporation phenomenon is closely related to the interaction between cells, microflows and cavitation bubbles. To get information about flow generated by ultrasound and in the scope of adherent cell transfection in culture, visualizations were carried out in an approximately rectangular cavity corresponding to a cell well submitted to ultrasound. In this aim, fluorescent particles are visualized under microscope, to quantify the fluid displacement and the microstreaming near cavitation bubbles. For low ultrasound intensity ($0.48\ \text{W}/\text{cm}^2$), stationary and reproducible flows were observed with local velocity up to $6\ \text{mm}/\text{s}$ (in the middle of the well). For high ultrasound intensity ($3.34\ \text{W}/\text{cm}^2$), an effect of attraction and ejection of microparticles is noticed around the cavitation bubbles.

Mots clés : streaming acoustique, cavitation ultrasonore, sonoporation.

1 Introduction

L'utilisation des ultrasons pour la thérapie a énormément progressé ces dernières décennies et le développement de nouvelles technologies ouvre de nouvelles perspectives dans le domaine de la thérapie par cavitation ultrasonore. Il a été démontré que les ultrasons augmentent la perméabilité membranaire des cellules, permettant notamment le transfert de gène. Ce phénomène est appelé sonoporation [1]. Il est communément admis que le principal mécanisme de la sonoporation est étroitement lié avec le phénomène

de cavitation acoustique [2, 3, 4]. De plus, la propagation d'ondes acoustiques dans un milieu peut entraîner la création d'écoulements, phénomène connu sous le nom de streaming acoustique [5]. Dans notre étude nous nous intéressons à caractériser ces écoulements dans un puits de culture cellulaire et nous cherchons aussi à appréhender l'effet de la présence des bulles de cavitation sur les micro-écoulements. Pour ce faire, des microparticules fluorescentes sont diluées dans 2 ml d'eau et sont observées par microscopies photoniques; ces particules vont se déplacer en suivant le milieu liquide. Différentes intensités ultrasonores sont appliquées, une faible intensité ultrasonore de $0,48 \text{ W/cm}^2$ (sans bulles de cavitation) pour évaluer le champ acoustique, et une forte intensité ultrasonore de $3,34 \text{ W/cm}^2$ pour voir l'effet des bulles de cavitation sur le déplacement des particules.

2 Matériels et méthodes

2.1 Système d'irradiation ultrasonore

Le système d'irradiation est composé de 2 transducteurs piézo-électriques plans (fréquence : 405 kHz ; dimension : $20 \times 3,5 \text{ mm}$). Ces transducteurs électriquement connectés en parallèle et adaptés à 50Ω sont excités par un signal sinusoïdal continu issu d'un générateur de fonction (HP33120 Agilent), amplifié par un module d'amplification de puissance (20 W). Les puissances électriques appliquées sont comprises entre 0,25 W et 3 W, ces limites correspondant à des intensités acoustiques mesurées en champ libre par la méthode de pesée acoustique sur un transducteur de respectivement $0,24 \text{ W/cm}^2$ et $1,67 \text{ W/cm}^2$.

Les milieux à exposer sont placés dans des puits d'une plaque de culture en polystyrène (2 puits; puits de base carrée de côté 20 mm, et de parois obliques rentrantes avec un angle de 6°). Le puits est disposé entre les 2 transducteurs dans son champ proche (figure 1), le couplage utilisé est le gel échographique. La hauteur de liquide dans le puits est d'environ 5 mm, correspondant à un volume de liquide de 2 ml.

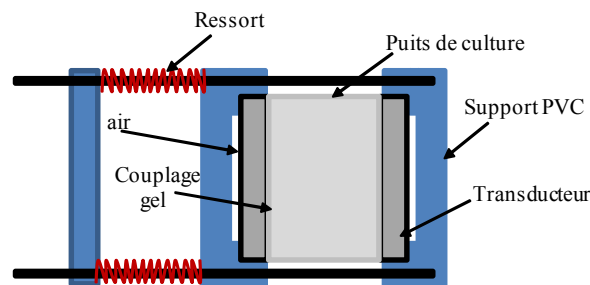


FIG. 1 – Schéma du dispositif expérimental

Perpendiculairement aux axes acoustiques des transducteurs est fixé un hydrophone (bande passante : 10 MHz). Il permet l'écoute du bruit de cavitation dans le milieu exposé. Le signal de réception est numérisé (carte d'acquisition PXI-5620, résolution 14 bits, fréquence d'échantillonnage 64 MHz, National Instruments[®]), transféré sur le ordinateur (PC + Labview), puis traité. Ce traitement consiste, dans un premier temps, à déterminer le spectre instantané dans la bande de 0,1 à 7.1 MHz, comme indiqué dans une précédente étude [7]. Ce système d'écoute va nous permettre de vérifier la présence des bulles de cavitation (stable ou inertielle) dans le milieu en analysant les spectres instantanées du signal.

2.2 Système de visualisation

Deux systèmes de microscopie photoniques sont utilisés pour observer les micro-écoulements dans le puits de culture. Ce puits est rempli de 2 ml d'eau distillée dans lesquels sont ajoutés 5 μ l de solution de microsphères fluorescentes (SPHEROTM, particules de diamètre $2,13 \pm 0,05 \mu$ m). Deux types d'observation sont effectués :

- des mesures par microscopie à épifluorescence (objectif x 2,5 ; épaisseur du plan de visualisation 1.3 μ m), qui permettent de ne visualiser que les microparticules et de mesurer les vitesses du fluide, avec une résolution de 400 nm ; afin de visualiser suffisamment finement les écoulements, on travaille sur des champs de 1,7x1,3 mm, ce qui pour une image de 696x520 pixels fournit une résolution spatiale de 2.4 μ m ;
- des mesures par microscopie confocale à fluorescence (épaisseur du plan de visualisation 0,7 μ m), couplées à des mesures en transmission en champ clair (épaisseur du plan de visualisation de 6 μ m), qui permettent de visualiser simultanément les microparticules et les bulles de cavitation.

Dans la présente étude, on s'intéresse aux écoulements dans le puits de culture et plus particulièrement aux micro-écoulements liés aux bulles au voisinage du fond de puits, qui est la zone qui nous intéresse pour l'application finale visée : l'objectif est d'étudier les mécanismes de sonoporation et de transfection sur des cellules adhérentes qui seraient attachées sur cette paroi inférieure du puits.

Pour les mesures de vitesse, le système de vidéo-acquisition est utilisé pour réaliser des films avec une cadence d'image de 8 Hz. Le temps d'ouverture de l'objectif est de la moitié de la période entre deux images.

2.3 Méthode d'analyse des images

Des films sont réalisés en différentes positions du plan d'analyse. La comparaison des images des particules sur une même position permet d'étudier le caractère stationnaire des écoulements.

Dans le cas d'un écoulement à caractère stationnaire et reproductible (cas des faibles intensités acoustiques), une caractérisation du champ global est effectuée par un balayage du plan d'observation. Afin d'alléger les mesures, on peut se contenter de ne scanner qu'un quart du plan en raison des symétries du problème. La figure 2 décrit la méthode d'investigation. Sur chaque secteur d'observation correspondant à un petit carreau sur la figure, est effectuée une vidéo de 51 images (de durée totale 6 secondes). A partir de cette vidéo, on peut obtenir simplement une visualisation des lignes de courant en prenant sur chaque pixel la valeur maximale d'intensité lumineuse obtenue sur les 51 images. En assemblant ces 8x11 images on reconstitue l'allure de l'écoulement global.

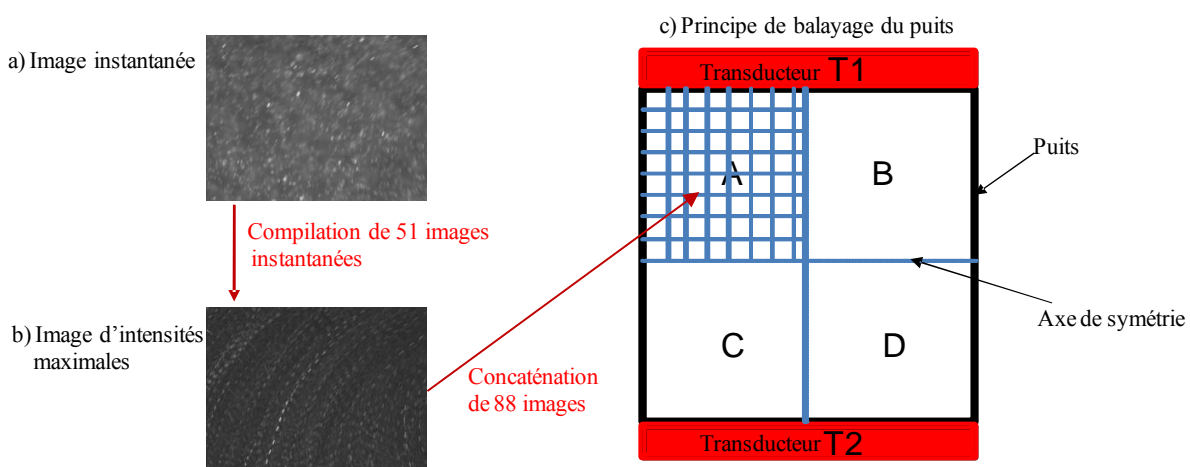


FIG. 2 – Méthode d'acquisition d'un plan complet de visualisation.

Pour évaluer les vitesses des particules, deux méthodes sont utilisées. Tout d'abord, pour calculer les faibles vitesses, une évaluation manuelle peut être réalisée sur les images des maxima d'intensité, en suivant la formule : (distance entre 2 points) / (temps entre 2 images). Prenons l'exemple de la figure 4a, la distance entre 2 points est de 0,018 mm, le temps entre 2 images est de 120 ms ; donc la vitesse est de l'ordre de 0.15 mm/s près de la paroi du puits.

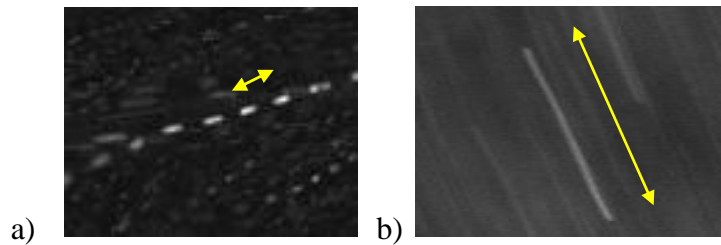


FIG. 3 – Principes des mesures de vitesse de déplacement :

- a) image compilée d'un film (exemple d'une particule se déplaçant à faible vitesse),
- b) image instantanée (exemple d'une particule se déplaçant à forte vitesse).

Cette vitesse augmente lorsqu'on s'éloigne des parois latérales du puits, et les particules vont apparaître sous forme de traits sur les images instantanées. Dans la mesure où la particule se déplace dans le plan d'observation (ce qui est généralement observé, avec des traits qui sont d'intensité approximativement uniforme), les vitesses peuvent être évaluées sur les images instantanées en suivant la formule : (longueur du trait) / (temps d'ouverture de la caméra). Prenons l'exemple de la figure 4b, la longueur du trait est de 0.35 mm ; le temps d'ouverture de la camera est 60 ms ; donc la vitesse est d'environ 6 mm/s.

3 Résultats

3.1 Streaming à faible intensité ultrasonore

Pour des très faibles intensités ultrasonores (inférieures à 0,15 W/cm²), aucun effet significatif de la présence des ultrasons n'est observé. Pour des intensités modérées (0,48 W/cm²), on constate qu'après 2 à 3 secondes de régime transitoire, il s'établit des écoulements quasi-stationnaires et approximativement reproductibles entre les acquisitions. Dans ce cas, on peut étudier le streaming global présent dans le puits (figure 4).

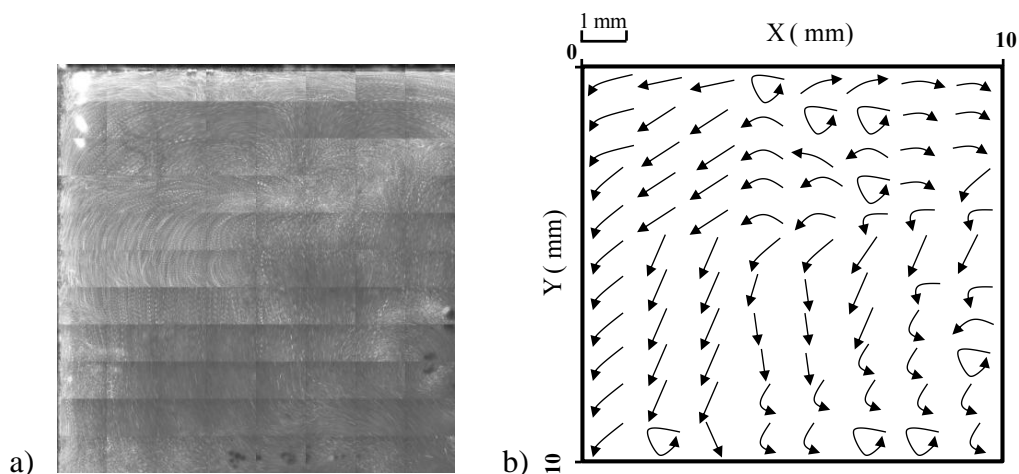


FIG. 4 – Visualisation de l'écoulement sur le plan situé à 1 mm du fond de puits :
a) images assemblées du quart du puits, b) allure de l'écoulement correspondant.

Dans certaines zones, on remarque l'existence de tourbillons (figure 5.a). Globalement, on constate que les trajectoires sont dans le plan de l'observation ; cependant, on observe des points de singularité du champ au voisinage desquels des particules sortent du plan d'observation (figure 5.b).

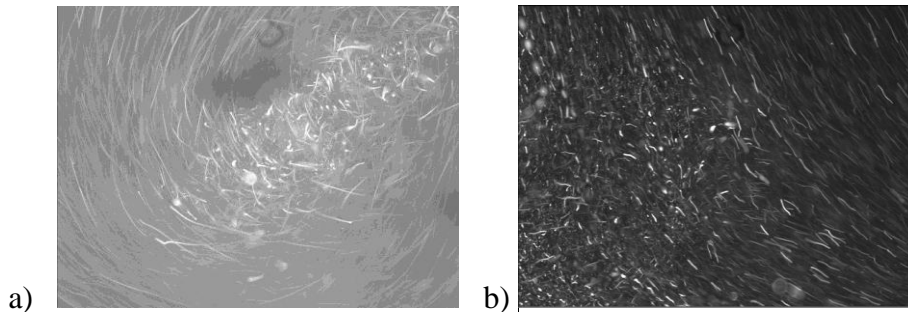


FIG. 5 – Exemples d'images compilées obtenues (1,7x1.3 mm) :
a) tourbillon, b) singularité du champ bidimensionnel.

3.2 Écoulements à forte intensité ultrasonore

Une seconde série d'expériences a été réalisée en appliquant une forte intensité ultrasonore ($3,34 \text{ W/cm}^2$). Les mesures acoustiques de cavitation mettent en évidence par un bruit large bande la présence de bulles qui implosent. Les visualisations en fluorescence font apparaître des écoulements instationnaires, et les visualisations en transmission montrent la présence de nombreuses bulles. On s'intéresse tout particulièrement au fond du puits où l'interaction entre les bulles et le milieu nous intéresse le plus pour une application à la transfection de cellules adhérentes. On observe des bulles sur la paroi inférieure du puits : leur distribution est inhomogène et instationnaire mais leur durée de vie peut être de l'ordre de plusieurs secondes et leur mouvement peut rester faible, ce qui permet de les suivre visuellement.

Pour mettre en évidence les micro-écoulements liés à une bulle de cavitation, il a été effectué simultanément des visualisations confocales (pour détecter les particules fluorescentes) et des visualisations en transmission (pour détecter les bulles de cavitation). La figure 6 montre des images instantanées d'une même bulle de cavitation. Comme on le voit sur la figure 6a, les particules fluorescentes vont être attirées par la bulle de cavitation, pour être ensuite projetées sous forme de paquets tout autour de la bulle (cf. fig. 6b). Dans le cas de cette bulle, le rythme est maintenu jusqu'à la fin de l'irradiation.

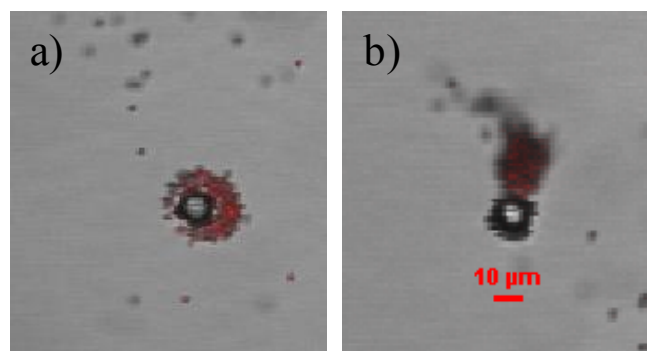


FIG. 6 – Images instantanée d'une bulle de cavitation entourée de microparticules :
a) effet d'attraction des particules autour de la bulle ;
b) un jet des particules dans le sens d'implosion de la bulle.

On remarque que les bulles de cavitation présentes dans le milieu ont une taille moyenne comprise entre (7 et 10 μm), ce qui correspond à la taille moyenne de la bulle en théorie suivant l'équation simplifiée : $f_{\text{eau}} \cdot R_{\text{eau}} = 3$, avec $f = 0.4$ MHz et $R_{\text{eau}} = 7,5$ μm .

Les bulles de cavitation ont un effet apparent d'attraction sur les particules fluorescentes, qui se trouvent ensuite projetées dans le milieu. En réalité, il s'agit d'observations très sous-échantillonnées : le temps d'acquisition d'une image confocale est approximativement de 33 ms, soit plus de 13000 périodes ultrasonores. La pulsation volumique des bulles n'apparaît donc pas sur les films réalisés. On peut supposer que certaines bulles implosent et émettent des microjets de gaz de grande vitesse permettant la dispersion des particules dans la direction du microjet. Si une bulle implose, elle va former des germes dans le milieu qui vont évoluer en quelques cycles (soit en une dizaine de microsecondes) pour reformer une nouvelle bulle de cavitation. Compte tenu du sous-échantillonnage, on peut avoir l'impression d'avoir toujours la même bulle, avec des jets de particules dans différentes directions. Pour certaines bulles, on observe l'émission d'un nuage de particules dans un petit angle directionnel (comme sur la figure 6b) ; dans d'autres cas, les particules semblent projetées alternativement dans toutes les directions, ce qui pourrait correspondre à une succession de microjets très directionnels.

4 Conclusion

L'objectif de cette étude était de caractériser les écoulements dans un puits de culture cellulaire microscopie photonique, dans le but d'obtenir des informations sur les micro-écoulements générés par les ultrasons dans la zone où devront se trouver les cellules à transfecter. Pour les faibles intensités ultrasonores, alors qu'il n'y a pas de cavitation, on peut observer des écoulements stationnaires et reproductibles, qui augmenteront le mélange au sein du milieu. Pour les fortes intensités, alors qu'il y a de la cavitation inertielle, les écoulements deviennent instationnaires et des écoulements intenses sont mis en évidence au voisinage des bulles. D'après ces observations, on peut dire que la présence des bulles de cavitation dans un milieu cellulaire n'a pas juste un effet sur la membrane de la cellule, mais aussi peut aider à une meilleure distribution des produits à transfecter dans le milieu (sous l'effet des micro-écoulements et tout particulièrement des microjets).

Des mesures avec une caméra rapide pourraient permettre de mieux cerner les micro-écoulements instantanés autour des bulles de cavitation. D'ores et déjà nos résultats permettent d'envisager des tirs sur cellules sous microscope avec le système d'irradiation ultrasonore présenté ici. Concernant l'efficacité de la transfection, la distribution des bulles dans le milieu reste à optimiser.

Références

- [1] Bailey M.R., Khokholova V.A., Sapozhnikov O.A., Kargl S.G., Crum L.A., "Physical mechanisms of the therapeutic effect of ultrasound", *Acoustical Physics*, 49(4):369-388 (2003).
- [2] El Maalouf J., Béra J.C., Alberti L., Cathignol D., Mestas J.-L., "In vitro sonodynamic cytotoxicity in regulated cavitation conditions", *Ultrasonics*, 49(2):238-43 (2009).
- [3] Reslan L., Mestas J.-L., Herveau S., Béra J.C., Dumontet C., "Transfection of cells in suspension by ultrasound cavitation", *J. Control Release* ;142(2):251-258. (2010).
- [4] Hallow D.M., Mahajan A.D., McCutchen T.E., Prausnitz M.R., "Measurement and correlation of acoustic cavitation with cellular bioeffects", *Ultrasound Med. Biol.*, 32(7):1111-22 (2006).
- [5] Barnett S.B., Kossof G., "Acoustic streaming and radiation pressure in diagnostic applications: what are the implications? Safety of diagnostic ultrasound". New York: Parthenon, 1998:87-98.
- [6] Miller D.L., Song J., "Tumor growth reduction and DNA transfer by cavitation-enhanced high-intensity focused ultrasound in vivo", *Ultrasound Med. Biol.*, 29(6):887-93 (2003).
- [7] Sabraoui A., Béra J.C., Insera C., Mestas J.-L., "Feedback loop process to control acoustic cavitation: experimental evidence", *Ultrasonics sonochemistry*, 18(2):589-594 (2010).