

Interaction d'une bulle de cavitation ultrasonore avec une membrane bilipidique

J-C. BERA^a, C. INSERRA^a, J-P. RIEU^b, C. DER LOUGHIAN^b,
P. MULEKI SEYA^a,

a. Inserm, U1032, LabTAU, Lyon, France; Université de Lyon ;

jean-christophe.bera@inserm.fr

b. Université Lyon1, ILM, Lyon, France

Résumé :

Dans le contexte de la transfection ultrasonore, une investigation expérimentale a été menée pour étudier la formation de lésions créées par la cavitation ultrasonore sur une membrane bilipidique modèle déposée au fond d'un puits de culture cellulaire. Des visualisations microscopiques ont été réalisées pendant les tirs ultrasonores, ce qui a permis de révéler deux types de lésions intéressantes : des impacts de bulles et des fissures. A partir de mesures couplées en fluorescence et en champ clair, on a pu déduire un modèle de formation de chacun de ces deux types de lésions.

Abstract :

In the context of ultrasound cell transfection, an experimental investigation was carried out in order to study the formation of lesions generated by ultrasound cavitation on a lipid bilayer at the bottom of a cell culture well. Microscopy visualizations during sonication have shown two interesting types of damage – bubble impacts and slight layer cracks. Models of damage formation have been deduced from optical measurements combining bright-field and fluorescence microscopy.

Mots clefs : ultrasons ; cavitation ; bulle ; membrane bilipidique

1 Introduction

Les ondes de pression de forte amplitude se propageant dans un liquide sont susceptibles de créer des bulles dans le milieu, de les faire osciller et éventuellement imploser : c'est le phénomène de cavitation acoustique. Ce phénomène est observé et utilisé dans le cas d'ondes ultrasonores pour différentes applications industrielles ou médicales, dans les bains à ultrasons notamment pour le nettoyage de pièces ou d'instruments. De façon plus spécifique, l'interaction des bulles de cavitation ultrasonore avec une paroi biologique peut être mise en œuvre pour perméabiliser cette membrane et stimuler la traversée de molécules ou particules. Ainsi, dans le cas de la sonophorèse, il s'agit de faire traverser la barrière cutanée, soit pour injecter des médicaments dans le corps, soit pour avoir accès à des données corporelles comme la glycémie, et ce sans aiguille [1]. On peut alors utiliser des ultrasons

de fréquences de quelques 10 kHz, ce qui permet de mettre en jeu des bulles de dimensions de l'ordre du dixième de millimètre (d'après la formule de Minnaert [2]). A une échelle plus petite, dans le cas de la sonoporation cellulaire, le but est de faire traverser des parois de cellules vivantes, notamment pour faire pénétrer du matériel génétique à l'intérieur d'une cellule (et éventuellement dans son noyau) en relation avec des problématiques de thérapie génique [3]. Dans ce cas, les fréquences utilisées sont plus élevées, de l'ordre du MHz, ce qui correspond à des bulles micrométriques, plus en rapport avec la taille des cellules. Différentes causes pourraient expliquer cette stimulation par les ultrasons de la pénétration cellulaire, généralement liées au phénomène d'implosion de bulles (cavitation inertielle), en particulier : l'onde de choc induite par la cavitation inertielle ou le microjet généré vers la paroi par l'implosion d'une bulle au voisinage de cette paroi [4-5], et la contrainte de cisaillement exercée sur la paroi cellulaire par le microstreaming créé par l'oscillation d'une bulle pariétale [6]. Cependant, les mécanismes qui gouvernent l'interaction des bulles de cavitation ultrasonore avec la paroi cellulaire et permettent la pénétration cellulaire ne sont pas clairement élucidés. La présente étude se situe dans ce contexte d'investigation des mécanismes d'interaction de bulles de cavitation ultrasonore avec une membrane biologique : des visualisations microscopiques ont été réalisées sur des membranes bilipidiques tenant lieu de modèle de paroi biologique (et plus particulièrement de membrane plasmique), dans le but de mettre en évidence certains mécanismes d'interaction bulle-membrane. On s'est intéressé aux lésions créées par la cavitation sur la membrane, et plus particulièrement aux lésions modérées.

2 Dispositif expérimental

2.1 Système de sonoporation

Les expériences ont utilisé un dispositif de génération de cavitation ultrasonore adapté à un puits de culture cellulaire et à la visualisation sous microscope en temps réel. Ce système a été validé pour la sonoporation de cellules adhérentes : il permet d'internaliser des petites molécules (SiRNA ou Dextran de 10 kDa) dans des cellules en culture au fond du puits [7]. Une platine de microscope dédiée comprend le système d'irradiation ultrasonore. Placé sur cette platine, le puits de culture de forme carré (puits LabTex, thermo Scientific Nunc, de 20x20 mm) et rempli de 2 mL de liquide (soit une hauteur d'environ 5 mm) est coincé sur deux de ces faces en vis-à-vis entre deux sources piézoélectriques (Ferroperm PZ26, résonant autour de 400 kHz). Alimentées à travers un amplificateur de puissance (Kalmus 24V-50MHz) par un signal sinusoïdal de 426,5 kHz, ces sources créent dans le puits un champ quasi-stationnaire avec un nœud de pression au fond (constitué d'une lamelle de verre appuyée latéralement sur la platine) et un ventre de pression au niveau de la surface libre, avec des amplitudes de pression acoustique comprises entre 1 et 2 bars. Les détails techniques complémentaires sur le dispositif sont donnés dans [8]. Tous les essais sont réalisés à température ambiante.

2.2 Membrane bilipidique modèle et système de visualisation

Les membranes utilisées sont des bicouches lipidiques supportées de DOPC, DLPC et DPPC (dioleoylphosphatidylcholine, dilauroylphosphatidylcoline et dipalmitoylphosphatidylcholine), comprenant un fluorophore (NDB-PC) permettant le suivi en fluorescence. Les lipides sont déposés sur la lame de verre du fond du puits de culture, où ils forment une bicouche, les queues hydrophobes se faisant face au centre des deux couches (cf. [8]). Les visualisations d'interaction entre les bulles de cavitation et la membrane bilipidique sont effectuées en microscopie à fluorescence (microscope inversé Nikon TE2000). L'utilisation d'un microscope confocal (Leica TCS SP5 II) a également

permis de réaliser des observations simultanées des lipides en fluorescence et des bulles en transmission en champ clair. Le principe des visualisations est donné par la figure 1.

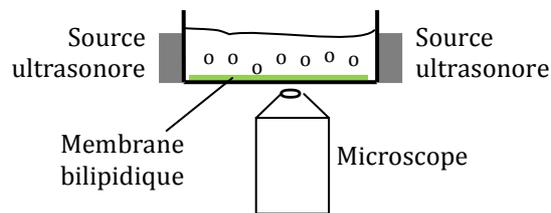


Figure 1 – Schéma du dispositif expérimental.

3 Résultats et discussion

Différents types de lésion sont observés sur la membrane qui a été soumise au champ acoustique, en fonction notamment du niveau de cavitation acoustique observé. On remarque que les dégâts sont clairement plus liés à la présence de bulles et à l'activité de ces bulles qu'au niveau de pression acoustique : la cavitation se comporte de façon aléatoire, de sorte qu'un niveau acoustique élevé ne génère pas toujours de bulles, et si tel est le cas on ne visualise pas de dégâts sur la membrane. De plus, aucune différence qualitative n'a été notée entre les différentes membranes bilipidiques testées, bien qu'on ait utilisé des membranes en phase fluide (DOPC et DLPC) et en phase gel (DPPC). A fort niveau de cavitation ultrasonore, on constate une forte dégradation de la membrane associée à la présence de grosses bulles attachées à la paroi (cf. fig. 2). Les images en fluorescence montrent que les grosses bulles sont fluorescentes et ont donc recruté les lipides (fig. 2c) ; lors de leur dissolution après tir, il ne reste que des trous dans la membrane, qui apparaissent donc sombres en fluorescence (fig.2d). On pourrait rapprocher cette dégradation importante au détachement cellulaire observé dans les expériences sur tapis cellulaire [7] : l'exemple de la figure 2d obtenu avec le même dispositif d'insonification sur des cellules adhérentes met en évidence une zone de détachement cellulaire (en clair) avec la présence de quelques bulles résiduelles après tir (en noir). En tout état de cause, ces dégradations importantes interviennent à l'échelle du tapis cellulaire. Dans la suite, on s'intéressera plus précisément à deux types de lésions qui interviennent à une échelle plus petite et donc plus proche de l'échelle cellulaire : les impacts de bulles et les fissures.

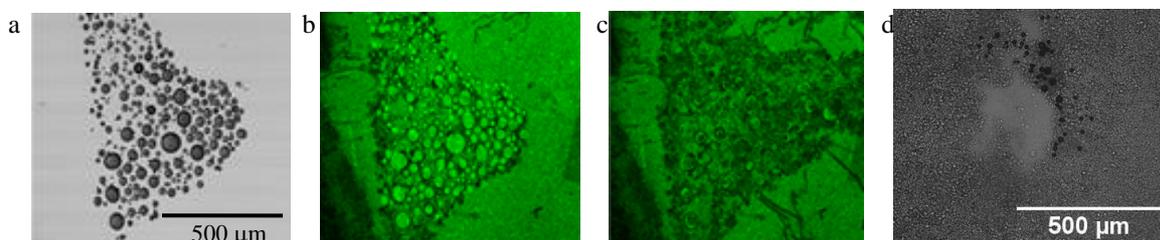


Figure 2 – Visualisation de dommages importants sur la membrane :

- (a) image en transmission de « grosses » bulles pendant le tir, (b) image en fluorescence de la même zone pendant le tir, (c) dégâts sur la membrane de cette même zone après tir, (d) à titre de comparaison, zone de détachement sur une monocouche cellulaire (extrait de [8]).

3.1 Impacts de bulles

En observant la membrane fluorescente après tir ultrasonore, on peut observer des défauts de formes circulaire ou annulaire, de dimension toujours identique. On remarque que le diamètre caractéristique de ces impacts est dans la gamme des 10 μm , ce qui correspond sensiblement ou est plutôt légèrement inférieur au diamètre résonant de 14 μm des bulles excitées à la fréquence ultrasonore utilisée (d'après la formule de Minnaert [2]). La figure 3 présente une zone dans laquelle sont concentrés ces défauts, en noir sur l'image de fluorescence ce qui correspond à une absence de lipide.

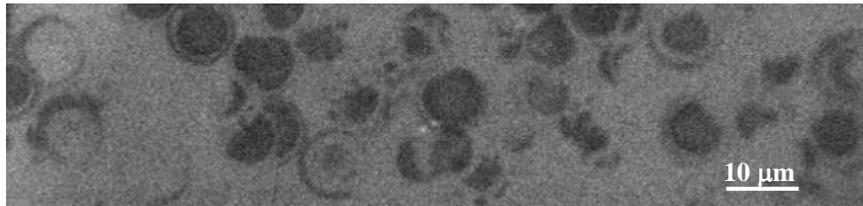


Figure 3 – Impacts de bulles :
exemple de visualisation en fluorescence d'un zoom de la membrane après tir.

Contrairement à cet exemple de la figure 3 où les impacts ont l'air de se présenter de façon aléatoire, lorsque la densité des dégradations est plus faible, nous avons observé dans de nombreux cas des alignements d'impacts circulaires, formant des patterns isolés plus ou moins étranges, comme on peut en voir sur les figures 4a et 4b. L'observation des vidéos montre que chacun de ces patterns est créé par une seule et même bulle, qui se déplace de proche en proche : la bulle se fixe à la paroi, puis saute jusqu'à une position voisine où elle se refixe. Dans ces expériences, le temps caractéristique d'attachement de la bulle est de l'ordre de 2 ou 3 secondes, alors que le saut entre deux positions successives s'effectue rapidement (typiquement en 1 ms, car le saut s'effectue sur 2 images dans nos prises de vue à 2000 images/s).

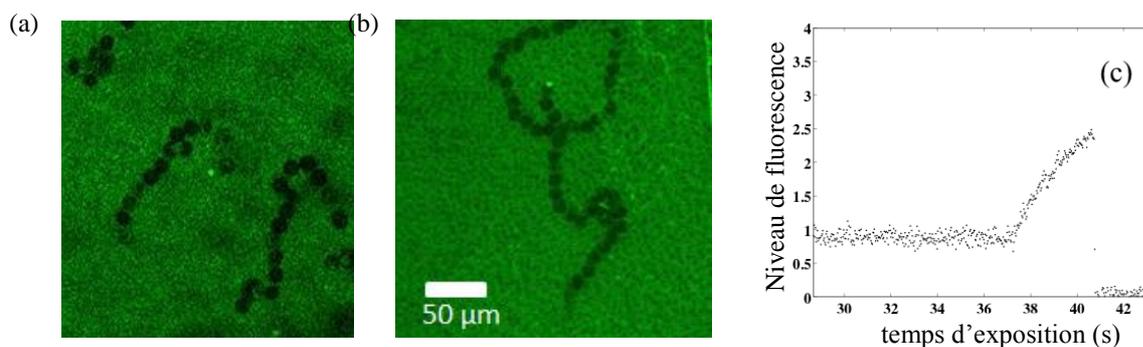


Figure 4 – Impacts de bulles en colliers de perles :

(a-b) exemples de patterns d'impacts de bulles, (c) suivi en un point du niveau de fluorescence au passage d'une bulle (niveau d'intensité normalisé par l'intensité de la membrane intacte).

L'analyse de la fluorescence met en évidence le comportement de ces bulles : la bulle se pose sur la paroi et devient fluorescente (en recrutant les lipides de membrane), puis il se forme progressivement une poche d'eau entre la bulle et la paroi, ce qui se traduit par une fluorescence accrue au niveau du contact. Comme on peut le voir sur la figure 4c, l'intensité de fluorescence atteint alors 2,5 fois celle de la bicouche, ce qui correspond à 5 feuilletts lipidiques (2 pour la bicouche, 1 pour la bulle et 2 pour les 2 faces de la poche d'eau). Enfin, la bulle se détache de la paroi, engendrant du même coup une

lésion de la bicouche, qui se traduit généralement par un arrachement total des lipides sous la bulle. Le comportement de la bulle peut être interprété de façon mécanique [9] : la bulle au voisinage de la membrane bilipidique est soumise aux actions conjuguées de trois forces : la force de portance liée aux écoulements de streaming mesurés dans le puits de culture, la force de Bjerkness primaire liée au champ acoustique qui pousse la bulle vers la paroi, et les forces de van der Waals qui maintiennent la bulle attachée à la membrane lipidique tant que la surface de contact est suffisante. La formation d'une poche d'eau entre la bulle et la paroi (sous l'effet de l'oscillation acoustique non radiale de la bulle) diminue les forces de van der Waals qui deviennent insuffisantes pour retenir la bulle ; dès que la bulle s'éloigne un peu de la paroi, ces forces de proximité deviennent négligeables, et la bulle s'éloigne encore sous l'effet de la force (stationnaire) de portance, mais alors la force de Bjerkness qui augmente avec la distance à la paroi, va ramener la bulle à la paroi, pour qu'elle s'y rattache sous l'effet des forces de van der Waals.

3.2 Fissures

L'apparition de fissures constitue un autre type de lésion observé sur la membrane bilipidique lors du tir ultrasonore. Des exemples en sont donnés sur la figure 5. Certaines fissures sont permanentes, et d'autres sont temporaires comme celles présentées sur la figure. Par ailleurs, pour les fissures temporaires, les temps de réparation de la membrane sont très variables : nous avons enregistré des temps de recouvrement des fissures allant de moins d'une seconde jusqu'à 30 s. Cependant, les défauts de fluorescence correspondant à différentes fissures ont été étudiés (largeur et profondeur du défaut, état de la membrane environnante), une étude paramétrique a été menée et aucune corrélation n'a été trouvée entre les différents paramètres et le temps de réparation. En tout état de cause, le niveau de fluorescence mesuré dans les fissures est inhomogène (en accord avec [10]), et on peut supposer qu'il existe différents types de lésions dont la distinction n'est pas accessible à nos visualisations.

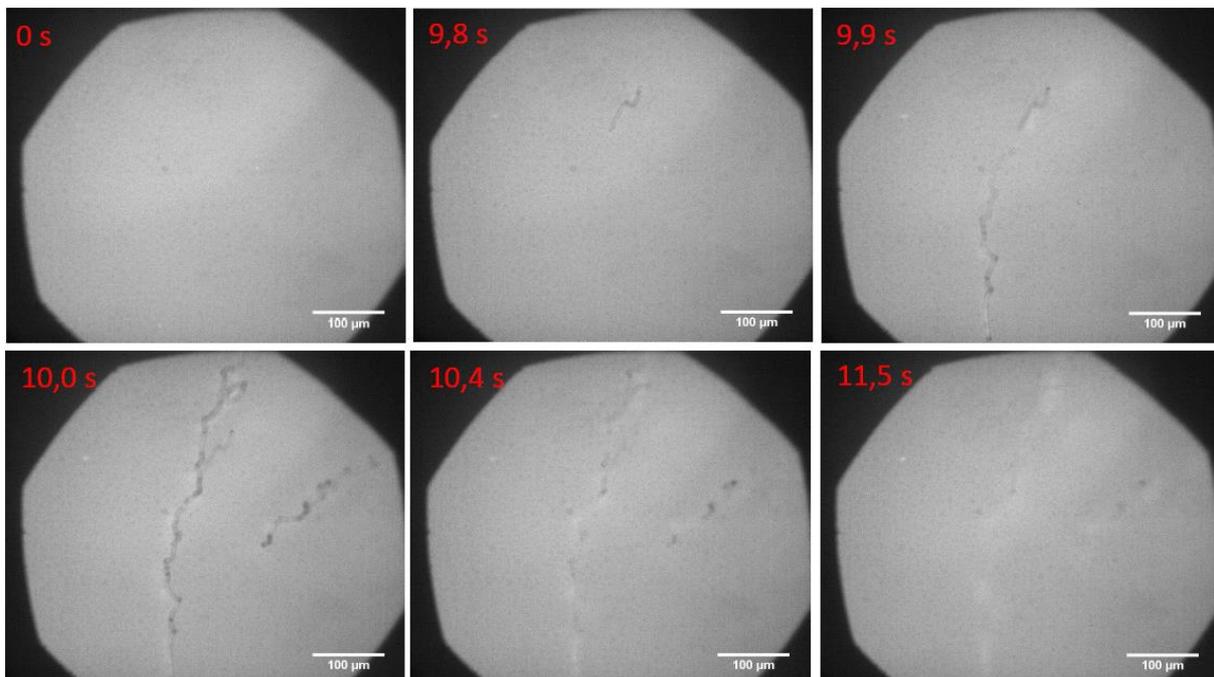


Figure 5 – Fissures se refermant : exemple d'images d'une vidéo où des fissures créées par les bulles de cavitation entre 9,8 et 10 s après le début de tir ultrasonore vont progressivement se refermer jusqu'à pratiquement disparaître à 11,5 s.

L'observation des bulles pendant la formation des fissures a permis néanmoins d'identifier deux comportements de bulles générateurs de fissures : des bulles survolant la paroi à forte vitesse puis disparaissant, et des bulles survolant la membrane et s'y écrasant. Une hypothèse pourrait être que les contraintes de cisaillements générées par ces bulles glissant rapidement au-dessus de la membrane pourraient arracher ou désorganiser les lipides, notamment sur le feuillet supérieur, tandis que l'écrasement d'une bulle en paroi serait quant à lui susceptible d'arracher des lipides des deux feuillets, conduisant à une lésion irréversible. Des visualisations en champ clair à la caméra rapide ont permis de mesurer les trajectoires de ces bulles rapides (cf. figure 6). Tout d'abord il faut noter que les vitesses de ces bulles sont de plusieurs mm/s à plusieurs cm/s, ce qui est élevé pour des bulles de paroi. Les trajectoires de bulles ont été superposées avec les images de fluorescence obtenues en fin de tir. Dans plusieurs cas, le passage d'une bulle en paroi semble associé à une fissure en fin de tir. Bien que cette analyse ne prenne pas en compte les fissures transitoires, elle corrobore le mécanisme de création de fissures par le passage d'une bulle sur la membrane. La configuration de sonoporation du tapis de cellules en culture étant très voisine de celle des membranes bilipidiques envisagées ici, ce mécanisme pourrait être avancé pour la sonoporation de cellules adhérentes. Par contre, concernant la transfection au sein d'un tissu biologique, le déplacement de bulles va être limité, ce qui ne devrait pas permettre un tel mécanisme pour la sonoporation cellulaire.

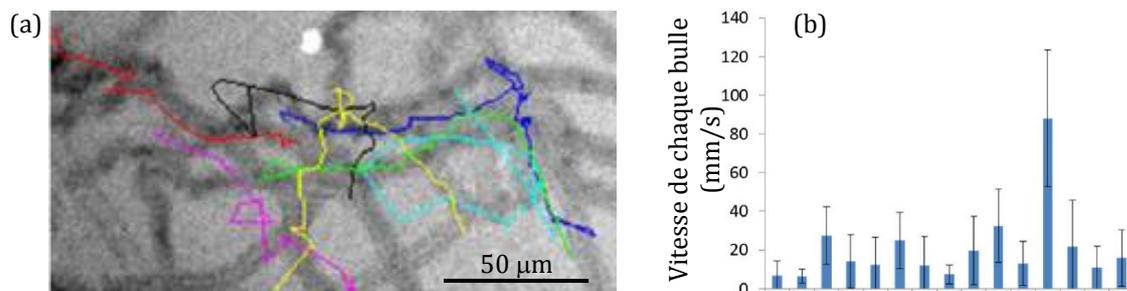


Figure 6 – Trajectoires et vitesses de bulles : (a) exemple d'image en fluorescence de fissures en fin de tir ultrasonore et principales trajectoires de bulles enregistrées dans la zone, (b) vitesse (moyenne et écart-type) de chacune des bulles détectées dans l'image précédente.

4 Conclusion

Des visualisations de membranes bilipidiques soumises à un champ de cavitation ultrasonore ont été menées. Différents types de lésions de la membrane sous l'effet du tir ultrasonore ont été enregistrées, et en particulier deux types de lésions ont été clairement identifiées : des impacts circulaires et des fissures. Les mesures en fluorescence ont montré que les impacts étaient liés à des bulles qui se posent sur la paroi, oscillent puis se détachent sur des échelles de temps de l'ordre de la seconde, créant des arrachements irréversibles de la membrane. Les fissures, qui seraient quant à elles liées au passage rapide de bulles sur la paroi, s'avèrent dans certains cas réversibles, avec des temps de réparation très variables allant dans nos mesures de 0,5 à 30 secondes. Des recherches complémentaires sont donc nécessaires pour comprendre les paramètres pilotant la réversibilité de ces fissures. Concernant l'extrapolation de ces mécanismes à la sonoporation cellulaire, de nouvelles visualisations en microscopie en champ clair et à fluorescence sur des tapis homogènes de cellules adhérentes pourraient permettre de voir si on retrouve dans ce cas les mécanismes identifiés ici sur une membrane bilipidique.

Remerciements

Ces recherches réalisées dans le cadre du LabEx CeLyA de l'Université de Lyon (ANR-10-LABX-0060, ANR-11-IDEX-0007) ont été financées par l'Agence Nationale de la Recherche (programme SonInCaRe 2010-TECS-003-01).

Références

- [1] S. Mitragotri, D. Blankschtein, R. Langer, Transdermal Drug Delivery Using Low-Frequency Sonophoresis, *Pharmaceutical Research*13 (1996) 411-420.
- [2] M. Minnaert, On musical air-bubbles and the sound of running water, *Philosophical Magazine*16 (1933) 235–248.
- [3] N.W. Miller, D.L. Miller, A.A. Brayman, A review of in vitro bioeffects of inertial ultrasonic cavitation from a mechanistic perspective, *Ultrasound Med Biol*22 (1996) 1131-1154.
- [4] P. Marmottant, S. Hilgenfeldt, Controlled vesicle deformation and lysis by single oscillating bubbles, *Nature*423 (2003) 153-156.
- [5] C-D. Ohl, M. Arora, R. Ikink, N. de Jong, M. Versluis, M. Delius, D. Lohse, Sonoporation from jetting cavitation bubbles, *Biophys Journal*91 (2006) 4285-4295.
- [6] A. Doinikov, A. Bouakaz, Theoretical investigation of shear stress generated by a contrast microbubble on the cell membrane as a mechanism for sonoporation, *J Acoust Soc Am*128 (2010) 11-19.
- [7] P. Muleki Seya, M. Fouqueray, J. Ngo, A. Poizat, C. Inserra, J-C. Béra, Sonoporation of Adherent Cells under Regulated Ultrasound Cavitation Conditions, *Ultrasound Med Biol*41 (2015) 1008–1019.
- [8] P. Labelle (épouse Muleki Seya), Sonoporation de cellules adhérentes par cavitation ultrasonore régulée, thèse de l'Université Lyon 1 (2014) n°273-2014.
- [9] C. Der Loughian, P. Muleki Seya, C. Pirat, C. Inserra, J-C. Béra, J-P. Rieu, Jumping acoustic bubbles on lipid bilayers, *Soft Matter* (2015).
- [10] M.S. Malghani, Generation and growth of bilayer defects induced by ultrasound, *J Acous Soc Am*103 (1998) 1682-1685.