Générateur de cavitation reproductible : exemples d'application biologique *in vitro*

Jean-Louis Mestas, Jhony El-Maalouf, Claude Inserra, Bruno Gilles, Jean-Christophe Bera
INSERM U556
Université de Lyon
69003 Lyon
E-mail : jean-louis.mestas@inserm.fr

Lina Reslan, Charles Dumontet
INSERM U590
Centre Léon Bérard
Université Lyon 1
69008 Lyon
E-mail : lina.reslan@inserm.fr

Résumé
La cavitation ultrasonore peut conduire à différents types d'effets biologiques en fonction de son intensité. Ces effets, très destructeurs, présents en lithotritie, en hyperthermie par HIFU ou en histotritie, peuvent aussi réaliser, pour des intensités moindres, des pores cellulaires de taille suffisante pour permettre l'entrée de particules, de matériels génétiques ou de produits chimiques. Dans ces dernières applications, la cavitation n'apparaît pas systématiquement et les expérimentations nécessitent souvent des adjuvants comme les produits de contraste utilisés comme germes de cavitation. Nous avons développé un générateur continu de cavitation, travaillant dans la plage d'intensité acoustique de 0,2 à 3,5 W/cm^2, et régulé (cadencement : 5 ms) sur un indice de cavitation (CI) établi à partir du signal acoustique émis par la cavitation. Ce dispositif, grâce à la reproductibilité du processus de cavitation générée, a permis de caractériser en sonodynamothérapie les effets potentialisateurs d'un photosensibilisant (Photofrin©) et de transfecter des cellules non-adhérentes (RL du lymphome folliculaire ou LLC de Leucémie Lymphoïde Chronique) très difficiles à transfecter par ailleurs (électroporation, lipofection). Le Photofrin©, additionné au milieu de culture (incubation de 30 min), potentialise l'effet cytotoxique induit par la cavitation, de sa phase stable à transitoire, avec une liaison très forte avec le CI (r^2>0,95). Nos travaux ont montré une plus grande sensibilité, induite par le Photofrin©, des membranes cellulaires aux contraintes mécaniques. Dans l'étude du dysfonctionnement des mécanismes régulateurs de l'apoptose des LLC par le ciblage des gènes responsables de la chimiorésistance, la transfection de siARNs correspondants a pu être réalisée. Les taux de transfection sont reproductibles, de 10% pour le plasmide pEGFP à près de 30% pour un siARN (BCL2L1), avec une mortalité résiduelle réduite à 20%. Ce dispositif a aussi permis d'élaborer un modèle de tumeur fluorescent, par une transfection «stable» de plasmides, pour des études de tumorogénèse.

La transfection génique est l'internalisation de matériaux génétiques au sein de la cellule vivante. Le développement de vecteurs de transfection fiables et peu invasifs constitue actuellement un enjeu majeur pour le développement de la thérapie génique. Les ultrasons sont proposés à ce titre depuis une vingtaine d'années [1] et ont fait l'objet de nombreuses études en transfection [2-3]. Bien que les mécanismes exacts de sonoporation restent mal connus, le phénomène de cavitation ultrasonore, qui comprend l'oscillation et éventuellement l'implosion de bulles sous l'effet du champ acoustique, apparaît jouer un rôle majeur dans ce phénomène. En effet, s'il est vrai que les ultrasons, même à faible niveau, peuvent modifier le comportement cellulaire (par exemple l'accélération ultrasonore de la reconstruction osseuse [4]), l'effet direct des ultrasons sur la perméabilité cytoplasmique ne semble pas prépondérant. La transfection apparaît pour des intensités acoustiques conséquentes (supérieures à quelques centaines de mW/cm^2) et suffisantes pour créer de la cavitation. D'une part, l'oscillation de microbulles au voisinage des cellules et les micro-courants qui en découlent pourraient générer des contraintes significatives sur les parois cellulaires et modifier leur perméabilité. D'autre part, l'implosion de ces bulles (correspondant au phénomène de cavitation inertielle) sous l'effet de fluctuations acoustiques intenses se caractérise par des concentrations très intenses et très localisées d'énergie, qui sont notamment à l'origine de micro-jets très violents, susceptibles de trouer n'importe quelle paroi cytoplasmique, voire de sectionner ou déchiqueter totalement des cellules.

La cavitation ultrasonore est donc susceptible de modifier la porosité cellulaire et de détruire les cellules. Cet effet de destruction est d'ailleurs plus ou moins mis à contribution en appui à l'effet thermique, pour la nécrose des tissus dans le traitement des tumeurs cancéreuses par ultrasons de forte intensité [5]. Dans ce domaine thérapeutique, il est également l'objet de recherches spécifiques concernant des applications qui combineraient les

ultrasons avec des agents pharmacologiques, comme la délivrance de drogue localisée [6] ou l'excitation de sono-sensibilisant en sonodynamothérapie [7]. En tout état de cause, l'utilisation des ultrasons en thérapie génique (transfection) est délicate car la sonoporation et la destruction cellulaire apparaissent pour des niveaux ultrasonores apparemment similaires. Et, même si l'utilisation d'agents de contrastes ultrasonores ou l'augmentation de la quantité de gaz dissous dans le milieu permettent de favoriser la transfection [8], il est difficile d'obtenir des rendements de transfection conséquents sans effets cytotoxiques majeurs. De plus, la cavitation ultrasonore apparaît comme un phénomène très aléatoire, notamment quand le point de fonctionnement se situe au voisinage du seuil de cavitation inertielle. Aussi, pour une intensité acoustique donnée, l'état de cavitation peut être très différent et instationnaire. Puisque la sonoporation est dépendante des aléas du phénomène de cavitation, lui-même non-maîtrisable par un système d'irradiation à intensité acoustique constante, ces études de sonoporation sont complexes à mettre en œuvre. Un contrôle pertinent et permanent de l'activité de cavitation dans le milieu irradié sera susceptible de fortement réduire, voire supprimer l'influence du dispositif physique et des conditions expérimentales dans les essais biologiques répétitifs. À cette fin, un dispositif de régulation du niveau de cavitation a été développé. Il s'appuie sur un critère de niveau de cavitation (indice de cavitation CI) déterminé à partir du signal acoustique issu du milieu cavitant [9].

Pour évaluer ce nouveau générateur, nous proposons de présenter son emploi dans deux applications :
- son implication dans une étude concernant la caractérisation des mécanismes de destruction cellulaire potentialisée par un agent photosensibilisant : le Photofrin© (PF) ;
- son emploi comme moyen de transfection le plus approprié pour certaines cellules en suspension.

Matériels et méthodes

Dispositif expérimental

Fig. 1 : Dispositif expérimental ; a) Dispositif d'irradiation ultrasonore positionné sous la plaque de culture utilisant l'eau comme couplant ; b) Vue latérale et c) vue supérieure du dispositif

Le milieu à irradier est placé dans des puits d'une plaque de culture cellulaire, à raison de 2 ml par puits (plaque 12 puits en polystyrène ; diamètre des puits : 20 mm ; BD Science). L'onde ultrasonore est générée par un transducteur piézoélectrique plan de diamètre 20 mm, situé à 9 mm en dessous du puits. Le tout est placé dans un bain d'eau dégazée qui assure le couplage acoustique.

L'excitation ultrasonore est une onde sinusoïdale continue de fréquence f_0 = 445 kHz. La durée d'irradiation ultrasonore choisie sera généralement de 60 s. L'intensité acoustique maximale délivrée est de 3,5 W.cm^{-2} en moyenne spatiale, et la pression maximale est de 0,63 MPa. Latéralement au transducteur et sur le même support est fixé un hydrophone en PVDF (bande passante : 10 MHz) de diamètre 10 mm, orienté vers le puits irradié. Il permet de relever le signal acoustique diffusé au travers de ce puits. Le signal de réception est amplifié (20 dB, BX31, NF Electronic Instruments) numérisé (carte d'acquisition PXI-5620, résolution 14 bits, fréquence d'échantillonnage 64 MHz, National Instruments), transféré sur un calculateur (PC + LabVIEW) puis traité (Figure 2). Ce traitement consiste à en déterminer le spectre fréquentiel dans la bande 0,1 à 7,1 MHz puis un indice de cavitation (CI) comme la moyenne arithmétique des intensités acoustiques en dB sur les fréquences considérées [9]. Ce critère CI d'évaluation de la cavitation acoustique permet de mieux prendre en compte le bruit large bande associé à la cavitation inertielle au profit des raies fréquentielles associées principalement à la fréquence de la source ultrasonore.

Le processus de régulation s'appuie sur un modèle de type «boite noire» à une entrée (CI) et une sortie (puissance d'excitation) et sur la technique de régulation par commande prédictive parfaitement adapté à ce modèle. Ainsi, à chaque boucle de contrôle (cadencement 200 Hz), la régulation prend en compte l'état actuel du processus et deux états antérieurs pour établir la commande de puissance à appliquer (Figure 2).

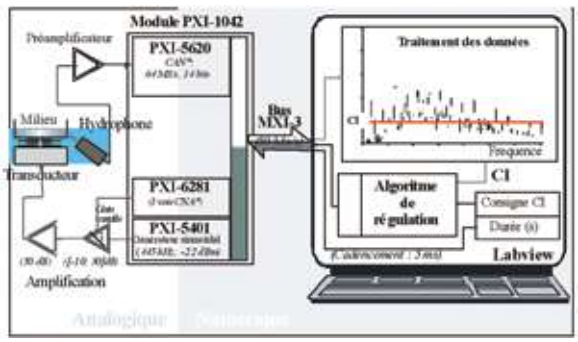

Fig. 2 : Schéma général du dispositif de contrôle de cavitation. La commande de puissance est traduite en contrôle de gain d'un amplificateur à gain variable

Aspect biologique

Les cultures de cellules tumorales adhérentes AT2 (Dunning R 3327) sont réalisées dans un incubateur à 37°C pendant 3 jours (durée moyenne nécessaire aux cellules pour atteindre la fin de leur phase exponentielle de croissance). Les cellules sont alors lavées (PBS 1X), décollées (mélange trypsine-EDTA 1X), lavées à nouveau, centrifugées et placées dans du milieu de culture sans sérum à raison 2,5.10^6 cellules/ml. Ce milieu est réparti dans des puits de plaque de culture (12 puits, BD) à raison de 2 ml/puits. Ces échantillons de culture sont partagés en 2 groupes. À chaque puits de l'un des groupes est rajouté du Photofrin© PF (20 µg/ml ; volume additionnel : 40 µl). Les 2 groupes sont ensuite placés en incubation pendant 20 min avant de réaliser le traitement ultrasonore.

Comme les cellules sédimentent rapidement, les plaques sont continuellement agitées pour maintenir les cellules en suspension avant de placer le puits face au transducteur et procéder à l'insonification.

La mortalité cellulaire est quantifiée par cytométrie en flux (FACScan, Becton Dickinson). Préalablement, les échantillons de cellules des 2 lots sont incubés indépendamment avec du Iodure de Propidium (PI ; longueur d'onde d'émission : 617 nm), un marqueur de cellule morte ou mourante. Ces échantillons sont ensuite placés tour à tour dans le cytomètre. Le flux de cellules est illuminé par un laser de longueur d'onde 488 nm. La lumière diffusée par la cellule dans l'axe du rayon incident donne des informations concernant sa taille (FSC : Foward Scatter Channel) et sa viabilité grâce au fluorochrome utilisé (PI). L'emploi du filtre FL2 (filtre passe bande 585 ± 21 nm) permet de sélectionner spécifiquement la bande d'émission du PI (fluorescence). Les cellules marquées vont fluorescer plus intensément que les cellules non marquées (vivantes). Ceci permet, à partir du comptage de 10 000 événements, de déterminer le taux de mortalité. Deux exemples de comptage sont présentés sous forme de diagramme de points figure 3. L'un concerne un échantillon témoin et l'autre un milieu irradié à CI=12. Chaque diagramme présente 2 distributions de points denses et homogènes correspondant, sur le quadrant de gauche, aux cellules vivantes et sur celui de droite, aux cellules mourantes et/ou mortes. Lorsque le taux de mortalité d'un témoin excède 10%, l'ensemble des échantillons de son groupe n'est pas pris en compte (cas de contamination cellulaire ou de l'exposition trop longue des milieux avec PF à la lumière extérieure). Pour ne prendre en compte que les effets induits par ultrasons ou les effets combinés ultrasons et PF, à la valeur de mortalité de l'échantillon est déduite la mortalité du témoin du même groupe.

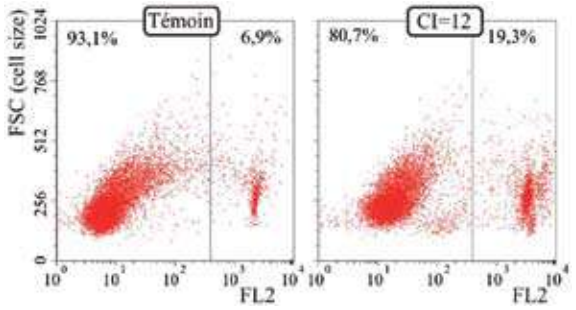

Fig. 3 : Exemple de diagramme de points délivrés par le cytomètre en flux et son programme de contrôle CellQuest. Chaque point correspond à une cellule caractérisée par sa dimension en ordonnée et sa fluorescence au travers d'un filtre FL2 en abscisse

Les études de transfection ont été conduites sur des cellules de lymphome folliculaire RL et des cellules LLC fraîches (Leucémie Lymphoïde Chronique) issues de prélèvements chez des patients qui ont accepté par écrit le protocole d'étude approuvé par le comité ad hoc des Hospices Civils de Lyon. Les cellules sont alors isolées par centrifugation en gradient de densité. En finalité, les cellules RL ou LLC sont mises en suspension dans du milieu de culture (RPMI + SVF 10% + 200 UI/ml pénicilline + 200µg/ml streptomycine) à raison de 2 ml par puits (plaque 12 puits) et de 2.10^6 cellules/ml. Dans le cadre de ces études, une première étape a permis de déterminer les paramètres acoustiques optimaux pour chaque type de cellules afin d'obtenir le meilleur compromis entre efficacité de la transfection (plasmide pEGFP-C2, 25 µg/ml, λ_{em}=507 nm) et viabilité résiduelle. La mortalité cellulaire (marqueur 7-AAD, λ_{em}=660 nm) et le taux de transfection sont obtenus par comptage en cytométrie respectivement et simultanément sur FL3 (>670 nm) et FL1 (530/30 nm). Une seconde étape a permis l'évaluation de la transfection transitoire des siARNs (small interfering ARNs) fluorescents (siARNs contrôl et siARNs *BCL2L1*, 7,5 µg/ml ; Qiagen) dans les cellules LLC afin d'inhiber le gène *BCL2L1*. L'internalisation de ces siARNs a été confirmée par western Blot en testant le niveau protéique du gène *BCL2L1* avec un anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt.

Parallèlement, une transfection stable a été effectuée avec 2 plasmides pGL3 (25 µg/ml ; Promega) et pcDNA3 (25 µg ml ; Invitrogen) conjointement dans des cellules RL en vue de leur clonage. Le plasmide pGL3 code pour la luciférase et le plasmide pcDNA3 contient un gène de résistance à la Généticine (G418), antibiotique permettant la sélection des cellules transfectées avant leur clonage.

Résultats et discussions

Cytotoxicité ultrasonore (figure 4)

Près de 80 échantillons ont été irradiés, pour des CI compris entre 6 et 20, à raison de 16 à 18 échantillons par jour d'expérimentation. La figure 4 rassemble les données des mesures de mortalité effectuées selon les 2 conditions avec ou sans PF. L'évolution de la mortalité croît de manière monotone et continue avec CI entre 2 limites : l'une, à l'origine de la distribution, correspond à une mortalité nulle (milieu non irradié : témoin) et l'autre, pour les fortes valeurs de CI, identifie une destruction totale des cellules. Ainsi, l'évolution de la mortalité avec CI semble suivre une forme sigmoïdale.

Une identification des courbes de régression a été réalisée pour chaque condition (PF) selon le modèle de Weibull (2P) :

Condition		Sans PF	Avec PF
Paramètres	A	$9,46\ 10^{-6}$	$56,96\ 10^{-6}$
	B	3,96	3,54
Erreur-type approchée	A	$1,33\ 10^{-6}$	$7,51\ 10^{-6}$
	B	0,085	0,280
Intervalle de confiance /A	LIC	$1,58\ 10^{-6}$	$34,86\ 10^{-6}$
	LSC	$4,38\ 10^{-6}$	$91,19\ 10^{-6}$
Intervalle de confiance /B	LIC		3,39
	LSC	4,59	3,72
Coefficient de détermination Mortalité/CI (r^2)		0,94	0,99
Homoscédacité (p_{value} Test de Levene)		0,1	0,16
Résidus (p_{value} Test de Shapiro-Wilk)		0,33	0,93

Table 1 : Coefficients des courbes de régression non-linéaire et données statistiques associées. LIC et LSC : limite inférieure et supérieure de l'intervalle de confiance

Le tableau 1 rassemble les données statistiques concernant le choix de ce modèle. En premier lieu, la mortalité est fortement corrélée avec les *M[CI]* correspondant. La variabilité des données (mortalité) autour de leur courbe d'interpolation respective est parfaitement homogène (Test de Levene).

De plus les résidus pour chaque condition sont distribués normalement et correspondent au bruit de fond attaché aux mesures. Ainsi, le modèle choisi caractérise parfaitement l'évolution de la mortalité en fonction de CI, que ce soit avec ou sans PF. Les intervalles de confiance sont relativement réduits autour des courbes d'interpolation et plus particulièrement pour les traitements avec PF (figure 4).

Ceci pourrait être la conséquence de la condition restrictive imposée sur le témoin (limite fixée à 10%) qui a conduit à l'élimination de quelques expériences avec PF. En effet, une erreur systématique difficilement contrôlable est due à l'excitation du PF par des sources de lumière extérieures d'intensités variables dépendantes des conditions météorologiques et de la durée des manipulations post-traitement. Il est fort probable que, pour les groupes sans PF, une condition restrictive de même type, impliquant une mortalité du témoin réduite (absence de PF ; influence de la lumière négligeable), conduise à la même observation.

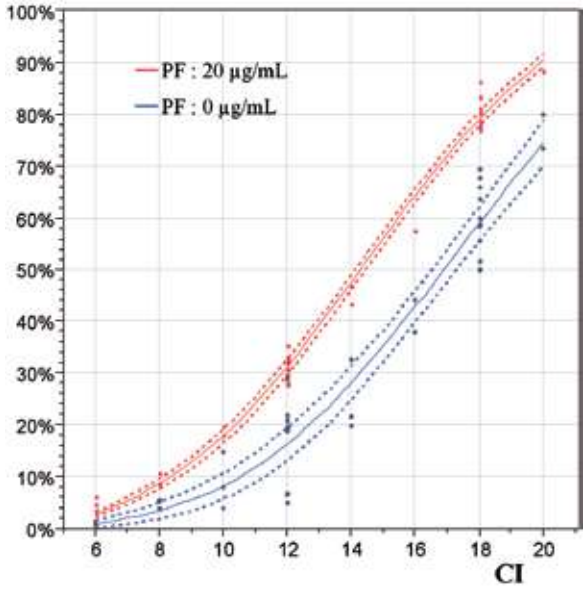

Fig. 4 : Mortalité des cellules AT2 en fonction de CI appliquée. Courbes d'interpolation des données et intervalles de confiance associés

Le PF induit un effet cytotoxique complémentaire à celui des ultrasons (cavitation). L'écart de la mortalité cellulaire avec et sans PF, pour un CI donné, caractérise le gain de mortalité induit par le PF. Il correspond à l'effet potentialisateur du PF qui reste systématiquement positif quel que soit le CI considéré. Cet effet, que les auteurs associent à un mode d'excitation du produit par sonoluminescence ou par l'action des radicaux libres créée par la cavitation inertielle [11,12], est aussi présent pour des niveaux de cavitation très faibles (CI<10) correspondant, pour ce système, à une phase de cavitation quasi-stable. Ces observations vont à l'encontre des hypothèses proposées. L'apparition de la phase transitoire du phénomène de cavitation se distingue par une courbure croissante très prononcée (Figure 4 ; PF : CI [8-10] ; sans PF : CI [10-12]). En effet, la cavitation stable reste très peu cytotoxique et les spectres de fréquences, relevés pour CI=6, ne permettent pas de conclure sur la présence d'une activité de cavitation inertielle conséquente à l'instar des spectres relevés pour CI=12 et CI=18 (Figure 5). Rappelons que la cavitation inertielle est décelable par l'augmentation du bruit blanc et le spectre de cavitation pour CI=6 reste «collé» au spectre de référence (figure 5).

À partir de ces observations, nous avons émis l'hypothèse que le PF a la propriété de fragiliser, du point de vue mécanique, les cellules qui, sous les contraintes appliquées par le champ de bulles présent dans le milieu vont les conduire vers une voie apoptotique et une mort cellulaire certaine. Des essais complémentaires, qui ne font pas l'objet de ce propos, ont permis de valider cette hypothèse (7) grâce à une reproductibilité des effets induits par ce dispositif ultrasonore.

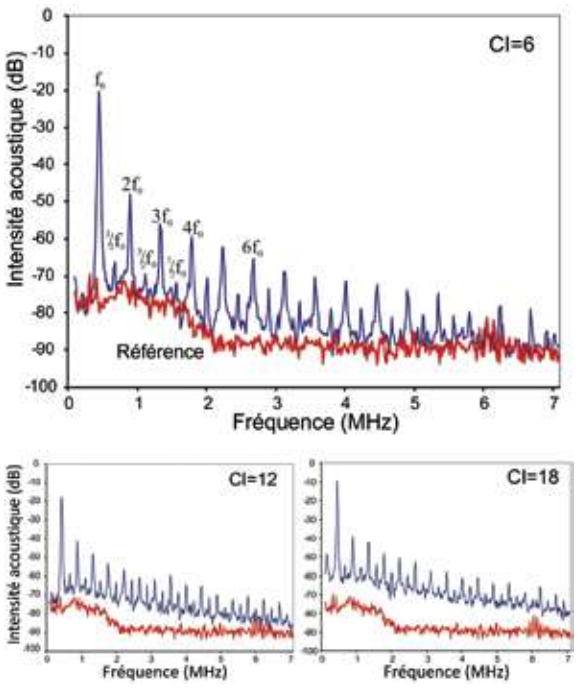

Fig. 5 : Spectres fréquentiels du signal acoustique provenant de l'enceinte irradié pour 3 conditions d'irradiation CI : 6, 12 et 18. Les spectres présentés correspondent à la moyenne de 12 spectres instantanés prélevés toutes les 5 secondes. De même, le spectre de référence est obtenu lorsque l'excitation ultrasonore est inhibée (f_0 : fréquence d'excitation ultrasonore, 445 kHz)

Afin de montrer l'efficacité du mode de contrôle de ce dispositif, la figure 6 présente la mortalité cellulaire en fonction de l'intensité acoustique moyenne appliquée. Cette représentation fait apparaître une plus grande dispersion de la mortalité en fonction de l'intensité quelle

que soit la série de données (avec ou sans PF). Notons par exemple que, pour la série sans PF et une intensité de 0,9 W/cm^2, la mortalité peut prendre des valeurs extrêmes de 20% et 70%.

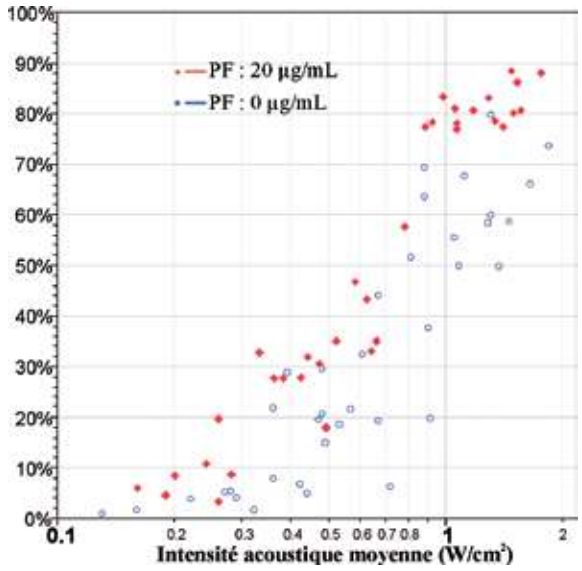

Fig. 6 : Mortalité cellulaire en fonction de l'intensité acoustique moyenne appliquée pendant 1 min. (représentation de la figure 4 sous une autre forme)

Une même mortalité peut être obtenue pour des intensités présentant une différence de près de 1 W/cm^2 (par exemple : 80 % de mortalité pour des intensités extrêmes de 0,8 et 1,7 W/cm^2 pour la série avec PF). L'effet potentialisateur du PF est visible avec une distribution de points qui se place en limite supérieure de la série de données sans PF. L'évolution croissante de la mortalité pourrait être interpolée par une fonction Logarithme.

Cependant, la variabilité est inhomogène et la distribution des résidus est anormale. Bien que le dispositif employé permette d'activer le phénomène de cavitation quel que soit l'état initial du milieu (pas de démarrage tardif ou d'extinction de la cavitation au cours du temps [13]), l'intensité acoustique reste très fluctuante pour un CI donné (figure 7). Elle correspond à l'intensité nécessaire pour entretenir le phénomène de cavitation au sein du milieu sur un niveau particulier. La fluctuation de l'intensité acoustique, relevée ici, serait principalement due aux conditions expérimentales (température ambiante, pression atmosphérique, gaz dissous dans le milieu).

Ceci montre indirectement que l'intensité acoustique n'est pas le meilleur critère acoustique à employer pour le contrôle de la cavitation. L'index de cavitation (CI) est un critère plus pertinent et s'affranchit des conditions expérimentales extérieures. Il ne reste cependant applicable que dans des conditions strictes d'utilisation avec des milieux irradiés ayant les mêmes paramètres physiques (viscosité, densité, volume) paramètres qui influent fortement sur le comportement vibratoire des bulles de cavitation.

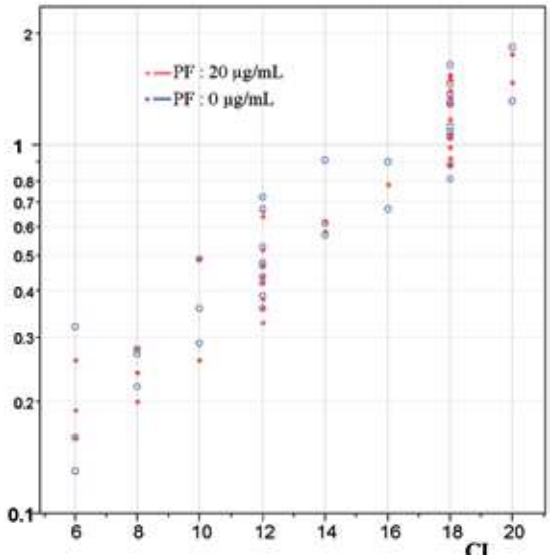

Fig. 7 : Evolution de l'intensité acoustique moyenne appliquée en fonction de la commande du processus de régulation (CI)

Pour conclure, le processus de régulation sur l'indice de cavitation CI assure une reproductibilité des effets cytotoxiques induits par le phénomène de cavitation dans les conditions d'irradiations contrôlées et continues. Les perturbations du dispositif d'irradiation dans les résultats biologiques sont très minimes s'il est pris soin de travailler dans les mêmes conditions (milieu de culture, concentration cellulaire, etc.). La variabilité des mesures dépend alors principalement des traitements cellulaires successifs nécessaires à l'évaluation des effets induits.

Transfection [14]

Le système de cavitation régulé est aussi utilisé dans des études biologiques concernant le dysfonctionnement des mécanismes régulateurs de l'apoptose en leucémie (LLC) et dans la réalisation de modèle tumoral fluorescent (RL) dans le cadre d'étude de tumorogénèse. Les paramètres d'irradiation, CI et durée, ont été optimisés afin d'obtenir les meilleures conditions de transfection pour chaque type cellulaire, qui sont un compromis entre l'efficacité de la transfection et la viabilité. Ainsi la transfection du plasmide pEGFP-C2 s'exprimant dans le vert (figure 8) a permis de valider ces conditions rassemblées dans le tableau 2.

Cellules	Plasmide siARN	Transfection	Viabilité	CI	Durée (s)
RL	pEGFP-C2	15 ± 1,5 % $p_{value} < 0,05$	80 ± 7 %	16	30
LLC	pEGFP-C2	6 ± 1 % $p_{value} < 0,0001$	83 ± 10 %	20	80
LLC	BCL2L1	29 ± 4 %		20	80
LLC	scramble contrôle	28 ± 8 %		20	80

Tabl. 2 : Paramètres privilégiés pour la transfection de cellules LLC ou RL et essais de transfection de siARNs fluorescents. Résultats obtenus 48h après la sonoporation

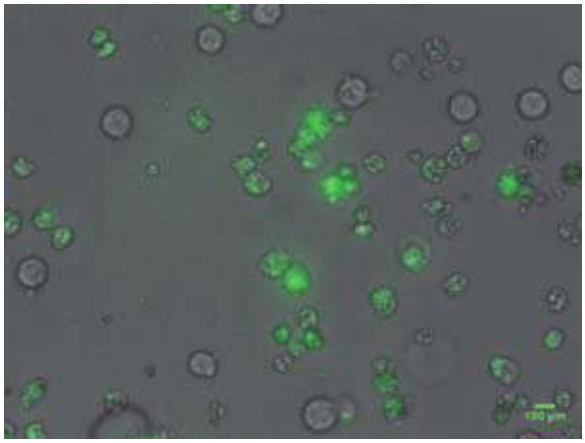

Fig. 8 : Cellules RL transfectées par le plasmide pEGFP-C2 (fluorescence verte)

La transfection des cellules LLC par un siARN *BCL2L1* est suffisante pour aborder sereinement des études plus pertinentes sur la dérégulation des voies apoptotiques. Le dispositif ultrasonore constitue un moyen sûr et fiable de transfection de ce type cellulaire et a montré son efficacité vis-à-vis d'autre méthode comme l'électroporation, la lipofection ou plus récemment la nucléofection. Concernant la transfection de la combinaison de 2 plasmides pGL3 et pcDNA3 dans les cellules RL, les essais ont permis de montrer qu'il est tout à fait possible d'obtenir une transfection stable par sonoporation. Ainsi, après une phase sélective des cellules transfectées par G418, le clonage des cellules consiste à disperser en moyenne moins de 1 cellule par puits de plaques 96 puits, de repérer les clones bioluminescents par addition de luciférine (système d'imagerie NightOWL) et de mettre en culture ces clones bioluminescents. Ainsi les gènes transfectés sont transcrits par les cellules lors de leur multiplication (transfection stable). Ce modèle tumoral, ainsi construit, est validé *in vivo* par une injection sous-cutanée de souris SCID. La tumeur se développe parfaitement comme le montre l'image de fluorescence réalisée par NightOWL 21 jours après l'injection (figure 9).

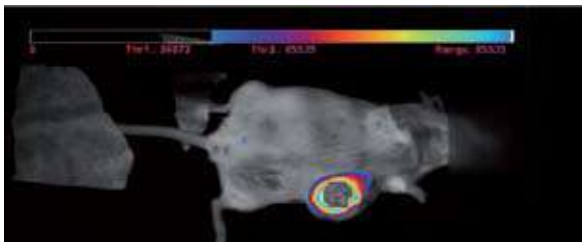

Fig. 9 : Localisation de la tumeur bioluminescente par NightOWL

Conclusions

La régulation de la cavitation dans des milieux de culture biologique assure la maîtrise du phénomène de cavitation avec une stabilité et une reproductibilité de ses effets tant en cytotoxicité qu'en poration cellulaire. Le critère de contrôle CI, image du niveau de cavitation générée dans le milieu, paraît très satisfaisant dans ce régime continu d'irradiation ultrasonore.

Les biologistes de l'unité U590 de l'INSERM ont trouvé, au travers de ce dispositif, un moyen simple, efficace et sûr de transfection de cellules en suspension qui est en temps normal extrêmement complexe à mettre en œuvre par les méthodes de transfection classiques et/ou appropriées à ce type cellulaire. La stabilité et la reproductibilité de ses effets en font un outil propice aux voies d'études nécessitant la transfection de matériels génétiques sans adjuvants perturbateurs.

Remerciements

Le financement du dispositif a été supporté par l'Association Française de myopathie AFM (contrat # 9594) et les essais expérimentaux ont été subventionnés par l'Agence National de la Recherche (ANR06-BLAN0405). Les auteurs remercient S. Chesnais pour son travail en biologie ainsi que C. Vanbelle et le personnel de la plateforme CeCIL de l'IFR62, et L. Alberti (Equipe Cytokine et Cancer de l'U590 INSERM) pour leur soutien et aide technique.

Références bibliographiques

[1] Fechheimer M., Boyla J.F., Parker S., Sisken J.E., Patel G.E., Zimmer S.G., «Transfection of mammalian cells with plasmid DNA by scrape loading and sonication loading», Proc Natl. Acad. Sci. USA 84 (23), 8463-8467, (1987)

[2] Kim I.J., Greenleaf J.F., Kinnick R.R., Bronk T.J., Bolander M.E., «Ultrasound-mediated transfection of mammalian cells», Human Gene. Ther. 7 (11), 1339-1346, (1996)

[3] Bao S., Thrall B.D., Miller D.L., «Transfection of a reporter plasmid into cultured cells by sonoporation in vitro», Ultrasound Med. Biol. 23 (6), 953-959, (1997)

[4] Lavandier B., Gleizal A., Béra J.C., «Experimental assessment of calvarial bone defect re-ossification stimulation using low-intensity pulsed ultrasound», Ultrasound Med. Biol. 35 (4), 585-594, (2009)

[5] Murat FJ, Poissonnier L, Pasticier G, Gelet A., «High-intensity focused ultrasound (HIFU) for prostate cancer». Cancer Control 14 (3), 244-249, (2007)

[6] Lafon C., Somaglino L., Bouchoux G., Chesnais S., Mestas J.-L., Matias A., Chapelon J.-Y. «Design and test of an ultrasonic experimental set-up for controlled delivery of encapsulated chemotherapy» IRBM 30(4), 171-173, (2009)

[7] El Maalouf J., Béra J.C., Alberti L., Cathignol D., Mestas J.L, « In vitro sonodynamic cytotoxicity in regulated cavitation conditions». Ultrasonics 49 (2), 238-243, (2009)

[8] Ogawa R., Kondo T., Honda H., Zhao G.L., Fukuda S., Riesz P., «Effects of dissolved gases and an echo contrast agent on ultrasound mediated in vitro gene transfection», Ultrasonics Sonochemistry 9 (4), 197-203, (2002)

[9] Frohly J., Labouret S., Bruneel C., Looten-Baquet I., Torguet R., «Ultrasonic cavitation monitoring by acoustic noise power measurement», J. Acoust. Soc. Am. 108 (5 Pt1), 2012, (2000)

[10] Villeneuve L., Alberti L., Steghens J.-P., Lancelin J.-M., Mestas J.-L., «Assay of hydroxyl radicals generated by focused ultrasound», Ultrasonics Sonochemistry 16 (3), 339–344, (2009)

[11] Umemura S., Yumita N., Umemura K., Nishigaki R., «Sonodynamically induced effect of rose bengal on isolated sarcoma 180 cells, Cancer Chemoth. Pharm. 43, 389–393, (1999)

[12] Misik V., Riez P., Free radical intermediates in sonodynamic therapy, Ann. NY. Acad. Sci. 899, 335–348, (2000)

[13] Mestas J.-L., Alberti L., Chesnais S., Lafon C., Blay J.-Y., Cathignol D., «Initiate and Maintain Cavitation by Combining High Amplitude Bursts and Continuous Ultrasound Exposure in Culture Medium», Therapeutic Ultrasound, 5th ISTU, 573-577 (2005)

[14] Reslan L., Herveau S., Mestas J.-L., Dumontet C., «Transfection of cells in suspension by ultrasound cavitation», Journal of Controlled Release, 142(2), 141-148, (2010)