UNIVERSITÉ FRANÇOIS - RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE « Santé, Sciences, Technologies »

INSERM U930 « Imagerie et Cerveau »

THÈSE présentée par :

Truong-An TRAN

soutenue le : **10 octobre 2008**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Mécanismes d'interaction cellules-microbulles et ultrasons

THÈSE dirigée par :

Directeur de thèse : M. BOUAKAZ Ayache	Chargé de Recherche, INSERM Tours
Co-directeur : M. LE GUENNEC Jean-Yves	Professeur, Université François - Rabelais

RAPPORTEURS :

M. Bois Patrick	Professeur, Université de Poitiers
Mme BRIDAL Lori	Chargée de Recherche, CNRS Paris

JURY :

M. Bois Patrick	Professeur, Université de Poitiers
M. BOUAKAZ Ayache	Chargé de Recherche, INSERM Tours
Mme BRIDAL Lori	Chargée de Recherche, CNRS Paris
M. CHARNET Pierre	Directeur de Recherche, CNRS Montpellier
M. LE GUENNEC Jean-Yves	Professeur, Université François - Rabelais
M. TRANQUART François	Professeur, Université François - Rabelais

Ce travail a été réalisé au sein de l'UMR « Imagerie et Cerveau »,

Inserm U930 Cnrs fre2448

Directeur : Dr. D. Guilloteau

Equipe 5 : « De la maturation à la dégénérescence »

Responsable : Pr. F. Tranquart

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration étroite avec

le laboratoire « Nutrition, Croissance et Cancer »

Université François Rabelais, Inserm U921

Directeur : Pr. P.Bougnoux



Truong-An Tran a été financé pendant sa thèse par une bourse co-financée par le Conseil Régional d'Indre et Loire et l'entreprise VERMON.

Remerciements

Il est vraiment difficile d'exprimer sa gratitude lorsqu'il n'existe pas de mot assez fort pour le faire. J'ai eu la chance, contrairement à beaucoup de gens qui vont au travail, d'aller rejoindre tous les matins, dans une sorte de second chez moi, une famille un peu spéciale, une famille scientifique. Comme toute famille, celle-ci m'a permis de grandir et de m'épanouir scientifiquement. Il n'y a donc rien que je puisse dire ou faire pour les remercier suffisamment pour tout ce qu'ils m'ont apporté. Je suis et je reste persuadé qu'un travail de thèse ne peut se faire seul, que la qualité d'un travail n'est due qu'à un environnement propice. Le seul regret de ma thèse sera la fin car elle sonne l'heure des « à bientôt, j'espère qu'on aura l'occasion de se revoir…»

Dr Ayache Bouakaz : *Merci d'avoir été mon directeur de thèse et de m'avoir aidé et supporté tout au long de ces années.*

Pr. Jean –Yves Le Guennec : *Merci Jean-Yves pour tous ces précieux conseils, de m'avoir éclairé et guidé dans la voie professionnelle que je prends actuellement.*

Merci à l'équipe : UMR U930 « Imagerie et Cerveau »

Pr. François Tranquart : *merci de m'avoir soutenu tout au long de ces années, plus de 6 années depuis mon premier stage.*

Pr. Léandre Pourcelot : *je tenais à vous remercier parce que vous avez été mon premier contact dans le monde de la recherche. Je pense, au moment où j'écris cette thèse, que tout à commencer grâce vous. En effet, vous m'avez donné l'opportunité de faire mon premier stage.*

Merci à tous les membres de cette immense unité de m'avoir accepté parmi vous. Un merci très spécial au laboratoire RMN et à l'animalerie (Mme L. Nadal-Desbarat, Mme S. Serrières, Mme V. Schubnel, M. J. Montharu,…) qui m'ont toujours aidé, toujours de bons conseils de mes premiers stages à la dernière année de thèse.

Merci au laboratoire : INSERM U921 « Nutrition, Croissance et Cancers »

Pr. Philippe Bougnoux : *merci de m'avoir accepté dans son laboratoire et permis de réaliser ce travail de thèse.*

Merci au laboratoire N2C, certainement le lieu où j'aurai passé le plus de temps à travailler bien sûr. Merci à tous ces membres de m'avoir intégré dans leur équipe et de m'avoir accepté comme l'un des leurs.

Merci au département de microbiologie : EA3854 – Bactéries et risque materno-fœtal

Merci à toute l'équipe enseignante (Mme Roseneau, Mlle Lefur, Mme Dupuy, Mme Petit,…) pour leur disponibilité et leurs conseils, leur gentillesse et surtout leur amitié. Je ne peux non plus oublier l'équipe technique (Fabien, Isabelle,…) pour leur aide indispensable et pour tous les bons moments. Désolé, vous ne verrez plus…léopard.

A mes collègues, mes camarades, mes amis, ma famille …

Jean-Yves L.G. : *au-delà de l'aspect scientifique, il me semble indispensable de te remercier pour tes blagues, ta bonne humeur, tes barbecues et que sais-je encore…MERCI POUR TOUT !*

Pierre Universalis B. : *A monsieur encyclopédie, le seul qui sache apprécier le durian à sa juste odeur, merci pour tous ces bons moments, merci de rester jusqu'à la fermeture des grilles de la fac. « Riche qui peut, aisé qui sait, sage qui veut. »*

Christophe PubMed V. : *merci d'avoir partagé tes connaissances et tes compétences. Merci pour ta disponibilité et ta gentillesse. Merci Christophe.*

Catherine Caticate L. : *à la meilleure des secrétaires poly.valentes, merci pour avoir écouté mes bêtises à longueur de journée.*

Sébastien Sensei R. : *merci d'avoir partagé tes connaissances et ta bonne humeur avec le jeune scarabée que je suis : grande est ta générosité, longue sera … ta carrière. Merci Sensei.*

Aurélia Aurélio B. : *Merci miss grand sourire pour ton énergie et de nous transmettre ta bonne humeur !*

Marie Pamela P. : *Merci Marie pour ta bonne humeur, miss stazunienne qui a bouleversé les mœurs outre-atlantiques et qui va transformer Amiens en Floride française.*

Aurélie Mammy C. : *Du réveil, à 14h du matin, au soir, merci pour tous ces bons moments au labo.*

Ludovic Shehrazad Bocal G. : *à l'homme aux mille et une soirées en une nuit, compagnon de travail et de bêtises, les bons moments passés vont me manquer.*

Aude Coquine O. : *Compagnon de conquête : squash, cinéma, resto et … boulot : à nous le Berry !!!!!*

Alban Droopylimero Axelle G. : *à l'homme qui porte la Terre sur son dos : ah que le monde est dur envers les bons …microbiologistes !! mai-euuuh……*

Emeline Meuh M. : *pour ton soutien, ta gentillesse et surtout ton aide : sans toi, les manips n'auraient jamais autant avancé dans les derniers mois de la thèse. Nos discussions vont me manquer.*

Caroline G. : *merci à ma meilleure cliente, sache que ma boutique te sera toujours ouverte et que je vends aussi par mail! Au fait, tu savais que CDiscount s'installe dans le Berry ?*

Anthony MatLab N. : *compagnon de boutades et de voyage, bon courage pour la suite ! Viva Pékin mais sans moi cette fois-ci !*

Kadija K Kdur : *je sais que mes boutades te manquent déjà, alors j'en rajoute pas ! Bon courage pour la suite : toutes les routes, même longues et pénibles, s'arrêtent un jour.*

A mes parents : *indispensable dans les aventures telle qu'une thèse, merci pour votre soutien sans faille.*

Céline Lilou L. : *merci de m'avoir supporté et de partager ma vie : le meilleur, moi, comme le pire, je n'ai pas d'exemple. A ma vie, à la Vie, à nous 2….*

« Magit mad ho korf hoc'h ene a chomo pelloc'h e-barzh »

Résumé

L'objectif de ce travail de thèse est d'étudier une nouvelle voie de thérapie basée sur l'échographie de contraste. Les agents de contraste utilisés sont capables de vectoriser différentes molécules chimiques et de les libérer lorsqu'ils sont détruits par le biais des ultrasons. La thérapie basée sur les ultrasons et les microbulles est une technique qui comporte de nombreux avantages. Ciblé et contrôlé, le traitement permettrait de réduire la quantité de principe actif administré et donc les effets secondaires tout en conservant une efficacité équivalente au mode d'administration classique. Cependant les mécanismes et les interactions microbulles-cellules sont mal connues et peu étudiés. Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont essayé de contribuer à une meilleure compréhension de ces mécanismes afin d'améliorer cette technique thérapeutique.

Au cours des expériences *in vitro* et *in vivo* réalisées avec des techniques et protocoles mis au point au cours de la thèse, nous avons pu mettre en évidence un phénomène de stress mécanique induit par les oscillations des microbulles.

In vitro, les stimulations mécaniques peuvent activer des canaux ioniques et induire une modification du potentiel de membrane cellulaire. En effet, nous avons montré sur des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 que l'activation des canaux ioniques BK_{Ca} sous l'effet d'un stress mécanique entraîne une hyperpolarisation de la membrane cellulaire. Nous pouvons donc penser qu'en modifiant les charges de surface membranaire, cela pourrait aussi modifier l'interaction des différents éléments environnants avec la membrane plasmique. Dans le cadre d'une thérapie, ces modifications peuvent aider à l'incorporation des molécules en favorisant l'adhésion à la membrane plasmique, en jouant sur les forces électromotrices ou encore en stimulant d'autres voies de signalisation.

In vivo, le stress mécanique semble être à l'origine de l'un des rares effets secondaires, non liés à une allergie ou à l'injection des ACU, les arythmies. Les résultats obtenus via l'expérimentation animale sur le rat, sont soutenus par des expériences *in vitro*. En effet, les cellules de la lignée cardiaque HL-1, interrogées en patch clamp, montrent qu'il est possible d'induire l'apparition de potentiels d'action qui peuvent être, *in vivo*, à l'origine de contraction cellulaire arythmique. Cette mise en évidence permet, en connaissance de cause, d'envisager la prévention de ces arythmies.

Ce travail de thèse a donc permis d'élaborer un certain nombre de protocoles et de techniques visant à permettre l'étude des effets des ultrasons et des agents de contraste. L'expérimentation *in vivo* et *in vitro* a conduit à l'hypothèse que les microbulles excitées génèrent un stress mécanique ayant pour conséquence une modification de l'activité cellulaire. Cette hypothèse, la première du point de vue mécanistique, permet d'ouvrir de nombreuses perspectives d'étude.

Mots clés : sonoporation, agent de contraste, thérapie ciblée, ultrason, SAC

Résumé en anglais

The aim of this work is to study a new way of therapy based on the contrast ultrasonography. The used contrast agents are able of transport different chemical molecules and to liberate them when they are destroyed by means of ultrasounds. This method allows a controlled and targeted treatment therefore what has as advantages to reduce drugs quantity (therefore side effects). Moreover, microbubbles augment cell or tissue permeability therefore ameliorates their cell uptake. However, the mechanism is not known.

In vitro, we used the whole technology of which the patch clamp to show exchanges through the cell membrane and TEER for modification of trans-endothelial permeability. *In vivo*, we have performed ECG to notice and understand side effects to their apparition.

The purpose of PhD work is to succeed to the knowledge of the phenomenon of increase of the permeability led by ultrasounds and microbubbles to be able to optimise it.

Keywords: sonoporation, cell permeability, targeted microbubbles, SAC, ultrasound

Publications et Congrès

Prix et récompenses :

2008 Prix du Jeune Chercheur Tourangeau 2008
Prix de la Fondation pour la Recherche Médicale FRM
2006 Finalistes pour le prix de la meilleure présentation affichée 2006
Prix du congrès «IEEE Ultrasonics Symposium 2006» (Rotterdam, Hollande)

Publication et revues :

Tran TA, Roger S, Le Guennec JY, Tranquart F, Bouakaz A. "Effect of ultrasound-activated microbubbles on the cell electrophysiological properties" Ultrasound Med Biol. 2007;33(1):158-63.

Kaddur K, Tran TA "Applications thérapeutiques", revue "Echographie de contraste : méthodologie et applications cliniques" *ed. Springer*, 2007.

Tran TA, Le Guennec JY, Bougnoux P, Tranquart F, Bouakaz A "Characterization of cell membrane response to ultrasound activated microbubbles" IEEE T Ultrason. Ferr. 2008 ; 55 : 44-49.

Tran TA, Le Guennec JY, Bougnoux P., Babuty D, Tanquart F. and Bouakaz A. "On the mechanisms of ultrasound contrast agents induced arrhythmias" Ultrasound Med Biol. *soumission*.

Tran TA and Gillet L, Roger S, Besson P, White E and Le Guennec JY "Taxol reduces breast cancer cell invasiveness at non anti-mitotic concentrations" *soumission*.

Présentations orales et affichées :

2008 : Présentation affichée au congrès «32th EWGCCE Meeting» (Madrid, Espagne)
2008 : Présentation affichée au congrès «Canaux Ioniques» (Presqu'île de Giens, France)
2008 : Présentation orale à la «Journée Scientifique de l'IFR 135» (Nouzilly, France)
2007 : Présentation affichée au congrès «IEEE International Symposium» (New York, USA)
2007 : Présentation orale au congrès «Canaux Ioniques» (Presqu'île de Giens, France)
2007 : Présentation orale au «International Congress in Ultrasonics» (ICU) (Vienne, Autriche)
2006 : Présentation orale au «Congrès Français d'Acoustique» (CFA) (Tours, France)
2006 : Présentation affichée à «IEEE Ultrasonics Symposium »(Rotterdam, Hollande)
2005 : Présentation affichée au congrès «Canaux Ioniques» (Presqu'île de Giens, France)
2005 : Présentation orale à la «Journée Scientifique de l'IFR 135» (Nouzilly, France)

Table des matières

Remerciements **3**

Résumé **5**

Résumé en anglais **6**

Publications et Congrès **7**

Introduction générale **18**

Introduction

I. Les agents de contraste pour ultrasons **22**

1. L'imagerie ultrasonore *22*

2. Les agents de contraste *23*

3. Propriétés physiques des microbulles *23*

4. Applications cliniques *24*

II. Les agents de contraste : de l'imagerie à la thérapie **26**

1. Les agents de contraste ciblés *26*

2. La sonoporation *28*

3. La vectorisation *30*

4. Transfection et thérapie par les ultrasons et les microbulles *30*

III. Les interactions bulle-cellule **32**

1. « Le massage cellulaire» : stress mécanique *32*

2. Le cytosquelette *33*

2.1. le cytosquelette : introduction 33

2.2. le rôle du cytosquelette 35

3. Conséquences des déformations membranaires : les systèmes de mécano-transduction *36*

3.1. Les canaux ioniques activés par le stress mécanique (SAC) 37

3.2. Les intégrines et les kinases 48

3.3. Les protéines G 51

3.4. Les facteurs modulés par les contraintes mécaniques 51

Matériels et méthodes

IV. Le Matériel Biologique 56

1. Etude In Vitro 56
1.1. Les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 56
1.2. Les cellules cardiaques : lignée cellulaire HL-1 57

2. Etude In Vivo sur le rat Wistar 57

V. Méthodes et protocoles 59

1. La culture cellulaire 59

2. Enregistrement des échanges ioniques : le "Patch Clamp" 60
2.1. Introduction 60
2.2. L'installation de « Patch clamp » 61
2.3. Les conditions expérimentales 61
2.4. Protocoles expérimentaux 63
2.5. les limites de la technique 66

3. Mesure des variations de la concentration intracellulaire en calcium 66
3.1. Introduction 66
3.2. Principes de l'imagerie calcique en utilisant le FURA-2 : 67
3.3. Protocoles 68

4. Mesure de la viabilité cellulaire 69
4.1. Introduction 69
4.2. Protocoles 70
4.3. Les limites de la technique 70

5. Mesure de la résistance trans-épithéliale TEER 71
5.1. Introduction 71
5.2. Protocoles 71
5.4. les limites de la technique 72

6. Etude des troubles du rythme cardiaque 72
6.1. Introduction 72
6.2. Protocole d'étude 76
6.3. Les limites de la technique

Résultats : "Intéraction microbulles-cellules et ultrasons"

VI. Mise en place d'un système d'étude des effets de microbulles 82

1. Introduction 82

2. Mis en place des dispositifs expérimentaux 82

3. Résumé de l'article 83

4. Article 85

3. Conclusion et perspectives 92

VII. Effets sur les propriétés électrophysiologiques des cellules..... 93

1. Introduction 93

2. résumé de l'article 93

3. Article 94

4.. Conclusion et perspectives 101

VIII. Effets des microbulles sur le fonctionnement du cœur 102

1. Introduction 102

2. Résumé de l'article 102

3. Article 104

6. Conclusion et perspectives 118

IX. Effets sur la résistance trans-endothéliale et les transfections. 120

1. Introduction 120

2. Matériels et méthodes 120
2.1. TEER : dispositif et protocole expérimentales 120
2.2. les transfections 122

3. Résultats et Discussions 123
3.1. La résistance trans-endothéliale 124
3.2. Transfection de la GFP 125

4. Conclusion et perspectives 127

Conclusion

Conclusion générale 128

BIBLIOGRAPHIE 131

Autres travaux : « Sonoporation et transfert de drogues et de gènes par microbulles et ultrasons ». 168

Abréviations 179

Liste des figures

Figure 1: Exemple d'image réalisée en échographie de contraste pour le diagnostique du cancer du sein. L'échographie « classique » haute fréquence est demandée dans le cadre du bilan initial d'un cancer du sein. Celle-ci révèle la présence de 2 lésions discrètement hypoéchogènes (A, flèche). L'absence de contraste à l'intérieure de ces lésions au cours de l'injections de SonoVue® confirme la présence des lésions métastatiques (B, flèche). 25

Figure 2 : Les microbulles ciblées (d'après le schéma de Tranquart et al. 2007). Les ligands peuvent être directement incorporés sur la membrane de la microbulles ou couplés aux extrémités hydrophiles des constituants de la paroi (A). Des protéines d'ancrage sont également souvent utilisées pour permettre la fixation du ligand sur la microbulle. Ces molécules d'ancrage utilisent la combinaison biotine-avidine (B) ou des chaînes de polymères telles que le polyéthylène glycol (PEG) (C). 27

Figure 3 : Sonoporation induite par les ultrason et les microbulles sur les cellules HL-60. On observe que le nombre de pore augmente en parallèle avec l'augmentation de la pression acoustique (A à C) alors qu'il n'y a pas de pore sur les cellules contrôles (E) ou stimulées en absence de microbulles (F). Cependant, si la pression est trop grande, on peut détruire la membrane plasmique (D) (Liu et al. 2006)..... 28

Figure 4 : Phénomènes de cavitation et formation de micro-jet (Postema et al. 2004). Les images de Michiel Postema (Erasmus MC Rotterdam) montre que les microbulles, sous l'effet des US, oscillent modifiant ainsi leur diamètre (A, B, C, D). Lorsque l'amplitude de ces oscillations est trop grande, elles se collapsent soudainement ce peut entraîner l'apparition de micro-jets et de micro-cisaillements dans le milieu environnant (E, F). 29

Figure 5 : Thérapie cellulaire permettant la libération de manière contrôlée et ciblée d'agents thérapeutiques par les microbulles par les ultrasons. Via une augmentation transitoire de la pression acoustique, les microbulles sont détruites et libèrent dans l'environnement immédiat les molécules d'intérêt vectorisées. Ce phénomène entraînent une augmentation localisée de la concentration en principe actif qui amplifie son effet (image de gauche). Les molécules portés par les microbulles peuvent également traversé la membrane cellulaire, passage qui est potentialisée par les ultrasons et les microbulles via la sonoporation (image de droite)..... 29

Figure 6 : Vectorisation des molécules d'intérêt par les agents de contraste (d'après un schéma de Unger et al. 2000). Unger (Unger et al. 2000) et Schummann (Schummann et al. 2002) ont montré par leurs différentes études, que les microbulles ultrasonores pouvaient porter sur leur membrane ou dans leur membrane différente molécules ou même des plasmides. Certaine méthode de préparation permette aussi de venir encapsuler les molécules d'intérêt afin de pouvoir les protéger ou d'éviter qu'elles n'interagissent de manière non voulue avec leur environnement..... 30

Figure 7 : tableau récapitulant les paramètres ultrasonores et le type de microbulles utilisées pour les expériences de thérapie et de transfection par les ultrasons et les microbulles (Tsutsui et al. 2004)..... 31

Figure 8 : Observation du massage cellulaire (Van Wamel et al. 2004). Images réalisées à Rotterdam à l'aide d'une caméra à très grande vitesse ($>10^7$ images/seconde) d'une microbulle qui oscille sous l'effet des ultrasons. Chronologiquement (au temps 1, 2, 3 et 4), on peut observer la très grande amplitude des oscillations de la microbulle qui viennent déformer la membrane plasmique d'une cellule épithéliale voisine. ... 32

Figure 9 : Marquage des différents élements du cytosquelette d'une cellule eucaryote : (bleu) le noyaux, (vert) la tubuline, et (rouge) l'actine. (http://fr.wikipedia.org/wiki/Cytosquelette)..... 33
Figure 10 : Les molécules constitutives du cytosquelette. Microfilaments : constitués de deux brins torsadés constitués chacun d'un chapelet d'une protéine globulaire, l'actine. On trouve des microfilaments un peu partout dans la cellule mais en particulier sous la membrane plasmique où ils sont regroupés en faisceaux dénommés fibres de tension, qui peuvent avoir une fonction contractile. Microtubules : les microtubules sont composés de sous-unités de tubuline, protéines disposées côte à côte pour former un tube. Il s'agit d'éléments relativement rigides du cytosquelette, impliqués dans l'organisation du métabolisme, le transport intracellulaire et la stabilisation de la structure cellulaire. Filaments intermédiaires : les filaments intermédiaires sont composés de tétramères imbriqués et décalés de protéines. Cette disposition confère une force mécanique énorme à la cellule. (Raven et al. 2007)..... 34
Figure 11 : Exemple de cascade de réaction et modifications physiologiques induites par les stimulations et contraintes mécaniques sur les vaisseaux et les cellules endothéliales. Les vaisseaux sanguins sont continuellement soumis à des contraintes mécaniques pulsées induites par la circulation sanguine (10-15 dyn/cm² quelque soit la partie du réseau artériel considéré). Toute variation de ces contraintes est perçue au niveau des cellules vasculaires et se traduit par des modifications fonctionnelles et structurales des vaisseaux. De nombreux récepteurs, présents à la surface des cellules endothéliales, sont sensibles aux forces dites de cisaillement ou « Shear stress ». Ces contraintes vont initier des cascades de réactions qui permettent aux vaisseaux sanguins de s'adapter à son environnement mécanique. La régulation des contraintes est assurée par des mécanismes humoraux autocrines ou paracrines qui permettent de modifier les paramètres hémodynamiques localement (Glagov et al. 1994 ; Tronc et al. 1996). Par exemple, lorsque que le débit sanguin augmente, les MMP (métalloprotéases matricielles) vont être produits, induisant une dégradation des fibres élastiques et entraîner une vasodilatation des vaisseaux ou l'apoptose des cellules. D'autres molécules dont la présence et la quantité est modulé par le stress mécanique existent (monoxyde d'azote, facteurs de croissance, radicaux libres,…) et peuvent avoir des conséquences très différentes voir contracdictoire (hyperlasie). . 36
Figure 12 : Effets du stress mécanique. Les contraintes mécaniques sont perçues par la cellule par un certain nombres de voies sensibles aux stress mécaniques. Ces forces mécaniques activent des cascades de réaction qui, selon les voies impliquées, vont avoir des effets très différents. Parmi ces voies, nous pouvons remarquer, entre autres les canaux ioniques ioniques, les intégrines, les MAP-kinases, les protéines G,…..... 37
Figure 13 : Structure du canal BK_{Ca}. La sous-unité α comporte 11 domaines hydrophobes en hélice α (cylindres verts) dont 7 domaines trans-membranaires (S0 à S6) et 4 domaines intracellulaires (S7 à S10). La boucle située entre les segments S5 et S6 du canal possède une séquence caractéristique conférant la sélectivité au K^+ au pore (Wallner et al. 1996). Elle constitue le pore du canal (Toro et al. 1998). Le segment S4 porteur de 3 charges positives interagit avec les charges négatives présentes sur les segments SI, S2 et S3 (Toro et al. 1998). Le déplacement du segment S4 en réponse à une variation de voltage provoque l'ouverture du canal (Toro et coll. 1998). Les sites présumés de fixation du calcium se situent dans la partie C-terminale (Schreiber et Salkoff 1997, Wallner et al. 1999), principalement entre les régions intracellulaires S9 et S10, appelé la «boule calcique» ou «calcium bowl », (Schreiber et Salkoff 1997, Schreiber et al. 1999). Les domaines appelés RCK1 (Regulator of

Conductance for K^+) interviennent, de part leur structure, dans la régulation du canal par le Ca^{2+} (Piskorowski et Aldrich 2002, Xia et al. 2002). RCK1 possède en effet des sites de fixation au calcium, induisant de part la fixation de ce dernier, un rétrocontrôle sur la $[Ca^{2+}]i$. Ces sites interagissent aussi avec la boule calcique (calcium bowl) située dans le RCK2 pour la régulation de BKc_a (Xia et al. 2002). Cependant, chaque site de fixation du calcium est à même de moduler indépendamment l'activité du canal (Cox et al. 1997, Shi et Cui 2001, Zhang et al. 2001). La partie C-terminale intervient également dans l'adressage du canal et sa tétramérisation (Bravo-Zehnder et al. 2000, Piskorowski et Aldrich 2002). La sous-unité α comprend une région hydrophobe additionnelle SO qui par sa position trans-membranaire oriente l'extrémité N terminale du côté extracellulaire (Meera et al. 1997, Wallner et al. 1996). La sous-unité β participe également à la régulation de l'activité du canal car il possède des sites de phosphorylation, de glycosylation et de fixation de toxines inhibitrices (Charybdotoxine par exemple). 42

Figure 14 : Exemples de courants BK_{Ca} en fonction de la configuration des sous-unités β. Les courants sont enregistrés, en patch clamp (patch rompue, cellule entière) durant un protocole de type courbe IV (voltage clamp). Des créneaux de potentiels sont imposés de –80mV à +100mV par incrément de 20mV (de –80 à 0 mV) ou de 10 mV (de 0 à +100 mV). Les courants résultent de l'activation des canaux BKCa constitués de complexes composés de la sous unité α seule ou associant celle-ci à 4 sous unités β1, β2, β3, β4, β2-BP (sous-unités β2 mais sans la séquence peptidique inactivante). D'après Brenner et al. 2000..... 44

Figure 15: La voie des MAPK kinase. La cascade des MAP-kinases (mitogen activated protein kinases) comporte plusieurs voies distinctes : ERK 1/2 (extracellular signal-regulated protein kinases 1/2), JNK (c-jun N-terminal kinase), kinase p38, intégrines, et BMK1 (big mitogen-activated protein kinase 1) qui sont sensibles aux contraintes de cisaillement. La phosphorylation des MAP-kinases aboutit à la régulation de l'activité de protéines cibles dans le cytoplasme et de facteurs de transcription dans le noyau. La stimulation de la cascade des MAP- kinases par la contrainte de cisaillement peut également dépendre de l'activation de la protéine Gα ou Gβ/γ et de la phosphorylation mécano-sensible des récepteurs de type tyrosine kinase. L'activation de Ras par les radicaux libres, qui précède en principe l'activation de la cascade de ERK1/2, a aussi été démontrée. 48

Figure 16 : Cascade des MAP-kinases déclenchée par les ultrasons et conduisant à la phagocytose par les macrophages. Des ultrasons de faibles intensité peuvent déclencher une cascade de réaction via les intégrines CR3 induisant des phénomènes de polymérisation of de l'actine et d'activation de la tyrosine kinase Src suivie par celle de la MAP-Kinase ERK et p38. Il est à souligner qu'une perte de l'intégrité du cytosquelette par, par exemple la cytochalasine D, inhibe les effets des ultrasons et annule l'activation de Src, ERK, p38 et donc, conséquent de la phagocytose. En parallèle, l'activation des GTPases RhoA et de ROCK semble accélérer la phagocytose et aider à la polymérisation de l'actine induite par les ultrasons (Zhou et al. 2008)..... 50

Figure 17 : Rôle de l'AMPc. L'AMPc est capable d'activer un certain nombre de protéine déclenchant ainsi des cascades de réactions. En fonction du type cellulaire et de la voie de signalisation impliquée, les conséquences sont extrêmement différentes. En effet, en modulant l'activité des canaux ioniques, l'AMPc modifient le potentiel de membrane notamment en modifiant la perméabilité membranaire des ions K^+, Ca^{2+} et Na^+. En activant les récepteurs à l'EGF (epithélial growth factor) ou NGF (nerve growth factor), les cellules concernées peuvent se différencier ou proliférer. Sur les

cellules hépatiques, la dégradation du glucose est augmentée via les PKA. PKA peuvent aussi entraîner la contraction des cellules cardiaques. Nous pouvons souligner que plusieurs voies peuvent s'activer simultanément. 52
Figure 18 : L'activation de la protéine kinase Akt protège la cellule endothéliale de l'apoptose en inhibant la voie des caspases, soit en activant la synthèse de NO par l'intermédiaire de la NO synthase (eNOS), soit en phosphorylant Bad (Bcl-2-antagonist of cell death), empêchant sa liaison avec Bcl-2 (B-cell CLL/lymphoma 2) ou Bcl-XL (Bcl-2-like 1) à la membrane des mitochondries. L'activation d'Akt peut également activer l'expression de gènes favorisant la survie cellulaire. Flk-1 : récepteur à activité tyrosine kinase Flk-1 ; c-Src : kinases c-Src ; PI3K : phosphatidylinositol-3-kinase. 53
Figure 19 : Techniques utilisées au cours des différents travaux. L'une des premières problématiques est de savoir comment quantifier et observer les variations de la perméabilité membranaire induites par les microbulles et les ultrasons. Afin d'apporter une solution à ce problème, nous avons adapté la technique de patch clamp pour étudier les échanges trans-membranaires à l'échelle cellulaire et la TEER pour les modifications d'une monocouche cellulaire. Nous avons également utilisé le MTT pour évaluer la viabilité cellulaire et une technique d'imagerie par fluorescence utilisant le Fura-2 pour quantifier les variations de calcium intracellulaire. Pour déterminer les conséquences d'une stimulation par les ACU et les US sur le cœur, nous avons réalisé des ECG. 55
Figure 20 : Cellules MDA-MD-231 (http://www.lgcpromochem-atcc.com) 56
Figure 21 : Rats Wistar (www.damninteresting.com/wp-content/labmouse.jpg). 58
Figure 22 : les différentes étapes de la trypsination et du ré-ensemencements des cellules. La trypsination se fait sous hotte à flux laminaire et se déroule en plusieurs étapes. Le lavage consiste à éliminer le milieu de culture qui contient notamment des inhibiteurs de trypsine. Cette étape se fait en rinçant le tapis cellulaire à plusieurs reprises avec du PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+}. La trypsine est ajoutée ensuite afin de décoller les cellules. Après un temps suffisant, les cellules sont mises en suspension avec le milieu de culture adapté. Le comptage permet de déterminer la concentration cellulaire afin de pouvoir ré-ensemencer les cellules et/ou débuter les expériences. 59
Figure 23 : La technique de patch clamp en configuration cellule entière et en patch rompu. La technique consiste à appliquer une micro-électrode en verre (A), contenant filament d'argent chloruré (AgCl) et un liquide conducteur mimant le contenu intracellulaire, contre la membrane cellulaire et de créer un scellement hermétique : le « seal » (B). Suite à une dépression induite dans la pipette, la membrane va se rompre sous la pointe de la pipette sans altérer le seal (C). Le milieu contenu dans la pipette va perfuser à l'intérieur de la cellule (D) et l'électrode d'AgCl située dans la pipette va pouvoir enregistrer l'activité globale de tous les échanges ioniques de la cellule (E). Dans cette situation, il est donc possible de mesurer le courant ou le potentiel de membrane de la cellule en configuration « current clamp » ou « voltage clamp ». 60
Figure 24 : Poste de « patch clamp». Le poste de « patch » est composé d'un microscope inversé (Nikon® Eclipse® TE2000, Japan) qui repose sur une table à coussin d'air afin d'éliminer les vibrations mécaniques externes (TMC®, USA). La pipette de patch est fixée sur un micromanipulateur piézo-électrique (Sutter Instrument®, USA). La pipette, via un adaptateur d'impédance est reliée à un amplificateur (Axopatch® 200-B, Axon Instrument®, USA) lui-même connecté à une carte de conversion analogique/numérique (courant-voltage) (Digidata® 1322A, Axon Instrument®, USA) qui permet la communication avec un ordinateur. Cet ordinateur

permet non seulement d'enregistrer les résultats mais aussi de contrôler les potentiels ou les courants appliqués à la cellule. 61
Figure 25 : composition du milieu intra-pipette (MIP) et de la solution physiologique saline (PSS). Le potentiel calcique (pCa) du MIP est de 6,4. 61
Figure 26 : Exemple d'un courant sodique. A droite, enregistrement d'un courant sodique obtenu sur une cellule HEK transfectée et exprimant transitoirement le canal sodique $Na_{v1.5}$ par imposition d'un potentiel de –5 mV durant 30 ms en partant d'un potentiel de maintien de –100mV. 64
Figure 27 : Protocole d'étude du courant sodique. A droite, exemple d'enregistrements obtenues lorsque, à gauche, des créneaux de potentiel d'une durée de 30 ms sont imposés (de –90 à +70 mV par incrément de 10 mV). 65
Figure 28 : Protocole utilisé en configuration « voltage clamp » pour l'étude des canaux potassiques. (A) Des créneaux de potentiels de –70 à +60 mV par incréments de 10 mV sont appliqués à la cellule afin de pouvoir étudier les courants potassiques. Ces créneaux ont une durée de 500 ms pour permettre l'ouverture de tous les canaux potassiques. La B donne un exemple d'enregistrement que l'on peux obtenir avec ce protocole appliqué aux cellules U87MG connu pour posséder de nombreux canaux potassique à grande conductance sensibles au calcium. 66
Figure 29 : Spectre d'excitation du FURA-2 en présence de différentes concentrations de Ca^{2+} (0-45 μM). La liaison du calcium avec la sonde entraîne à la fois une variation de l'intensité de fluorescence et un déplacement du spectre d'excitation. (www.bphys.uni-linz.ac.at/bioph/res/icg/fura.html). 68
Figure 30 : Dispositif de mesure de la variation calcique par fluorescence. Le dispositif expérimental est composé d'un microscope inversé équipé d'un objectif à immersion (grossissement x60) dédié à la fluorescence UV. Cet objectif permet le passage des ondes lumineuses aussi bien dans le sens de l'excitation que de l'émission. 69
Figure 31 : Schéma du dispositif de mesure en fluorométrie. Le dispositif expérimental est composé d'un microscope inversé équipé d'un objectif à immersion (grossissement x60) dédié à la fluorescence. L'excitation se fait grâce à un monochromateur relié au microscope par une fibre optique. La fluorescence émise et provenant de la cellule et faisant suite à l'excitation photonique est recueillie par un photomultiplicateur via l'objectif. 69
Figure 32 : Système de mesure de la TEER. Les cellules sont ensemencées dans les inserts à une densité de 10^5 cellules/inserts puis disposés dans un incubateur à 37°c (atmosphère saturée en eau, CO_2 à 5%). Pour la mesure, les électrodes de mesure, stérilisées avant chaque mesure, sont placées de part et d'autre de la paroi de l'insert. Le milieu contenu dans l'insert est séparé du milieu contenu dans le puits par une membrane polycarbonate criblée de pores. Ces pores permettent de fermer le circuit formé par les 2 électrodes. Ainsi, la résistance résulte de la conductivité du milieu (constant durant l'expérience), de la résistance de la membrane (constant également) et l'obstruction des pores par les cellules (variable en fonction du degré de confluence, de la perméabilité membranaire et des interactions intercellulaires)..... 71
Figure 33 : Principe de l'électrocardiogramme (ECG). L'électrocardiogramme (ECG) est un enregistrement de l'activité électrique du cœur. En effet, sous l'effet d'une onde électrique, le tissu cardiaque se dépolarise rapidement, ce qui donne lieu à un courant électrique qui va induire la contraction d'un tissus musculaire données : onde de dépolarisation auriculaire (P), dépolarisation ventriculaire (Q, R et S) onde de repolarisation du (T) (Opie 1998). 74
Figure 34 : ECG et potentiel d'action. (A) L'activité contractile cardiaque est régulée essentiellement par les potentiels d'action (PA) qui sont des variations d'une activité

électrique du myocarde spécifiques à une région cardiaque (PA auriculaire, PA ventriculaire,..). L'amplitude du PA atteint la valeur de +40mV ce qui tends vers le potentiel d'équilibre de l'ion Na^+. Le PA ventriculaire est composé de 5 phases successives (B). Chacune des différentes phases du PA résulte de l'activité d'une population de canaux ioniques (Hauswirth et Singh 1978)..... 76
Figure 35 : Protocole de perfusion de l'agent de contraste. Après l'endormissement complet de l'animal, l'injection de l'agent de contraste est réalisée dans la veine caudale chez le rat. L'agent de contraste (Sonovue®, Bracco®) est perfusé par un système de perfusion (débit : 0,5 ml/min). 77
Figure 36 : Protocole de chirurgie sur le rat. Après endormissement complet de l'animal sous l'effet de l'anesthésie, une ouverture sera réalisée au niveau du cou de l'animal qui permettra de dégager la trachée, la jugulaire et la carotide. Une trachéotomie sera effectuée dans un premier temps afin de contrer les problèmes respiratoires liés à l'anesthésie. Le cathéter, rempli de sérum de physiologique (NaCl 0.9%), sera disposé dans la carotide gauche puis poussé vers l'aorte, le cœur et, enfin, dans l'oreillette jusqu'aux valvules. Entre 2 contractions cardiaques, lorsque les valvules s'ouvriront ce qui permettra au cathéter de pénétrer dans le ventricule cardiaque. .. 78
Figure 37 : Système de stimulation ultrasonore et mesure des effets sur le rythme cardiaque ou la pression intraventriculaire. Les stimulations sont réalisées à l'aide d'un transducteur ultrasonore mono-élément de 1 MHz focalisé à 14mm (40 cycles, 100 μs de répétition). La sonde ultrasonore est connectée à un amplificateur de puissance lui-même relié à un générateur de fréquence. Les stimulations auront une durée de 1 min chacune et une pression acoustique comprise entre 100 et 500 kPa. Le transducteur est maintenu par un bras fixe afin d'annuler les mouvements liés au manipulateur. 79
Figure 38 : Stimulation mécanique de la paroi ventriculaire. Suite au protocole de chirurgie, le cathéter situé dans le ventricule de l'animal est poussé tout contre la paroi musculaire. Les stimulations mécaniques sont réalisées en frottant l'extrémité de la canule sur les parois du ventricule. La stimulation cessera lorsque les PVC apparaîtront sur l'ECG. 79
Figure 39 : Dispositif expérimental permettant d'étudier les effets des ultrasons et des microbulles par la technique du patch clamp. 83
Figure 40 : les cellules HUVEC. Les cellules HUVEC (image de gauche) ne sont pas une lignée cellulaire en tant que telle car leur nombre de doublement en culture in vitro est limitée (entre 16 et 20 doublements) après quoi, elles ne prolifèrent plus et se différencient. (image de droite) Sur boîte de pétri coatée avec du Matrigel®, les HUVEC forment des tubules (http://www.cellapplications.com/HumanCells/HUVEC.htm). 120
Figure 41 : Dispositif de stimulation ultrasonore des inserts servant pour la TEER. L'insert de TEER est positionné sur un gel (eau + 5% agar) de telle manière que la sonde soit placée à 14mm. Le milieu de culture recouvre la surface du gel (10mm de hauteur) tout comme la membrane de polycarbonate. 121
Figure 42 : les cellules U-87 MG. Les cellules U-87 MG à faible confluence (à gauche) et à forte confluence (à droite) (http://www.lgcpromochem-atcc.com/common/images/Cells/HTB-14_mg1.jpg). 122
Figure 43 : Dispositif de transfection par les ultrasons et les microbulles. Les cellules en suspension dans leur milieu de culture sont placé dans une cuve en polycarbonate, très peu réflective pour les ondes ultrasonore. Le centre de la cuve est placé au point focal à 14mm du transducteur. Un système d'agitation baro-magnétique est mis en place afin de maintenir les cellules en suspension. La boite contenant le dispositif

contient de l'eau pour permettre une transmission optimale des ultrasons vers les cellules. 122
Figure 44 : Effet des ultrasons et des microbulles sur la TEER. Les cellules sont soumises à une stimulation ultrasonore (transducteur 1 MHz, 40 cycles, répétition 100µs) générant 200 ou 400 kPa d'une durée de 1 minute. Ensuite, nous avons injecté de l'ibériotoxine (IbTx 10^{-7} M) avant de stimuler un troisième groupe d'inserts. La résistance est mesurée à 3 temps différents : juste avant la stimulation (control), 30s après la stimulation (t1) et 5 min après stimulation (t2) (n= 3 puits pour chacune des mesures). 124
Figure 45 : Transfection de la GFP en utilisant les ultrasons et les microbulles. Les cellules U87MG sont stimulées par les ultrasons (transducteur 1MHz, 400 kPa, 40 cycles, 100 µs de répétition) en présence d'ADN (10µg). La stimulation ultrasonore dure 2min en absence ou en présence de microbulles et présence ou en absence d'IbTx (10^{-7}M). Le taux de transfection est évaluer grâce à la cytométrie en flux (n=2 pour chacune des conditions expérimentales). 125
Figure 46 : Mortalité cellulaire suite au protocole de transfection de la GFP en utilisant les ultrasons et les microbulles. Les cellules U87MG sont stimulées par les ultrasons (transducteur 1MHz, 400 kPa, 40 cycles, 100 µs de répétition, 2 min) en présence d'ADN (10µg) dans différentes conditions : en présence ou non de microbulles et en présence ou non d'IbTx (10^{-7}M). La mortalité cellulaire est évaluée grâce à la cytométrie en flux (n=2 pour chacune des conditions expérimentales). 125

Introduction générale

L'échographie est, de nos jours, une technique d'imagerie ultrasonore incontournable. En clinique, elle est utilisée quotidiennement pour le dépistage de certaines pathologies (tumeurs cancéreuses, disfonctionnements cardiaques, troubles vasculaires, …), pour la suivie d'un traitement (chimiothérapie, …), pour guider certains actes médicaux (ponctions, …) ou encore pour suivre le développement fœtal au cours d'une grossesse, … les exemples sont multiples et ne manquent pas. Non invasive, l'échographie est un acte médical qui ne demande aucune anesthésie, aucune hospitalisation et n'implique presque aucune contre indication. Cet examen offre à la clinique ce que nul autre examen ne peut : rapide, peu coûteux et indolore, il ne possède pratiquement aucun effet secondaire.

Cependant, le problème majeur, par rapport à d'autres techniques d'imagerie telles que l'imagerie par résonance magnétique (IRM) ou le scanner, demeure la résolution de l'image et la qualité de l'examen qui est étroitement liée à l'opérateur. De nombreuses stratégies ont été mises en place pour développer l'échographie : amélioration des sondes, modifications des paramètres ultrasonores et création d'agents de contraste. Les agents de contraste ultrasonore (ACU) sont composés de microbulles gazeuses. Elles sont injectées par voie intraveineuse et sont actuellement utilisé pour le diagnostic dans différentes applications en cardiologie (évaluation de la perfusion myocardique) et en radiologie (détection et caractérisation des tumeurs du foie et du sein).

Les études récentes font force d'orienter l'échographie de contraste vers des applications thérapeutique. En effet, les microbulles peuvent incorporer des composants thérapeutiques dans leur paroi et agir ainsi comme véhicule. Les avantages de cette méthode de vectorisation sont multiples : ciblage, contrôle d'un traitement et amplification des effets du traitement. L'échographie de contraste reste néanmoins une technique d'imagerie et permet donc de suivre le cheminement des microbulles dans la circulation sanguine et libérer, à la demande, les principes actifs en détruisant les véhicules par le biais des ultrasons (US). Dans le cadre d'une utilisation en thérapie, la libération des agents thérapeutiques est localisée amplifiant de ce fait, la concentration locale en principe actif et réduisant par conséquent les effets secondaires. De plus, les microbulles entraînent une augmentation transitoire de la perméabilité membranaire et par conséquent, améliorent l'incorporation des éléments vectorisés dans les tissus.

Bien que l'approche soit novatrice et que la faisabilité soit établie, très peu d'études ont été réalisées pour mettre en évidence les mécanismes conduisant à l'augmentation de la perméabilisation membranaire. Ce travail de thèse se propose donc d'étude les interactions

entre les microbulles, les ondes ultrasonores et les cellules afin comprendre les mécanismes mis en jeu et d'optimiser cette nouvelle technique. L'enjeu principal de cette thèse est de proposer des stratégies et des protocoles d'étude pour mettre en évidence les modifications physiologiques induites par les ACU sous l'effet des ultrasons.

Les agents de contraste ultrasonore

I. Les agents de contraste pour ultrasons

1. L'imagerie ultrasonore

Les techniques ultrasonores appliquées à la médecine ont été développées dans les années 1950 et ont commencé à être utilisées en routine vers le début des années 1970. Ces techniques dérivent de celles qui ont été mises au point pour le radar, le sonar sous-marin et le contrôle non destructif des matériaux. Cependant en raison de leur application particulière en milieu médical, certaines d'entre elles ont été considérablement modifiées pour rendre leur utilisation simple et efficace. Les techniques ultrasonores ont de nombreux avantages par rapport aux autres méthodes d'exploration du corps humain : elles sont non ionisantes, non dangereuses, et faciles à mettre en œuvre. D'autre part, elles autorisent une visualisation en temps réel des organes comme le cœur et le sang circulant. De plus cette technique présente un rapport information au coût très élevé en comparaison avec les autres modalités d'imagerie.

Les fréquences ultrasonores les plus utilisées en médecine sont situées dans la gamme allant de 1.5 à 15 MHz, ce qui correspond à des longueurs d'onde d'une fraction de millimètre, la vitesse des ultrasons dans les tissus mous étant autour de 1500 m/s.

Les ultrasons se propagent assez bien dans les tissus du corps humain, ce qui permet l'exploration de la plupart des organes. La différence d'impédance acoustique entre deux milieux est à l'origine des échos renvoyés par les tissus traversés. Des images échographiques morphologiques sont ainsi reconstruites en analysant les échos réfléchis par les tissus. L'analyse des tissus en mouvement en mode « Doppler », quant à elle, permet de réaliser une imagerie fonctionnelle et une évaluation des écoulements du sang dans les vaisseaux.

Les techniques ultrasonores ont été considérablement développées pour l'imagerie médicale. Les performances atteintes par les appareils de dernières générations sont tout à fait spectaculaires. Ceci est rendu possible grâce à de nouveaux développements tels que l'élastographie, l'imagerie en 3 dimensions en temps réel et l'imagerie de contraste. Par ailleurs, les recherches en cours sur l'imagerie tri-dimensionnelle, la miniaturisation des capteurs et les agents de contraste ouvrent des voies nouvelles au développement des applications médicales que ce soit pour l'imagerie ou pour la thérapie.

2. Les agents de contraste

La technique d'imagerie ultrasonore s'est dotée aussi d'agents de contraste à l'instar des autres modalités d'imagerie. Les agents de contraste sont composés de microbulles de gaz dont le diamètre est de l'ordre de quelques microns. Elles sont enveloppées par une paroi composée de matériau biocompatible pour prolonger leur durée de vie. Ces microbulles gazeuses constituent un moyen de contraste, car le gaz est un puissant réflecteur des ultrasons. En raison de leur très grande compressibilité procurée par le gaz, ces microbulles se comportent comme des diffuseurs très réfléchissants et permettent par conséquent de rehausser le contraste des images de façon considérable dans tout le compartiment vasculaire. En plus de cette très grande compressibilité, les microbulles se comportent comme un oscillateur harmonique dans un champ ultrasonore. La microbulle de gaz possède ainsi une fréquence naturelle (fréquence de résonance) à laquelle son oscillation, et donc sa réflexion est maximale. Les microbulles utilisées comme agent de contraste en ultrasons ont une fréquence de résonance située entre 2 et 5 MHz, dans la gamme des fréquences utilisée en imagerie ultrasonore.

Il existe encore peu d'agents de contraste commercialisés ou en phase d'évaluation clinique. Les principaux sont le SonoVue® (Bracco pharma, Suisse), le BR14® (Bracco pharma, Suisse), le definity®/luminity® (Dupont pharmaceuticals, USA ou Bristo-Myers Squibb, Belgique) et le Sonazoid (Nycomed Amersham, Norvège). Albunex® (Mallinckrodt, USA), Optison® (GE Healthcare, France) et le Levovist® (Shering Allemagne) sont des agents de première génération qui ont été énormément utilisés pour les études des agents de contraste et leurs effets biologiques.

3. Propriétés physiques des microbulles

Afin de permettre une utilisation optimale des agents de contraste, les microbulles doivent remplir certaines conditions (Bouakaz 2005):

- elles doivent pouvoir être administrées par voie intraveineuse (bolus ou perfusion).
- elles doivent pouvoir être suffisamment petites et stables pour assurer le passage pulmonaire afin de permettre son élimination.
- leur demi-vie doit être assez longue pour permettre l'examen échographique ou l'acquisition des images (généralement supérieur à 10min) tout en permettant une élimination assez rapide de la circulation sanguine.

Les propriétés physiques des microbulles sont très étroitement liées à sa composition et ses caractéristiques physiques. En effet, l'activité de l'agent de contraste (notamment sa

demi-vie) est étroitement liée à la taille, au gaz, et à la composition de la paroi de la microbulle (Ophir and Parker 1989). Or, la taille des microbulles détermine aussi l'échogénicité de l'ACU (De Jong *et al.* 1991). Ainsi, comme le diamètre est proportionnel à la demi-vie, un compromis est donc nécessaire pour éviter les effets secondaires (thrombus, embolie,...) tout en ayant une qualité d'image optimale et une durée suffisante pour un examen (Meltzer *et al.* 1980). Il est de plus important de souligner que le diamètre des bulles ne doit pas excéder celui de la structure à explorer (la micro-vascularisation, la néo-angiogénèse,…). Les agents de contraste actuels, ont un diamètre compris entre 1 et 8 µm. La disparition de l'agent de contraste résulte principalement de la dilution du gaz dans le sang (Meltzer *et al.* 1980). Les microbulles actuelles renferment des gaz possédant un haut poids moléculaire (moins solubles dans le sang). La paroi, quant à elle, permet de limiter la dissolution du gaz dans le sang, de stabiliser et de protéger le gaz pour augmenter la demi-vie de la microbulle. L'épaisseur de la paroi détermine l'élasticité de la bulle et donc l'échogénicité (Van Liew and Burkard 1995).

4. Applications cliniques

L'échographie est très souvent utilisée en première intention dans l'approche diagnostique des troubles de la vascularisation ou des lésions cancéreuses en raison de sa facilité de mise en oeuvre, de son coût faible et de son innocuité. La récente mise à disposition des agents de contraste ultrasonore introduit une nouvelle dimension dans le diagnostique des pathologies grâce à une imagerie de meilleure sensibilité. Il est possible de détecter des lésions non visibles par les méthodes conventionnelles et de les caractériser par la cinétique de prise de contraste au niveau de la lésion (Tranquart *et al.* 2007). Cette application est notamment utilisée en clinique en imagerie hépatique (métastases hématiques, lésions hépatiques et carcinome) ou encore de la rate (Tranquart *et al.* 2007).

L'évaluation précoce et fonctionnelle des nouveaux traitements ciblés en oncologie est un enjeu majeur en imagerie fonctionnelle. En effet, une grande partie des molécules utilisées en chimiothérapie sont des molécules dites anti-angiogéniques (Lee *et al.* 1996). Actuellement, grâce aux agents de contraste, il est possible de détecter la micro-vascularisation des tumeurs superficielles et profondes et donc, de mettre en évidence la néo-angiogénèse (Denis *et al.* 2003, Colas *et al.* 2004 ; Colas *et al.* 2006). Grâce à cette nouvelle possibilité, plusieurs études ont démontré la possibilité d'observer et de suivre l'efficacité d'un traitement thérapeutique ayant pour cible la vascularisation tumorale (Denis *et al.* 2003, Colas *et al.* 2004 ; Colas *et al.* 2006). L'échographie de contraste, avec le développement des

logiciels de calcul des paramètres hémodynamiques, se positionne comme un nouvel outil permettant de détecter très finement les lésions et de prédire précocement la réponse au traitement en fonction des changements de la vascularisation bien avant la modification du volume tumoral (Lassau *et al.* 2007).

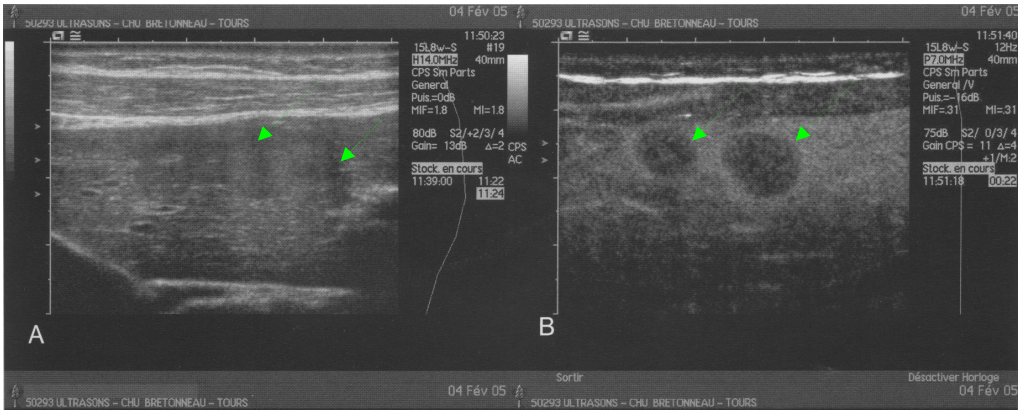


Figure 1: Exemple d'image réalisée en échographie de contraste pour le diagnostique du cancer du sein. L'échographie « classique » haute fréquence est demandée dans le cadre du bilan initial d'un cancer du sein. Celle-ci révèle la présence de 2 lésions discrètement hypoéchogènes (A, flèche). L'absence de contraste à l'intérieure de ces lésions au cours de l'injections de SonoVue® confirme la présence des lésions métastatiques (B, flèche).

II. Les agents de contraste : de l'imagerie à la thérapie

L'utilisation des ultrasons pour le diagnostic médical est de plus en plus présente en clinique. Le développement de nouvelles technologies ainsi que l'apparition des agents de contraste pour l'échographie ouvrent de nouvelles possibilités notamment dans le domaine de la thérapie cellulaire. Les agents de contraste offrent de nombreuses possibilités notamment en termes de ciblage et de control du traitement. En effet, les microbulles peuvent d'une part, être dirigées vers une cible et d'autre part, véhiculer et libérer des molécules thérapeutiques. Il a été montré que les agents de contraste induisent un phénomène de sonoporation qui a pour résultat d'augmenter l'incorporation de médicaments dans les cellules, et donc d'augmenter l'action des molécules (Bao *et al.* 1997 ; Tranquart *et al.* 2007). En effet, il a été démontré que les ultrasons augmentent la perméabilité membranaire, permettant notamment le transfert de gène (Kim *et al.* 1996 ; Tata *et al*. 1997 ; Tsutsui *et al.* 2004) ou l'incorporation de molécules dans la cellule via la formation de pores, phénomène appelé sonoporation (Taniyama *et al.* 2002, Endoh *et al.* 2002).

1. Les agents de contraste ciblés

L'évaluation clinique des dérégulations physiologiques est basée sur les changements anatomiques induits par la pathologie. En utilisant des agents de contraste ultrasonores ciblés, il est possible de différencier les tissus sains des tissus « malades » de manière non invasive ce qui, à l'origine, n'est pas permis par l'échographie traditionnelle (Tranquart *et al.* 2007). Cette approche est basée sur l'utilisation de ligands qui ciblent des molécules sur-exprimées dans le tissu cible. Les parois des microbulles peuvent ainsi porter des anticorps qui permettent aux microbulles de s'attacher spécifiquement sur la région d'intérêt. En raison de leurs activités acoustiques, ces microbulles ciblées permettent, en imagerie, une identification des régions pathologiques où elles sont accumulées puisqu'elles y adhéreront sélectivement. L'imagerie ultrasonore combinée à des agents de contraste de ciblage permet alors une meilleure visualisation et une mise en évidence de la région d'intérêt.

En imagerie ultrasonore utilisant des ACU, la paroi des microbulles ciblées est conçue non seulement pour réduire la diffusion du gaz, mais aussi pour incorporer des ligands dirigés contre des molécules spécifiques. La réalisation de ces microbulles consiste à obtenir une solution par dissolution des composants de la paroi lyophilisée dans un milieu adéquate (généralement du liquide physiologique) et dans une atmosphère chargée en gaz approprié. Il existe actuellement

plusieurs méthodes d'incorporation des ligands de ciblage qui sont souvent des anticorps monoclonaux ou des peptides.

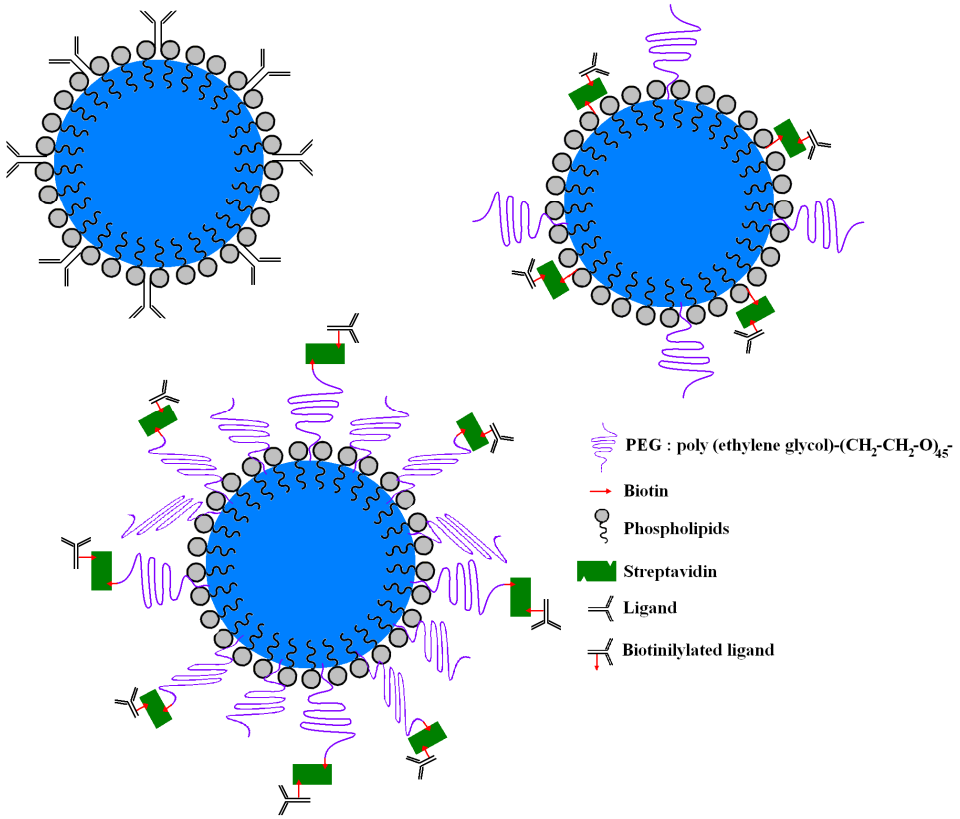


Figure 2 : Les microbulles ciblées (d'après le schéma de Tranquart *et al.* 2007). Les ligands peuvent être directement incorporés sur la membrane de la microbulles ou couplés aux extrémités hydrophiles des constituants de la paroi (A). Des protéines d'ancrage sont également souvent utilisées pour permettre la fixation du ligand sur la microbulle. Ces molécules d'ancrage utilisent la combinaison biotine-avidine (B) ou des chaînes de polymères telles que le polyéthylène glycol (PEG) (C).

Comme le montre la figure 2, les anticorps peuvent être directement incorporés sur la membrane des microbulles ou couplés aux extrémités hydrophiles des constituants de la paroi. Cette méthode implique que les microbulles ne puissent porter sur leur membrane aucun autre constituant du fait de l'encombrement stérique qui peuvent nuire à la reconnaissance des sites spécifiques. Pour remédier à ce phénomène d'encombrement stérique, des protéines d'ancrage sont utilisées pour permettre la fixation du ligand sur les microbulles. Ces molécules d'ancrage sont des chaînes de polymères telles que le polyéthylène glycol (PEG) (Klibanov *et al.* 1999) ou utilisant la combinaison biotine-avidine (Klibanov *et al.* 1999 ; Schumann *et al.* 2002).

Actuellement, beaucoup de travaux ont été réalisés *in vitro* sur ces microbulles qui peuvent désormais, par exemple, reconnaître la P-sélectine (Lindner *et al.* 2001), les ICAM-1 (Weller *et al.* 2003), les integrins (Ellegala *et al.* 2003)… *In vivo*, il est possible via ces ACU ciblées de détecter des thrombus chez le porc (Lanza *et al.* 1996 ; Unger *et al.* 2000 ; Schumann *et al.* 2002)en se fixant aux récepteurs GPIIb/IIIa exprimés à la surface des plaquettes.

2. La sonoporation

La sonoporation peut se définir comme la formation de pores dans la membrane plasmique des cellules induits par les ultrasons (figure3). Il est communément admis que le principal mécanisme de la sonoporation est étroitement lié avec le phénomène de cavitation acoustique (Miller *et al.* 1996). Sous l'effet des ultrasons, les microbulles oscillent et, lorsque l'amplitude de ces oscillations est trop grande, elles deviennent instables et se collapsent soudainement à cause de l'inertie du fluide environnant. Ce phénomène peut entraîner l'apparition de micro-jets et de micro-cisaillements dans le milieu environnant (figure 4). La présence de microbulles de contraste entraîne une réduction du seuil d'apparition du phénomène de cavitation acoustique et rende donc la sonoporation plus efficace tout en réduisant les problèmes liés à la cavitation (Greenleaf *et al.* 1998, Miller *et al.* 2001, Liu *et al.* 2006 ; Zou *et al.* 2008). Cette hypothèse semble pouvoir expliquer l'augmentation transitoire de la perméabilité membranaire des cellules en présence d'ultrasons et d'agents de contraste dans ces conditions (figure 5).

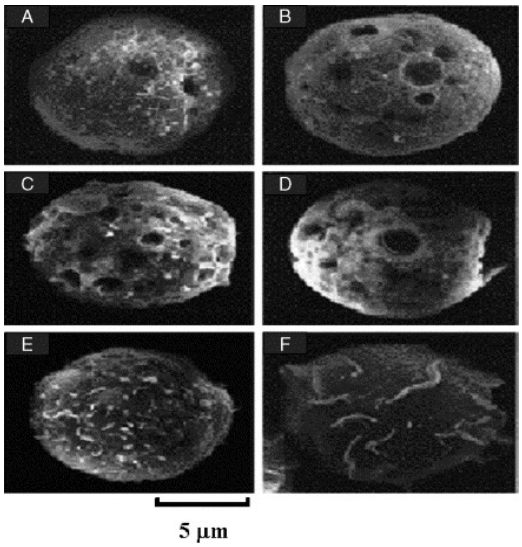


Figure 3 : Sonoporation induite par les ultrasons et les microbulles sur les cellules HL-60. On observe que le nombre de pore augmente en parallèle avec l'augmentation de la pression acoustique (A à C) alors qu'il n'y a pas de pore sur les cellules contrôles (E) ou stimulées en absence de microbulles (F). Cependant, si la pression est trop grande, on peut détruire la membrane plasmique (D) (Liu *et al.* 2006)

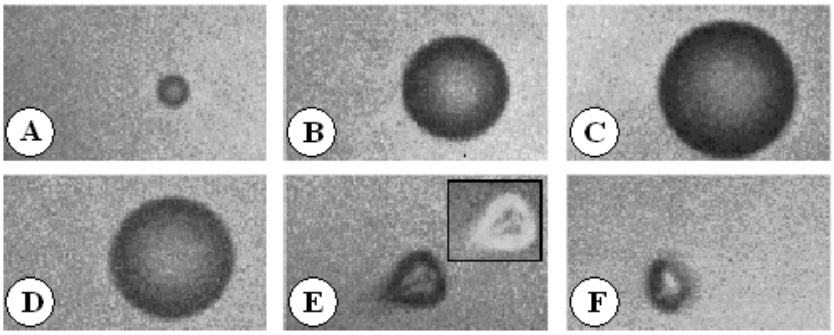


Figure 4 : Phénomènes de cavitation et formation de micro-jet (Postema *et al.* 2004). Les images de Michiel Postema (Erasmus MC Rotterdam) montre que les microbulles, sous l'effet des US, oscillent modifiant ainsi leur diamètre (A, B, C, D). Lorsque l'amplitude de ces oscillations est trop grande, elles se collapsent soudainement ce peut entraîner l'apparition de micro-jets et de micro-cisaillements dans le milieu environnant (E, F).

Albunex® (Mallinckrodt, USA) a été le premier agent de contraste à être utilisé dans la sonoporation (Bao *et al.* 1997). Aujourd'hui, les agents de contraste de deuxième génération, comme Optison® (GE Healthcare, France) sont plus employés car ils sont plus efficaces. Malgré que les ultrasons soient déjà largement utilisés pour des applications biomédicales et que les bio-effets en présence ou non d'agents de contraste soient décrits (Miller *et al.* 1996, Guzman *et al.* 2003), le mécanisme exact de l'augmentation de la perméabilité membranaire n'est pas connu.

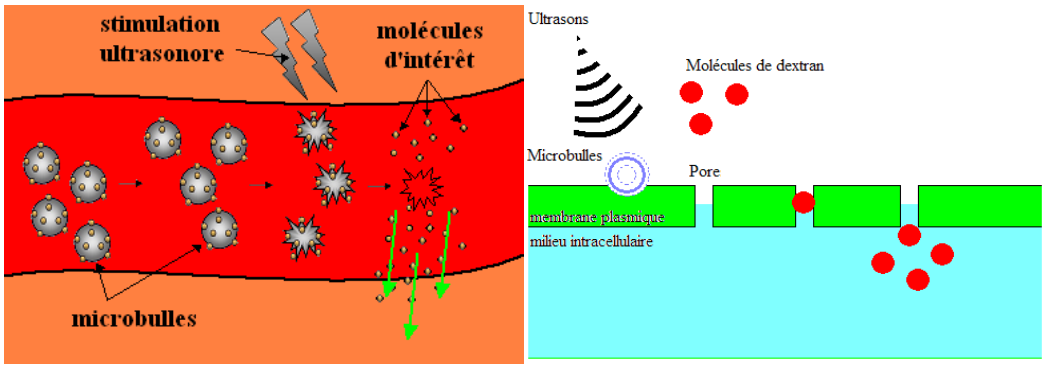


Figure 5 : Thérapie cellulaire permettant la libération de manière contrôlée et ciblée d'agents thérapeutiques par les microbulles par les ultrasons. Via une augmentation transitoire de la pression acoustique, les microbulles sont détruites et libèrent dans l'environnement immédiat les molécules d'intérêt vectorisées. Ce phénomène entraînent une augmentation localisée de la concentration en principe actif qui amplifie son effet (image de gauche). Les molécules portés par les microbulles peuvent également traversé la membrane cellulaire, passage qui est potentialisée par les ultrasons et les microbulles via la sonoporation (image de droite).

3. La vectorisation

L'utilisation des microbulles rend possible la protection des molécules d'ADN en les encapsulant dans les particules (Frenkel *et al.* 2002, Teupe *et al.* 2002) ou en les greffant à leur surface (Vannan *et al.* 2001). Les agents de contraste servent alors de noyaux de cavitation et de vecteurs en incorporant dans ou sur leur membrane (figure 6). Le gène thérapeutique peut être administré par voie systémique et n'est libéré qu'au niveau des cellules cibles par la destruction des microbulles sous l'action des ultrasons. Actuellement, peu d'études illustrent une telle approche mais ce concept est en plein développement. Récemment, des résultats *in vitro* (Bao *et al.* 1997 ; Miura *et al.* 2002) et *in vivo* (Taniyama *et al*. 2002, Lu *et al.* 2003, Azuma *et al.* 2003) ont démontré le potentiel de cette méthode.

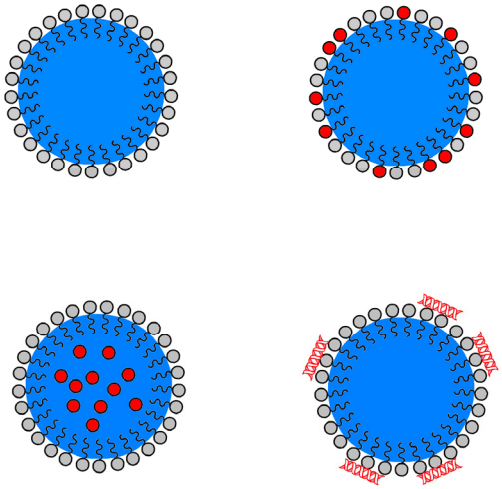


Figure 6 : Vectorisation des molécules d'intérêt par les agents de contraste (d'après un schéma de Unger *et al.* 2000). Unger (Unger *et al.* 2000) et Schummann (Schummann et al. 2002) ont montré par leurs différentes études, que les microbulles ultrasonores pouvaient porter sur leur membrane ou dans leur membrane différente molécules ou même des plasmides. Certaine méthode de préparation permette aussi de venir encapsuler les molécules d'intérêt afin de pouvoir les protéger ou d'éviter qu'elles n'interagissent de manière non voulue avec leur environnement.

4. Transfection et thérapie par les ultrasons et les microbulles

Depuis 1995, un grand nombre d'études a permis de démontrer la faisabilité d'une thérapie cellulaire basée sur les ultrasons, les microbulles et différents type de plasmide comme le montre la figure 7 (Porter *et al.* 1996 ; Bao *et al.* 1997 ; Mukherjee *et al.* 2000 ; Shohet *et al.* 2000 ; Taniyama *et al.* 2002 ; Teupe *et al.* 2002 ; Porter *et al.* 2003). Les études *in vitro* ont eu pour objet de démontrer la faisabilité sur de nombreuses lignées cellulaires telles que CHO (Mehier-Humbert *et al.* 2007 ; Duvshani-Esthet et Machluf 2007 ; Haag *et al.* 2006), HeLa (Lai *et al*. 2006), MATB III (Mehier-Humbert *et al.* 2005 ; Mehier-Humbert *et al.* 2005). Ces expériences ont également permis l'étude des paramètres ultrasonore optimaux

pour la transfection ou l'incorporation de molécules telles que le dextran de différents poids moléculaires. Tsutsui et son équipe ont notamment montré qu'il existe une relation entre le taux de transfection qui peut atteindre 40% et le temps d'exposition ainsi que la quantité de plasmide (Tsutsui *et al.* 2004). Cependant, l'intensité des ultrasons ne semble pas modifier le rendement de la transfection.

Author	Transfection	Transducer frequency	Delivery mode	Delivery site	Output	Peak negative pressure	Microbubble	Efficacy
Porter TR, et al[1]	Antisense *c-myc* protooncogene	1 MHz	PW	Coronary arteries	0.6 W/cm²		PESDA	+
Zhou Z, et al[2]	VEGF	1 MHz	CW	Myocardium	1.2 W/cm²		Sonazoid	+
Taniyama Y, et al[3]	Luciferase			Carotid artery	2.5 W/cm²		Optison	+
Teupe C, et al[4]	β-galactosidase/ eNOS	2.2–4.4 MHz	CW	Coronary arteries			Gas-filled albumin microbubble	+
Porter TR, et al[5]	Antisense *c-myc* protooncogene	2 MHz	CW	Carotid artery		13 kPa	PESDA	-
		20 kHz	CW	Carotid artery		46 kPa	PESDA	+
Mukherjee D, et al[6]	VEGF	1.0 MHz	CW	Myocardium	0.2 W/cm²	0.164 MPa	PESDA	9.37 ± 1.98*
		1.0 MHz	CW	Myocardium	0.4 W/cm²	0.194 MPa	PESDA	18.58 ± 2.46*
		1.0 MHz	CW	Myocardium	0.6 W/cm²	0.328 MPa	PESDA	23.12 ± 3.95*
		1.0 MHz	CW	Myocardium	0.8 W/cm²	0.394 MPa	PESDA	25.46 ± 2.78*
		1.0 MHz	CW	Myocardium	1.0 W/cm²	0.419 MPa	PESDA	26.48 ± 3.98*
Shohet RV, et al[7]	β-galactosidase	1.3 MHz	ECG-triggered	Myocardium			Perfluorocarbon-filled microbubbles	+
Bao S, et al[8]	Luciferase	2.25 MHz		Cultured cells		0.2–0.4 MPa	Albunex	+

* Efficacy is demonstrated as mean ± SD endothelial vascular growth factor uptake by enzyme-linked immunosorbent assay. CW = continuous wave; ECG = electrocardiogram; eNOS = endothelial nitric oxide synthase; PESDA = perfluorocarbon-exposed sonicated dextrose and albumin; PW = pulsed wave; VEGF = vascular endothelial growth factor.

Figure 7 : **tableau récapitulant les paramètres ultrasonores et le type de microbulles utilisées pour les expériences de thérapie et de transfection par les ultrasons et les microbulles (Tsutsui *et al.* 2004).**

Les nombreuses expériences *in vivo* ont surtout permis de développer les protocoles d'injection et des stratégies de thérapeutique : intraveineuse (Porter *et al.* 2001) , intra-artérielle (Pislaru *et al.* 2003), intramusculaire (Wang *et al.* 2005), dans différents tissus comme les tumeurs cancéreuses (Song *et al*. 2002), tumeurs prostatiques (Haag *et al.* 2006), îlots pancréatiques (Chen *et al.* 2006). Il existe de très nombreuses possibilités qui ont toutes ou presque données des résultats satisfaisants en combinant imagerie et thérapie. Suzuki et son équipe montrent notamment qu'en présence de microbulles, l'intégration du gène de la luciférase est accentuée ce qui met en évidence la faisabilité, *in vivo*, de la transfection médiée par les ultrasons et les microbulles (Suzuki *et al.* 2008) probablement en augmentant transitoirement la perméabilité membranaire et en potentialisant la sonoporation (Brayman *et al.* 1999 ; Sundaram *et al*. 2003). La sonoporation coïncide avec l'augmentation de l'incorporation cellulaire et l'amplification de l'effet de la molécule d'intérêt (Mehier-Humbert *et al.* 2005 ; Van Wamel *et al.* 2006 ; Lai *et al.* 2006).

III. Les interactions bulle-cellule.

1. « Le massage cellulaire» : stress mécanique

Sous l'effet des ultrasons, le diamètre des microbulles oscillantes varie avec une très grande amplitude (<1µm lors de la compression, >8µm mors de la dépression). Cette forte variation de la forme de la microbulle peut, par hypothèse, engendrer des perturbations localisées du type étirement ou pression mécanique (plus l'amplitude des oscillations sera grande, plus les étirements vont être important) induite sur le tissu adjacent. Cette hypothèse est soutenue par une observation réalisée par une équipe de recherche hollandaise. En effet, Van Wamel et son équipe, à l'aide d'une caméra à ultra grande vitesse (>10MHz), ont pu enregistrer les images présentées dans la figure 8 et observer une très forte déformation de la membrane plasmique lors des différents cycles de compression et dilatation de la microbulle : ils ont appelé ce phénomène le massage cellulaire (Van Wamel *et al.* 2004). A partir de ces observations, il est facile d'imaginer que les oscillations de la microbulle induisent une contrainte mécanique sur la cellule.

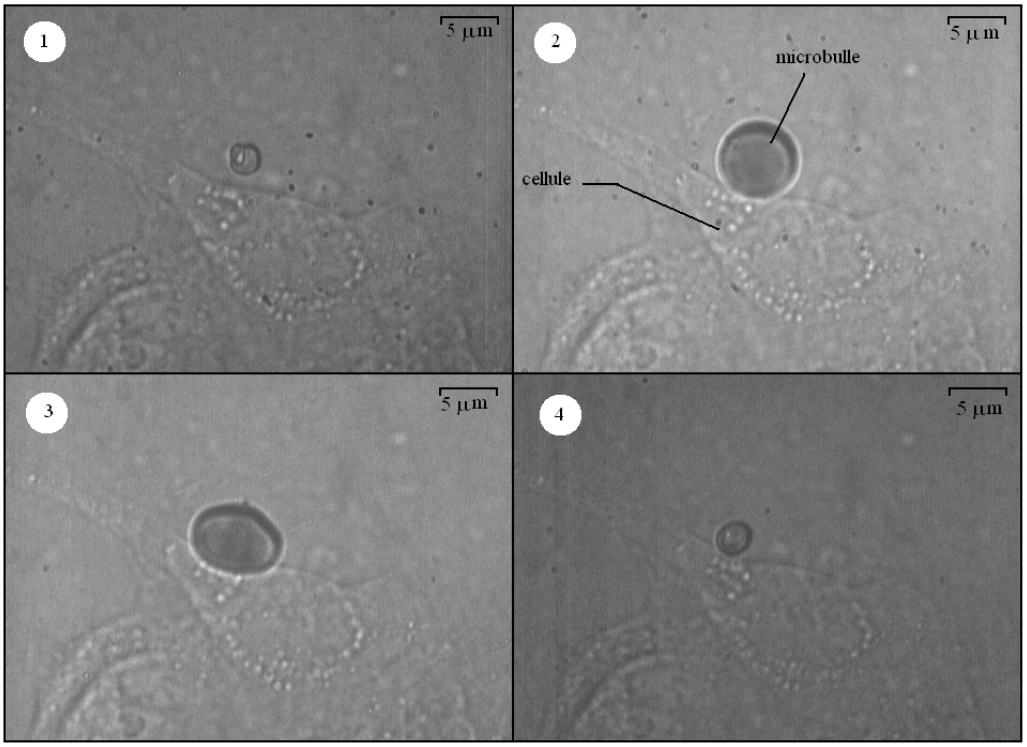


Figure 8 : Observation du massage cellulaire (Van Wamel *et al.* 2004). Images réalisées à Rotterdam à l'aide d'une caméra à très grande vitesse ($>10^7$ images/seconde) d'une microbulle qui oscille sous l'effet des ultrasons. Chronologiquement (au temps 1, 2, 3 et 4), on peut observer la très grande amplitude des oscillations de la microbulle qui viennent déformer la membrane plasmique d'une cellule épithéliale voisine.

Le stress mécanique ou la pression mécanique est impliqué dans un très grand nombre de mécanisme de régulation régissant le fonctionnement de la cellule. En effet, les forces mécaniques peuvent déclencher des voies de signalisation intracellulaire que nous allons développer au cours des prochains chapitres. L'étude des protéines régulées par les forces mécaniques est en émergence et entre dans un domaine dit de la mécano-biologie. Les processus impliqués qui conduit la stimulation mécanique à une réponse cellulaire est appelé mécano-transduction. Des études récentes ont montré que la mécano-transduction est un phénomène extrêmement rapide. En effet, les premiers éléments de la transduction signal apparaissent <300 ms après la stimulation et se propagent très rapidement dans la cellule (Na *et al*. 2008). Il faut également souligner que le rôle du cytosquelette est primordial.

2. Le cytosquelette

2.1. le cytosquelette : introduction

Le cytosquelette forme l'armature interne de la cellule (figure 9). Il est formé par un réseau de fibres protéiques qui est responsable de la forme particulière de chaque type de cellules, de la résistance aux tensions, des mouvements cellulaires, des liaisons intercellulaires et l'ancrage des organites en des sites définis dans la cellule. Il forme également un réseau complexe sur lequel peut s'appuyer le trafic intracellulaire.

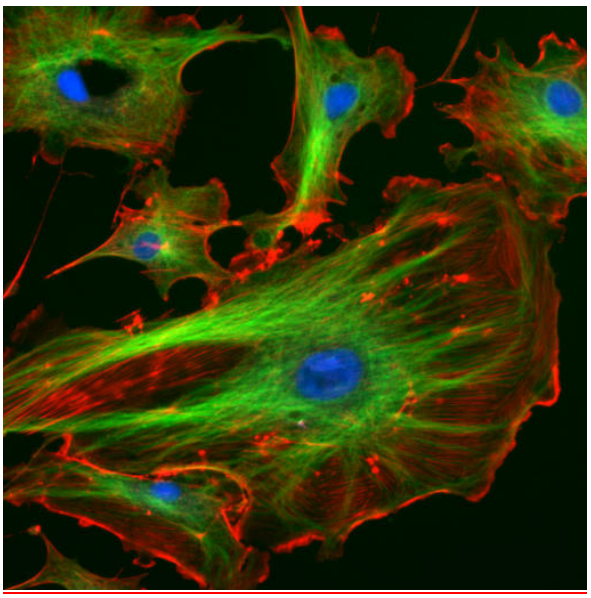


Figure 9 : Marquage des différents élements du cytosquelette d'une cellule eucaryote : (bleu) le novaux, (vert) la tubuline, et (rouge) l'actine. (http://fr.wikipedia.org/wiki/Cytosquelette)

Le cytosquelette, est un système dynamique, s'assemblant et se désassemblant constamment, formant ainsi, par polymérisation et dé-polymérisation, de longues chaînes protéiques ou filaments. Le cytosquelette est constitué de trois types de filaments: les microtubules, les microfilaments et les filaments intermédiaires.

- ***Microfilaments.***

Mise en forme : Puces et numéros

Les microfilaments sont de longues fibres d'un diamètre d'environ 7 nm composées de protéines globulaires, l'actine, formant deux chaînes protéiques entrelacées (figure 10). Les molécules d'actine s'associent en microfilaments, même *in vitro*. La vitesse de polymérisation des molécules d'actine est régulée par d'autres protéines qui fonctionnent comme des commutateurs, enclenchant le processus de polymérisation au moment approprié. Les micro-filaments sont responsables des phénomènes tels que contraction, reptation, la division des cellules ou la formation de pseudopodes.

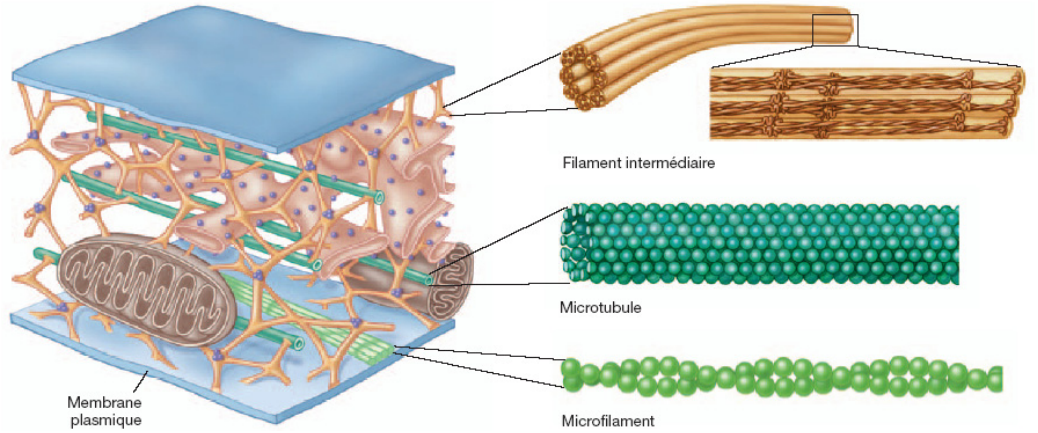


Figure 10 : Les molécules constitutives du cytosquelette. *Microfilaments :* constitués de deux brins torsadés constitués chacun d'un chapelet d'une protéine globulaire, l'actine. On trouve des microfilaments un peu partout dans la cellule mais en particulier sous la membrane plasmique où ils sont regroupés en faisceaux dénommés fibres de tension, qui peuvent avoir une fonction contractile. *Microtubules :* les microtubules sont composés de sous-unités de tubuline, protéines disposées côte à côte pour former un tube. Il s'agit d'éléments relativement rigides du cytosquelette, impliqués dans l'organisation du métabolisme, le transport intracellulaire et la stabilisation de la structure cellulaire. *Filaments intermédiaires* : les filaments intermédiaires sont composés de tétramères imbriqués et décalés de protéines. Cette disposition confère une force mécanique énorme à la cellule. (Raven *et al.* 2007)

- ***Microtubules***

Mise en forme : Puces et numéros

Les microtubules sont des tubes creux d'un diamètre d'environ 25 nm, formés de 13 protofilaments protéiques (figure 10). Chaque protofilament est formé par la polymérisation

de dimères de protéines globulaires : α et β tubuline. Les microtubules prennent naissance au niveau de centres de nucléation situés au niveau du noyau de la cellule. La demi-vie moyenne d'un microtubule varie de 20 s à 10 min. Selon le type cellulaire et la phase de la division cellulaire. Outre leur implication dans la facilitation des mouvements cellulaires, les microtubules sont également responsables du mouvement de matériaux au sein même de la cellule grâce à des protéines spécifiques (kinésines, dynéines,…) (Raven *et al.* 2007).

- ***Filaments intermédiaires.***

Mise en forme : Puces et numéros

Les filaments intermédiaires sont constitués de protéines fibreuses résistantes formant des structures tubulaires d'un diamètre de 8 à 10 nanomètres (figure 10). Les filaments intermédiaires sont stables et ne se dissocient pas. Ils constituent un groupe hétérogène de fibres du cytosquelette. Le type le plus commun, composé de sous-unités protéiques appelées vimentine, procure la stabilité structurale à de nombreux types cellulaires. La kératine, une autre classe de filaments intermédiaires, se trouve dans les cellules épithéliales, les cheveux et les ongles. Les filaments intermédiaires des cellules nerveuses sont appelés neurofilaments.

2.2. le rôle du cytosquelette

Le cytosquelette contribue par de nombreuses manières aux différentes fonctions au sein de la cellule. De manière non exhaustive, la liste des rôles du cytosquelette est en constante évolution :

Mise en forme : Puces et numéros

- La régulation de la forme de la cellule : forme cellulaire au repos (fusiforme,…), formation de protrusions ou d'involutions membranaires (phagocytose, la migration cellulaire,...) ou encore la contraction des cellules musculaires.
- L'ancrage aux membranes des cellules voisines ou sur la matrice extracellulaire.
- Le maintien de la structure interne (des organites et des compartiments cellulaires).
- Le transport de protéines ou d'ARNm.
- La division cellulaire (séparation des chromosomes lors de la mitose, formation de l'anneau mitotique permettant la cytodiérèse).

Ainsi, au vu de l'importance du cytosquelette, la perturbation de ce dernier entraîne des modifications non négligeables du fonctionnement cellulaires. De plus, comme le cytosquelette et la membrane plasmique sont intimement liés, la perte de l'intégrité de l'un

comme de l'autre va engendrer une dérégulation du fonctionnement cellulaire que nous allons développer dans les paragraphes suivants.

3. Conséquences des déformations membranaires : les systèmes de mécano-transduction

De nombreux récepteurs et molécules présents à la surface des cellules musculaires lisses ou des cellules endothéliales sont sensibles aux forces mécaniques. Le cytosquelette et d'autres composants structuraux ont un rôle dans les processus de mécano-transduction.

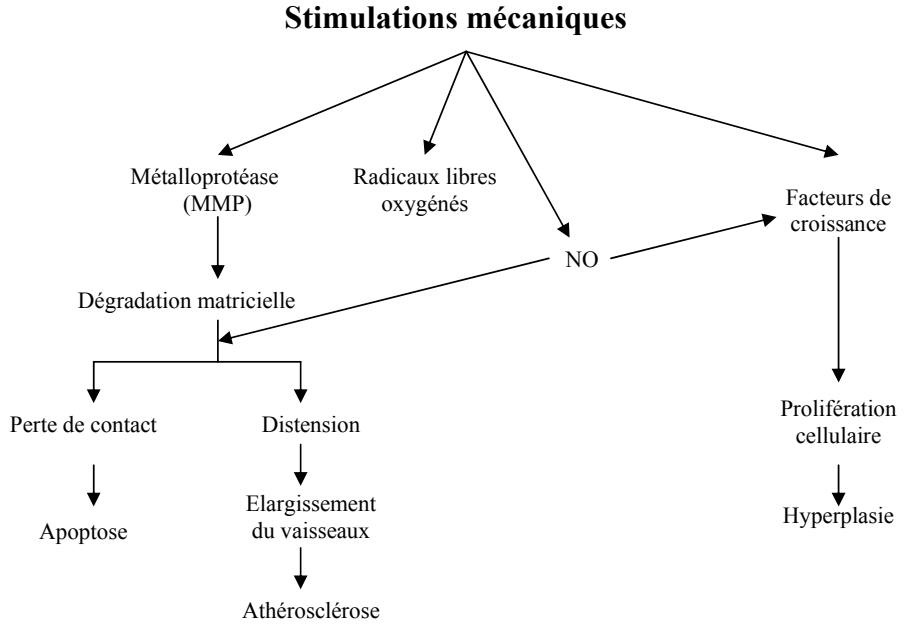


Figure 11 : Exemple de cascade de réaction et modifications physiologiques induites par les stimulations et contraintes mécaniques sur les vaisseaux et les cellules endothéliales. Les vaisseaux sanguins sont continuellement soumis à des contraintes mécaniques pulsées induites par la circulation sanguine (10-15 dyn/cm² quelque soit la partie du réseau artériel considéré). Toute variation de ces contraintes est perçue au niveau des cellules vasculaires et se traduit par des modifications fonctionnelles et structurales des vaisseaux. De nombreux récepteurs, présents à la surface des cellules endothéliales, sont sensibles aux forces dites de cisaillement ou « Shear stress ». Ces contraintes vont initier des cascades de réactions qui permettent aux vaisseaux sanguins de s'adapter à son environnement mécanique. La régulation des contraintes est assurée par des mécanismes humoraux autocrines ou paracrines qui permettent de modifier les paramètres hémodynamiques localement (Glagov *et al.* 1994 ; Tronc *et al.* 1996). Par exemple, lorsque que le débit sanguin augmente, les MMP (métalloprotéases matricielles) vont être produits, induisant une dégradation des fibres élastiques et entraîner une vasodilatation des vaisseaux ou l'apoptose des cellules. D'autres molécules dont la présence et la quantité est modulé par le stress mécanique existent (monoxyde d'azote, facteurs de croissance, radicaux libres,…) et peuvent avoir des conséquences très différentes voir contracdictoire (hyperlasie).

Outre les modifications structurales induites par les forces mécaniques, celles-ci peuvent déclencher des cascades complexes d'événements biochimiques qui conduisent à des changements fonctionnels dans la cellule qui peuvent être très différents et mêmes parfois opposée (apoptose – prolifération cellulaire) comme le montre la figure 11. La conséquence

des stimulations mécaniques dépend des voies sensibles aux déformations membranaires activées. Le stress mécanique peut notamment induire (figure 12) :

- l'activation de canaux ioniques sensibles à l'étirement (SAC : Strectch Activated Channels) et entraîner des modifications physiologiques et électrophysiologiques.
- la stimulation les intégrines situées sur la membrane plasmique et le déclenchement de la voie des MAP-kinases qui vont profondément modifier le fonctionnement et la physiologie des cellules.
- l'activation FAK
- la stimulation des protéines G.
- des modifications de la concentration de différentes molécules comme les monoxydes d'azote, de calcium,…

Chacune des voies citées précédemment va faire l'objet d'un chapitre qui afin de mieux préciser le fonctionnement et les conséquences de leur activation.

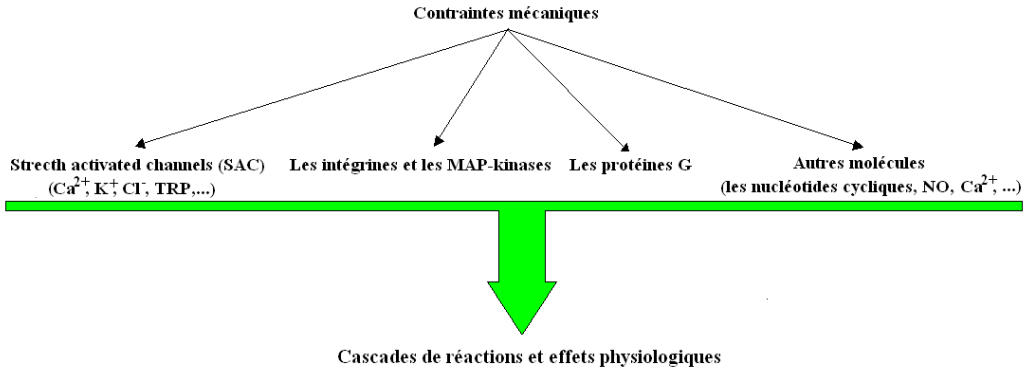


Figure 12 : Effets du stress mécanique. Les contraintes mécaniques sont perçues par la cellule par un certain nombres de voies sensibles aux stress mécaniques. Ces forces mécaniques activent des cascades de réaction qui, selon les voies impliquées, vont avoir des effets très différents. Parmi ces voies, nous pouvons remarquer, entre autres les canaux ioniques ioniques, les intégrines, les MAP-kinases, les protéines G,…

3.1. Les canaux ioniques activés par le stress mécanique (SAC)

Supprimé : 2

L'activité électrique de la cellule est régit par la répartition des ions de part et d'autres de la membrane plasmique ainsi que leur mouvement à travers cette membrane. Les mouvements ioniques trans-membranaires se font via des mécanismes tel que la diffusion passive, le transport facilité ou encore le transport actif.

La diffusion passive peut se définir comme le passage spontané d'une molécule à travers la membrane plasmique dans le sens du gradient de concentration (du plus concentré vers le moins concentré). En prenant la composition chimique de la membrane plasmique, certaines substances solubles dans les lipides de petites tailles (O_2, CO_2, les vitamines A, D, K

et E, les différents acides gras, les hormones de type stéroïdes) peuvent entrer dans la cellule via ce phénomène.

Le transport actif implique quant à lui le transfert d'une molécule contre le gradient de concentration. Il y a donc nécessité de fournir de l'énergie et ce transport n'est pas spontané. Il existe deux types de transport actif selon la source d'énergie utilisée. Le transport actif nécessite des protéines de transport (transporteurs) utilisent directement (transport actif secondaire) ou indirectement (transport actif secondaire) l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP. Les transporteurs changent de forme pour déplacer des molécules d'un compartiment vers un autre.

Pour la diffusion facilitée, comme pour la diffusion simple, le gradient électrochimique est le moteur qui va induire le passage d'un compartiment vers un autre au lieu de l'hydrolyse de l'ATP. Cependant, la molécule ne traverse pas directement la membrane mais utilise une protéine trans-membranaire de transport. Ces protéines sont des protéines de canal ou canaux ioniques. Le transport par les canaux ioniques est caractérisé par une forte sélectivité (très spécifique, les protéines ne laissent passer qu'une ou quelques sortes de molécules), une grande rapidité et une activité conditionnée. En effet, les canaux ioniques sont régulés par un grand nombre de stimuli qui vont par ailleurs les caractérisé (étirement, voltage, ligand,…). Il existe 3 principales familles de canaux ioniques classés en fonction du régulateur principal :

- les canaux ioniques dépendant du voltage comme certains canaux sodiques ou potassiques que l'on retrouve au niveau des axones et des terminaisons nerveuses

- les récepteurs-canaux reconnaissant des ligands extra ou intracellulaires (GABA, Glycine, les canaux sensibles au calcium, ATP, AMP cyclique, GMP ou encore certains phospho-inositides PI)

- la troisième famille se compose de récepteurs canaux particuliers qui ne sont pas activé par des stimuli chimiques mais par des stimuli mécaniques. Les canaux mécano-sensibles et les canaux régulant le volume cellulaire font parti d'une famille à part entière.

- ***Les canaux ioniques sensibles au stress mécanique (SAC)***

Les canaux ioniques sensibles aux stress mécaniques (ou Stretch Activated ion Channels ou SAC) s'ouvrent ou se ferment en réponse à un stimulus mécanique. Ces canaux ont été tout d'abord découvert sur le muscle squelettique (Guharay et Sachs, 1984) mais leur présence a été mise en évidence dans de nombreux types de cellules animales, végétales et bactériennes (Morris 1990 ; White et Le Guennec 1994). Ces canaux sont omniprésents et

occupent une place très importante dans les fonctions physiologiques de la cellule : transmission du son au niveau des cellules cochléaires (Ohmori 1984), régulation du volume cellulaire et du pH (Hoffmann et Simonsen 1988), remplissage des cellules de la vessie (Wellner et Isenberg 1993), la régulation du flux sanguin (Lansmann *et al.* 1987) ou encore les sensations tactiles (mécano-transduction au niveau des corpuscules de Pacini).

L'activation des SAC modifient très fortement les propriétés électrophysiologiques de la cellules. Cependant, la conséquence de cette activation ne s'arrête pas aux modifications du potentiel de membrane de la cellule mais peut aussi déclencher des cascades de réactions. Une pression mécanique imposée sur des cellules endothéliales isolées par exemple, peut entraîner une hyperpolarisation de leur membrane cellulaire liée à l'activation de canaux potassiques (Hoger *et al.* 2002). L'hyperpolarisation accroît l'entrée du Ca^{2+} (à la fois effecteurs et seconds messagers) qui s'accumulent dans le cytosol modifiant les fonctions cellulaires.

L'activité des SAC n'est pas exclusivement modulée par le stress mécanique (étirement ou compression). Ces canaux peuvent être également sensibles :

- au voltage (variation des charges de surface induit par d'autres canaux)
- à des messagers chimiques : inhibiteurs ou activateur des SAC
- un couplage impliquant le cytosquelette ou la bicouche lipidique (Ohno *et al.* 1993, Hoger *et al.* 2002).

Généralement, les méthodes d'investigation des canaux ioniques font appel à la technique de "patch-clamp" (voir chapitre matériels et méthodes). Le stimulus utilisé pour provoquer l'ouverture de ces canaux est le plus souvent la variation de la pression hydrostatique ou la succion par une pipette. L'activité des SAC, c'est à dire la probabilité d'ouverture ou de fermeture de ces canaux, dépend de l'intensité des stimuli mais aussi du temps de stimulation. La plupart de ces canaux sont sensibles au volume de la cellule et sont activés lorsque la cellule se trouve dans un milieu hypo-osmotique (Watson 1989 ; Kim et Fu 1993 ; Tseng-Crank 1993). Ces canaux peuvent être activés lentement par des composés amphiphatiques (tels que les anesthésiques locaux) car ces derniers s'incorporent et étirent la membrane plasmique et modifient les charges de surface (Martinac 1993). Il est important de rappeler qu'il existe aussi des canaux inactivés par l'étirement (Morris et Sigurdson 1989). Ceux-ci sont ouverts lorsque la membrane de la cellule n'est pas étirée et se ferment en réponse à l'étirement.

- ***Les canaux chlorures notamment $I_{Cl\ swell}$***

Le canal chlorure $I_{Cl\ swell}$ a d'abord été mis en évidence au niveau du cœur, sur des cellules auriculaires (Sorota *et al.* 1995 ; Hagiwara *et al*. 1992) et ventriculaires (Tseng *et al.* 1992). L'activation de $I_{Cl\ swell}$ semble non seulement directement lié à l'étirement (Hagiwara *et al.* 1992) mais aussi à :

- la phosphorylation : dans les conditions basales, le canal est phosphorylé sur un site de phosphorylation spécifique par une protéine kinase C (PKC). L'activation de $I_{Cl\ swell}$ serait consécutive à la réduction de l'activité de la PKC induite par le gonflement cellulaire (Sorota *et al*. 1992, Sorota *et al.* 1995, Duan *et al.* 1998).
- l'activation des voies des MAP-kinases : l'activité de $I_{Cl\ swell}$ est régulé notamment les tyrosines kinases et par la SRC kinase (Turner 2000 ; Browe *et al.* 2003 ; Parsons 2003).

Par ailleurs, les canaux $I_{Cl\ swell}$ sont inhibés par des inhibiteurs non spécifiques des tyrosines kinases comme génistéine et l'herbimycine A (Sorota *et al.* 1995 ; Sorata *et al.* 2005).

- ***Les BK_{Ca} : les canaux K^+ de grande conductance activés par le potentiel et le calcium intracellulaire.***

L'existence du courant IBK_{Ca} a été démontrée pour la première fois sur les cellules musculaires lisses (Marthy *et al.* 1981). L'activité de ces canaux est régulée par 3 paramètres distincts :

- le potentiel de la membrane cellulaire (le potentiel est >-20mV)
- la concentration de calcium intracellulaire (activation lorsque $[Ca^{2+}]_i > 300$ nM)
- les contraintes mécaniques (Gessner *et al.* 2005).

Ces canaux participent activement à la régulation du potentiel de repos de la cellule (Brayden *et* Nelson 1992) et à la modulation de la $[Ca^{2+}]_i$ liée aux sparks (Benham *et* Bolton 1986 ; Benham *et* Bolton 1987 ; Lee *et* Earm 1994) en exerçant un rétrocontrôle négatif via le potentiel de membrane lorsque que le calcium interne augmente.

Les canaux BK_{Ca} sont exprimés sur pratiquement toutes les cellules à l'exception de certaines cellules cardiaques (Peng *et al.* 1996, Toro *et al.* 1998). Les canaux BK_{Ca} sont associés à un grand nombre de phénomènes cellulaires tels que, la libération de neurotransmetteur (Kaczorowski et al. 1996), la génération spontanée de potentiels d'action, la régulation des différentes phases du potentiel d'action et surtout la régulation du tonus

contractile des muscles lisses vasculaires et visceraux (Brayden *et* Nelson 1992, Jackson *et* Blair 1998, Nelson 1992, Nelson *et al.* 1995, Nelson *et al.* 1990, Nelson *et* Quayle 1995, Latorre *et al.* 1989). Les canaux BK_{Ca} ont été également décrit dans les cellules neuronales et participeraient à l'excitabilité de ces cellules (Laumonnier et al 2006). Ces canaux seraient notamment impliqués dans des pathologies tel que l'autisme (Laumonnier *et al.* 2006 ; Levine *et al.* 2007).

- *structure du canal BK_{Ca}*

Le canal BK_{Ca} est constitué d'un tétramère d'isoformes de la sous-unité α pouvant chacune être complexée ou non à une sous-unité β. (Chang *et al*. 1997, Ding *et al*. 1998, Knaus *et al.* 1994, Shen *et al.* 1994, Tanaka *et al.* 1997, Toro *et al.* 1998, Wallner *et al.* 1999, Wanner *et al.* 1999).

La sous-unité α

La sous-unité α du canal BK_{Ca} est codée par le gène *slowpoke*. Ce gène connaît plusieurs dénominations qui varient en fonction de l'espèce dans lequel il s'exprime : *dslo* pour *drosophila slowpoke* (Atkinson *et al*. 1991, Yuan *et al.* 1998), *mslo* pour *mouseslowpoke* et *hslo* pour *human slowpoke* (Atkinson *et al.* 1991, Adelman *et al.*1992, Butler *et al.* 1993, McCobb *et al.* 1995). La sous-unité α (figure 13) comporte 11 domaines en hélice α dont 7 domaines transmembranaires allant de S0 à S6, 4 domaines hydrophobes intracellulaires (S7 à S10) et un segment formant le pore (Butler *et al.* 1993, Kaczorowski et Garcia 1999). La sous-unité α possèdent un certain nombre de sites (sensible au potentiel membranaire ou au calcium intracellulaire) permettant la régulation de l'activité du canal BK_{Ca}.

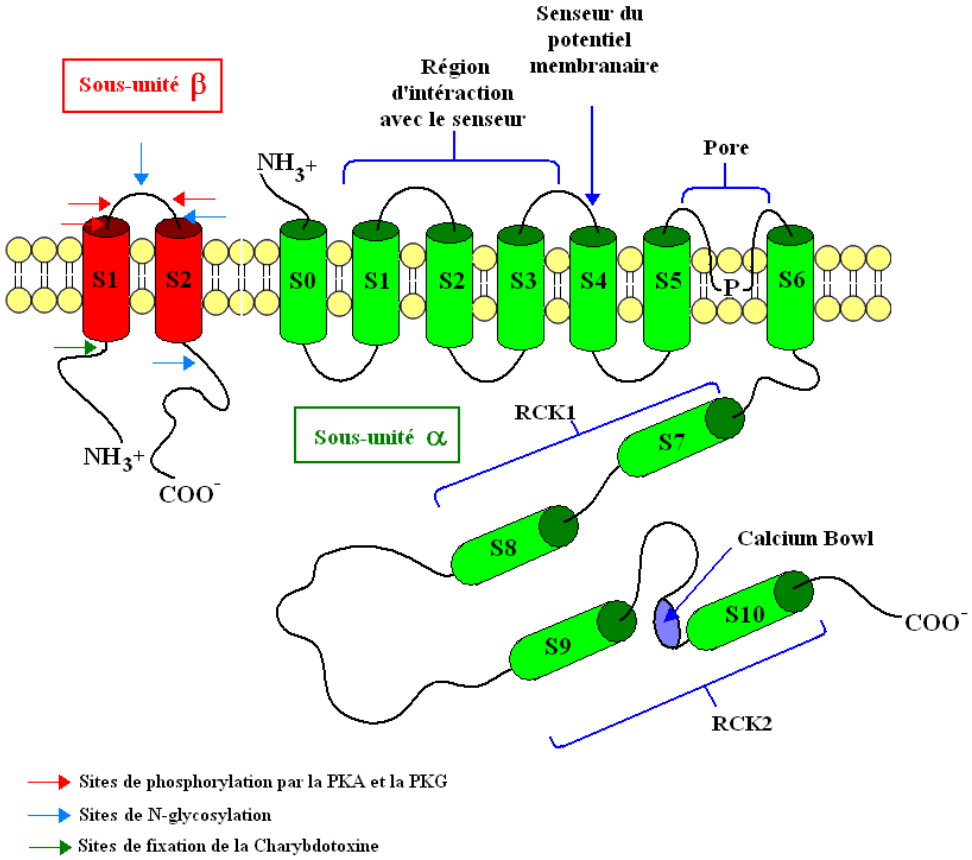


Figure 13 : Structure du canal BK_{Ca}. La sous-unité α comporte 11 domaines hydrophobes en hélice α (cylindres verts) dont 7 domaines trans-membranaires (S0 à S6) et 4 domaines intracellulaires (S7 à S10). La boucle située entre les segments S5 et S6 du canal possède une séquence caractéristique conférant la sélectivité au K^+ au pore (Wallner *et al.* 1996). Elle constitue le pore du canal (Toro *et al.* 1998). Le segment S4 porteur de 3 charges positives interagit avec les charges négatives présentes sur les segments SI, S2 et S3 (Toro *et al.* 1998). Le déplacement du segment S4 en réponse à une variation de voltage provoque l'ouverture du canal (Toro *et coll.* 1998). Les sites présumés de fixation du calcium se situent dans la partie C-terminale (Schreiber *et* Salkoff 1997, Wallner *et al.* 1999), principalement entre les régions intracellulaires S9 et S10, appelé la «boule calcique» ou «calcium bowl », (Schreiber et Salkoff 1997, Schreiber *et al.* 1999). Les domaines appelés RCK1 (Regulator of Conductance for K^+) interviennent, de part leur structure, dans la régulation du canal par le Ca^{2+} (Piskorowski *et* Aldrich 2002, Xia *et al.* 2002). RCK1 possède en effet des sites de fixation au calcium, induisant de part la fixation de ce dernier, un rétrocontrôle sur la $[Ca^{2+}]i$. Ces sites interagissent aussi avec la boule calcique (calcium bowl) située dans le RCK2 pour la régulation de BKc_a (Xia *et al.* 2002). Cependant, chaque site de fixation du calcium est à même de moduler indépendamment l'activité du canal (Cox *et al.* 1997, Shi *et* Cui 2001, Zhang *et al.* 2001). La partie C-terminale intervient également dans l'adressage du canal et sa tétramérisation (Bravo-Zehnder *et al.* 2000, Piskorowski *et* Aldrich 2002). La sous-unité α comprend une région hydrophobe additionnelle SO qui par sa position trans-membranaire oriente l'extrémité N terminale du côté extracellulaire (Meera *et al.* 1997, Wallner *et al.* 1996). La sous-unité β participe également à la régulation de l'activité du canal car il possède des sites de phosphorylation, de glycosylation et de fixation de toxines inhibitrices (Charybdotoxine par exemple).

Supprimé :

La sous-unité β

Il existe 4 types de sous-unités β qui diffèrent dans leur manière de modifier les propriétés du canal BK_{Ca} (Knaus *et al.* 1994 ; Xia *et al.* 1999). Les sous-unités β (figure 13) possèdent 2 domaines trans-membranaires séparés par une large boucle extracellulaire et des extrémités NH_3 et COOH intracellulaires (Brenner *et al.* 2000 ; Knaus *et al.* 1994 ; Meera *et al.* 2000, Weiger *et al.* 2000, Xia *et al.* 1999). Toutes les sous-unités β possèdent des séquences de N-glycosylation sur la boucle extracellulaire (Meera *et al.* 2000).

Les différents types de sous-unités β (β1, β2, β3 et β4) modulent chacune à leur manière :

- la fixation des toxines (Kaczorowski *et al.* 1996, Meera *et al.* 1996)
- la sensibilité au calcium (Toro *et al.* 1998)
- les cinétiques d'activation et de dé-activation (Kaczorowski *et al.* 1996, Meera *et al.* 1996)

La sous-unité β stabilise le canal lorsqu'il est dans l'état «ouvert» en augmentant la barrière énergétique à franchir pour quitter cet état. Le nombre de sous-unité β formant les canaux BK_{Ca} fonctionnels peut varier entre 1 et 4 ce qui modifie l'activité du canal (figure 14) (Wang *et al.* 2002).

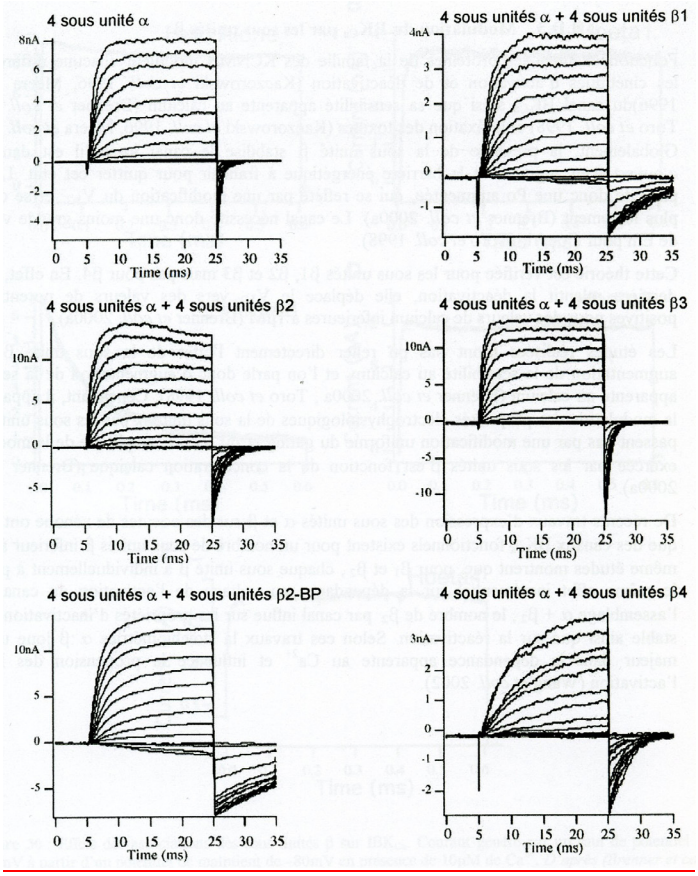


Figure 14 : Exemples de courants BK_{Ca} en fonction de la configuration des sous-unités β. Les courants sont enregistrés, en patch clamp (patch rompue, cellule entière) durant un protocole de type courbe IV (voltage clamp). Des créneaux de potentiels sont imposés de –80mV à +100mV par incrément de 20mV (de –80 à 0 mV) ou de 10 mV (de 0 à +100 mV). Les courants résultent de l'activation des canaux BKCa constitués de complexes composés de la sous unité α seule ou associant celle-ci à 4 sous unités β1, β2, β3, β4, β2-BP (sous-unités β2 mais sans la séquence peptidique inactivante). D'après Brenner *et al.* 2000.

Supprimé : ¶

- *Les caractéristiques électrophysiologiques du canal BK_{Ca}*

Les caractéristiques électrophysiologiques du canal BK_{Ca} résultent principalement des isoformes de la sous unité α.

Régulation du BK_{Ca}

Des études récentes ont montré que le BKc_a peut être activé par des voies métaboliques utilisant l'AMPc et le GMPc comme second messagers (Robertson *et al.* 1993). Ces voies entraîneraient une phosphorylation du canal BK_{Ca} par des protéines kinases (Shipston *et al.* 1996, Tian *et al.* 1998). Les sites de phosphorylation sont situés sur la sous-

unité α majoritairement sur la partie C-terminal (Shipston *et al.* 1999). Cependant, l'activité des protéines kinases sur le canal est modifiée par la présence d'une sous-unité β (Dworetzky *et al.* 1996). Les canaux BK_{Ca} peuvent ainsi être phosphorylés par les PKA (Barman *et al.* 2003, Schubert *et* Nelson 2001), PKG (Barman *et al.* 2003) ou encore les PKC (Zhou *et al.* 2001).

Activateurs du BK_{Ca} :

Les triterpènes glycosylés, tels que la déshydrosoyasaponine I (DHS-I) tirée d'une herbe médicinale *(Desmodium Ascendens),* se fixent sur la sous-unité α et active (EC_{50} = 7,6 µM) le canal BKCa (McManus *et al.* 1993 ; Giangiacomo *et al.* 1998 ; Wallner *et al.* 1999 ; Kaczorowski et Garcia 1999). Cependant, il a été montré que la présence de la sous unité β est requise pour permettre l'activation par le DHS-I (Toro *et al.* 1998) alors que le site de fixation se situe sur la sous-unité α (Wallner *et al.* 1999). La présence de la sous- unité β2 modifie en effet la pharmacologie du BK_{Ca} (McManus *et al.* 1993) en augmentant son affinité (EC_{50} = 139 nM) (Wallner *et al.* 1999) par rapport à un canal formé de sous-unités α uniquement.

Les benzimidazoles sont capable d'activer directement le canal BK_{Ca}, indépendamment de la quantité de calcium intracellulaire, mais sont relativement peu spécifiques. En effet, ils inhibent aussi un grand nombre de courants potassiques tels que IK_R, IK_{ATP} et certaines conductances chlorures (McKay *et al.* 1994 ; Xu *et al.* 1994 ; Strobaek *et al.* 1996).

Certains dérivées des indoles, tel que le CGS7184, activent également le canal BK_{Ca} (EC_{50} entre 1 et 100 nM) (Kaczorowski et Garcia 1999).

Inhibiteurs du BK_{Ca} :

Supprimé : ¶

Les canaux BK_{Ca} sont sensibles à des toxines, issues de venins de scorpion toutes composées de 37 acides aminés : la charybdotoxine (ChTx : IC_{50} entre 5 et 10 nM) issue du *leiuras quinquestriatus,* la limbatotoxine (LbTx : IC_{50} entre 1 et 5 nM) issue du *centruroides limbatus* et l'ibériotoxine (IbTx : IC_{50} entre 6 et 11 nM) issue du *buthus tamulus.* Ces peptides se fixent de façon réversible sur la partie externe du canal (Coetzee *et al.* 1999, Giangiacomo *et al.* 1992, Jackson et Blair 1998, Korovkina et England 2002, Peng *et al.* 1996) et empêchent par encombrement stérique le passage d'ions K^+. Il est important de souligner que l'IbTx et la LbTx font preuve d'une grande spécificité pour le BK_{Ca} alors que la ChTx est moins spécifique et bloque d'autres canaux potassiques comme les Kv par exemple (Coetzee *et al.* 1999).

Le rouge de ruthénium, un composé métallo-organique, diminue aussi l'activité du canal BK_{Ca} sans pour autant modifier la conductance unitaire. L'action de ce composé est néanmoins annulée par une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire. Le rouge de ruthénium n'est pas un bloqueur spécifique puisqu'il bloque aussi les récepteurs à la ryanodine (diminuant ainsi les libérations spontanées de calcium) et le courant calcique (Wu *et al.* 1999).

Les indoles tels que la paxilline et l'aflatrem (alcaloïdes fongiques) sont de puissants inhibiteurs du canal BK_{Ca} (Kaczorowski et Garcia 1999, Knaus *et al.* 1994). Les sites de fixation de ces composés se situent sur la sous-unité α du canal (Kaczorowski et Garcia 1999, Knaus *et al.* 1994).

Le TEA bloque aussi efficacement le canal BK_{Ca} (IC_{50} : entre 150 et 300 µM) par encombrement stérique du canal (Korovkina et England 2002, McCobb *et al.* 1995, Peng *et al.* 1996).

- ***Les autres canaux potassiques***

Supprimé : ¶

- *Le canal K_{ATP}*

Les canaux K_{ATP} sont activés lorsque le taux d'ATP devient inférieur à 5 mM ou lorsqu'une pression négative est appliquée sur la membrane cellulaire (Woo *et al.* 2008, Van Wagoner *et al.* 1993). La sensibilité du canal à l'ATP est médiée par le cytosquelette notamment par les filaments d'actine (Terzic et Kurachi 1996). Il est important de souligner que son activité dépend de l'intégrité du cytosquelette de la cellule. En effet, si l'architecture du cytosquelette est perturbée, lors du massage cellulaire par exemple, on peut penser que l'activité de ces canaux est peut être fortement modifiée.

- *Les canaux potassiques I_{Kr} et I_{Ks}*

Sur les myocytes ventriculaires de cobaye, le gonflement cellulaire induit par l'application d'une solution hypotonique, qui provoque une entrée d'eau dans la cellule, active une conductance potassique (Sasaki *et al.* 1992). Cette conductance potassique est formée d'une composante lente, constituée par I_{Ks} (majoritaire) et une composante rapide, I_{Kr} (minoritaire) (Rees *et al.* 1995 ; Groh *et al.*1996). L'activation des canaux I_{Kr} et I_{Ks} tendent à hyperpolariser la membrane cellulaire ou, dans le cas d'une cellule déjà dépolarisée comme durant un potentiel d'action, permettent de repolariser la cellule.

- ***Les TRP (Transcient Receptor Potential)***

Ces TRP formés de 6 segments trans-membranaires peuvent être classés en 7 sous-familles sur la base de l'homologie structurale (TRPC, TRPV, TRPM, TRPN, TRPA, TRPP et TRPML) mais ayant pour chacun d'eux des caractéristiques fonctionnelles propres (Clapham *et al.* 2001). Les TRP sont activés par de nombreuses voies de signalisation allant du second messager aux paramètres tels que la température, l'osmolarité et le stress mécanique (Ramsey *et al.* 2006). L'activation des TRP entraîne des mouvements de sodium et de calcium à travers la membrane plasmique, ce qui a pour conséquence, une dépolarisation et une augmentation de la concentration intracellulaire de ces 2 ions. L'activité des TRP est régulée par (Honore *et al.* 2008) :

- protéine G couplé à des récepteurs (GPCRs) et les récepteurs tyrosines kinases activent les phospholipases C (PLC) qui viennent moduler l'activité de TRP par :

- hydrolyse de phosphatidyl-inositol bisphosphate (PIP2)

- production du diacylglycerol (DAG)

- production de trisphosphate d'inositol (IP3) et libération du Ca^{2+} intracellulaires (Clapham 2007).

- Des Ligands peuvent activer les TRP. Ces ligands peuvent être :

- petites molécules exogènes : capsaïcine, icilin, 2-APB (Bootman *et al.* 2002) …

- lipides ou produits endogènes de métabolisme des lipides : diacylglycerols, phosphoinositides, eicosanoids, anandamide…

- nucléotides purinergiques

- ions inorganiques : Ca^{2+} et Mg^{2+}

- Les TRP peuvent être directement activer par certains stimuli. Des changements de la température activent les TRPV1, 2 et 3 et TRPM8 par des mécanismes encore mal compris (Clapham *et al.* 2002). Les TRP peuvent également être activés par le pH ou encore les lipides (Voets *et al.* 2003 ; Honore *et al.* 2006). Les stimuli mécaniques peuvent également activer les TRP (Vriens *et al.* 2004 ; Plant *et al.* 2007 ; Vriens *et al.* 2007). Il a été montré qu'un étirement ou une pression mécanique pouvaient activer les TRPC1 (Gottlieb *et al.* 2008), les TRPC6 (Spassova *et al.* 2006 ; Gottlieb *et al.* 2008), les TRPM4 via le calcium intracellulaire (Welsh *et al.* 2002 ; Earley *et al.* 2004) et les TRPM7 (Oancea *et al.* 2006).

Supprimé : 2.7

3.2. Les intégrines et les kinases

Les récepteurs membranaires de type tyrosine kinase semblent participer activement à la mécano-transduction. Sur les cellules endothéliales par exemple, la contrainte de cisaillement induit une phosphorylation transitoire du récepteur du VEGF (*vascular endothelial growth factor*) qui agit sur les récepteur tyrosine kinase et modifie l'association de Flk-1 avec la protéine adaptatrice Shc, elle-même liée aux intégrines αvβ3 et β1 (Chen *et al.* 1999). La dissociation de Flk-1 et de Shc qui agit notamment sur Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) et Sos (*son of sevenless*), atténue les cascades d'activation en aval et la transcription de gènes (Chen *et al.* 1999) (figure 15).

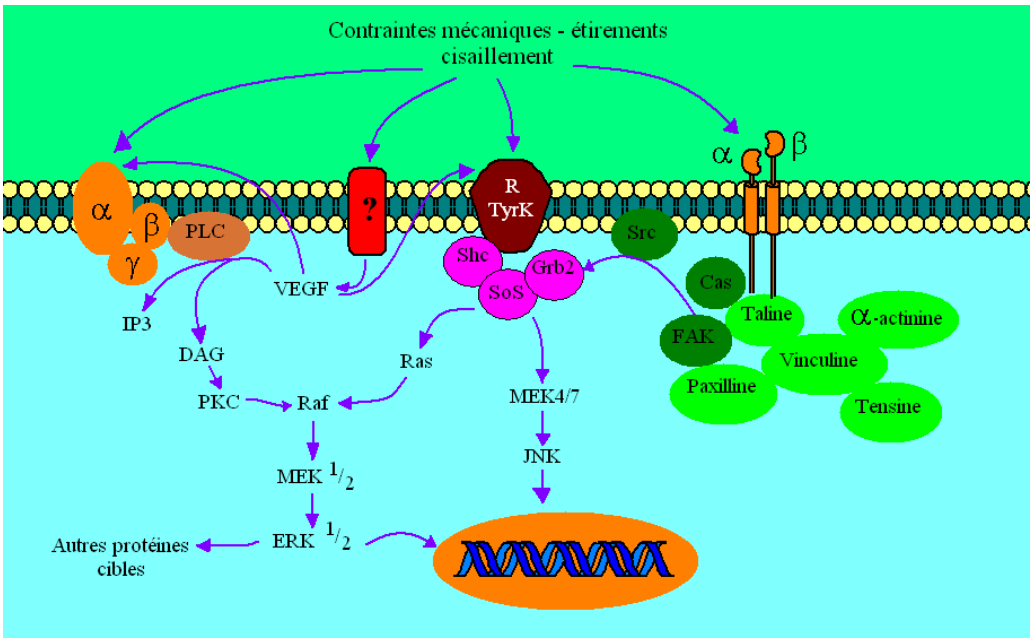


Figure 15: La voie des MAPK kinases. La cascade des MAP-kinases (mitogen activated protein kinases) comporte plusieurs voies distinctes : ERK 1/2 (extracellular signal-regulated protein kinases 1/2), JNK (c-jun N-terminal kinase), kinase p38, intégrines, et BMK1 (big mitogen-activated protein kinase 1) qui sont sensibles aux contraintes de cisaillement. La phosphorylation des MAP-kinases aboutit à la régulation de l'activité de protéines cibles dans le cytoplasme et de facteurs de transcription dans le noyau. La stimulation de la cascade des MAP- kinases par la contrainte de cisaillement peut également dépendre de l'activation de la protéine Gα ou Gβ/γ et de la phosphorylation mécano-sensible des récepteurs de type tyrosine kinase. L'activation de Ras par les radicaux libres, qui précède en principe l'activation de la cascade de ERK1/2, a aussi été démontrée.

De plus, la phosphorylation et l'activation du récepteur PDGFα sont également observées sur des cellules musculaires lisses soumises à un étirement ou aux forces de cisaillement. Le shear stress induit des déformations de la surface cellulaire modifiant la conformation du récepteur PDGFα. Il est important de souligner que les canaux calciques

sensibles au gadolinium peuvent aussi phosphoryler le récepteur EGF en réponse à une stimulation mécanique. Toutefois, la synthèse protéique est stimulée lorsque les récepteurs EGF sont activés (Li et Xu 2000 ; Tanabe *et al.* 2000 ; Adam *et al.* 2003). D'autres récepteurs semblent également répondre à des stimuli mécanique tel que les récepteurs muscariniques IK_{Ach} (Pleumsamram et Kim 1995), les récepteurs adrénergiques qui réduit la production d'AMPc intracellulaire (Hilal-Dandan et Brunton 1995) et les récepteurs aux sulphonylurés associées aux canaux IK_{ATP} (Yokoshiki *et al.* 1999).

La cascade des MAP-kinases (mitogen activated protein kinases) comporte plusieurs voies distinctes : ERK 1/2 (extracellular signal-regulated protein kinases 1/2), JNK (c-jun N-terminal kinase), kinase p38, et BMK1 (big mitogen-activated protein kinase 1). Toutes ces voies sont sensibles aux stimulations mécaniques souvent, *in vivo*, liées aux contraintes de cisaillement. Cependant, l'activation de l'une pou l'autre de ces voies déclenche et aboutit à des réponses cellulaires différentes (Lethoux *et al.* 1998). La phosphorylation des MAP-kinases aboutit à la régulation de l'activité de protéines cibles dans le cytoplasme et de facteurs de transcription dans le noyau. L'activation des MAP-kinases par les contraintes mécaniques se fait via les intégrines (Li *et al.* 1997, Barberis *et al.* 2000), l'activation de la protéine Gα ou Gβ/γ (Jo *et al.* 1997) ou de la phosphorylation mécano-dépendant des récepteurs tyrosine kinase (Chen *et al.* 1999 ; Jo *et al.* 1997 ; Abe *et al.* 2000) figure 15.

Nous pouvons souligner que la voie des MAP-Kinases peuvent être activer via les intégrines par les ultrasons ce qui va modifier le fonctionnement cellulaire et engendrer par exemple des phénomènes tels que la phagocytose (Zhou *et al.* 2008) comme le montre la figure 16.

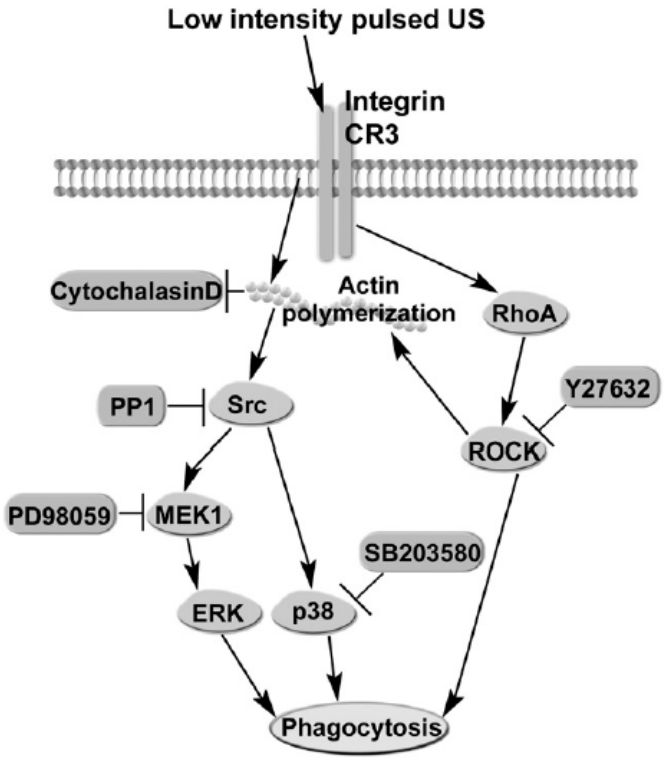


Figure 16 : Cascade des MAP-kinases déclenchée par les ultrasons et conduisant à la phagocytose par les macrophages. Des ultrasons de faibles intensité peuvent déclencher une cascade de réaction via les intégrines CR3 induisant des phénomènes de polymérisation of de l'actine et d'activation de la tyrosine kinase Src suivie par celle de la MAP-Kinase ERK et p38. Il est à souligner qu'une perte de l'intégrité du cytosquelette par, par exemple la cytochalasine D, inhibe les effets des ultrasons et annule l'activation de Src, ERK, p38 et donc, conséquent de la phagocytose. En parallèle, l'activation des GTPases RhoA et de ROCK semble accélérer la phagocytose et aider à la polymérisation de l'actine induite par les ultrasons (Zhou *et al.* 2008).

- ***FAK (focal adhesion kinase)***

Les intégrines relient la matrice extracellulaire aux sites d'adhérence focale qui peuvent moduler et transmettre la tension mécanique dans la cellule via le cytosquelette (Sun *et al*. 2008). La stimulation mécanique des cellules vasculaires, par exemple, engendre une phosphorylation des tyrosines kinases cytoplasmiques FAK (Ishida *et al.* 1996 ; Turner 2000 ; Browe *et al.* 2003 ; Parsons 2003) et de la protéine Src, une tyrosine kinase associée à la membrane (Silacci *et al.* 2001) (figure 17). Ces phosphorylations vont favoriser l'association de FAK et de Grb2 et stimuler RhoA via les petites protéines G (Carbajal *et al.* 1999 ; Li et al. 1999).

3.3. Les protéines G

Supprimé : 2.

Sur les cellules endothéliales, il a été démontré que les protéines Gα sont directement activées par le stress mécanique (Gudi et al. 1996). Par exemple, la régulation mécano-dépendante de l'expression du gène de PDGF (platelet-derived growth factor) ou du proto-oncogène C-fos est régulée par une mécanisme PKC dépendant lié à l'activité des protéines G et de la phospholipase C et de la présence de calcium (Hsieh *et al. 1993 ;* Hansen *et al.* 1993). La sous-unité γ de la protéine G hétéro-trimérique est présente au niveau des sites d'adhérence focale riches en intégrines et adjacents aux fibres d'actine-F ou « stress fibers » (Hansen *et al.* 1993). La co-localisation des protéines G et des intégrines permet à un même signal d'activer simultanément deux familles de récepteurs trans-membranaires (les récepteurs couplés aux protéines G et les intégrines). Par conséquent, les protéines G pourraient être directement et indirectement, via les intégrines, activées par les stimulations mécaniques (Hilal-Dandan et Brunton 1995). Il est important de souligner que les protéines Gs sont étroitement liées aux microtubules (Rasenick *et al.* 1981 ; Layden *et al.* 2008) et aux micro-filaments (Ueda *et al.* 1997). Il existe également une famille de récepteur potassique couplé à une protéine G les GIRK (Yoho Sy *et al.* 2008 ; Beckmann 2008 ; Doupnik 2008).

3.4. Les facteurs modulés par les contraintes mécaniques

Supprimé : 2

- ***Les nucléotides cycliques et les cyclases***

L'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) est le produit de la transforamtion de l'ATP par une enzyme nommée adénylate cyclase (ou adényl cyclase), qui réside dans les membranes cellulaire. L'adénylate cyclase est généralement activée ou réprimée en réponse à l'activation par un ligand (hormone ou neurotransmetteur) d'un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé à une protéine G. Si la protéine G possède une sous-unités *αs* (simulatrice), l'adénylate cyclase est activée, si la protéine G possède une sous-unité *αi* (inhibitrice), elle est réprimée. L'AMPc est un second messager qui joue un rôle important dans la signalisation cellulaire. L'AMPc interagit avec les PKA (Protéine kinase A), les EPAC (Exchange Protein directly Activated by cAMP), les canaux ioniques (CNG : cyclic nucleotid gated channel) ou encore les récepteurs à la ryanodine. De nombreuses études ont montré que, sur les cellules endothéliales, l'étirement peut provoquer une augmentation de la production d'AMPc et de GMPc médié par l'activité des protéines G ou des kinases (Singh *et al.* 1982 ; Watson *et al.* 1989; Kentish *et al.* 1992). L'AMPc est impliqué dans de nombreuses

voie de régulation ayant, en fonction du type cellulaire et de la voie de signalisation activée, dans des conséquences multiples (figure 17).

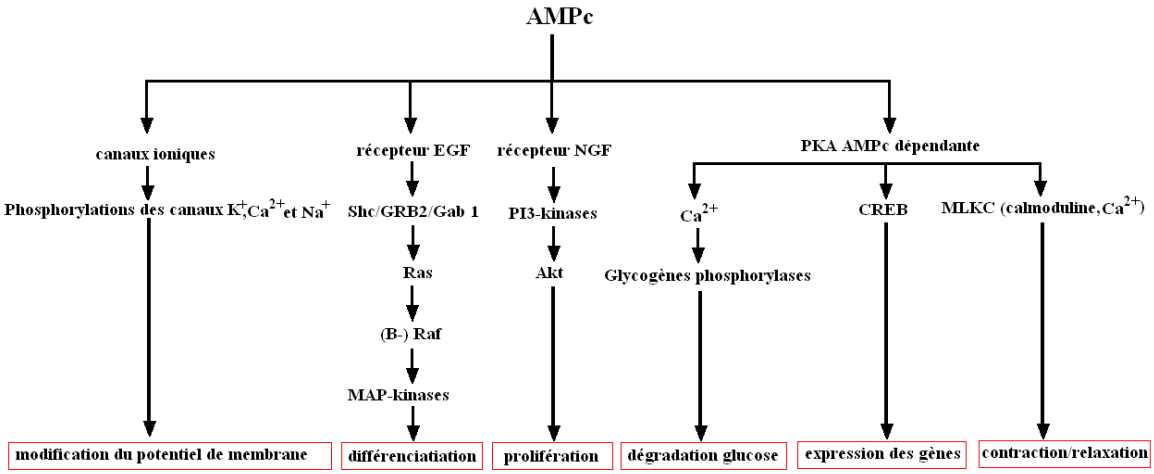


Figure 17 : Rôle de l'AMPc. L'AMPc est capable d'activer un certain nombre de protéine déclenchant ainsi des cascades de réactions. En fonction du type cellulaire et de la voie de signalisation impliquée, les conséquences sont extrêmement différentes. En effet, en modulant l'activité des canaux ioniques, l'AMPc modifient le potentiel de membrane notamment en modifiant la perméabilité membranaire des ions K^+, Ca^{2+} et Na^+. En activant les récepteurs à l'EGF (epithélial growth factor) ou NGF (nerve growth factor), les cellules concernées peuvent se différencier ou proliférer. Sur les cellules hépatiques, la dégradation du glucose est augmentée via les PKA. PKA peuvent aussi entraîner la contraction des cellules cardiaques. Nous pouvons souligner que plusieurs voies peuvent s'activer simultanément.

- ***Le monoxyde d'azote***

Un des événements précoces qui survient lorsque les cellules endothéliales sont exposées à un flux laminaire est l'activation de la NO synthase (eNOS) et la libération de monoxyde d'azote NO (Comerford *et al.* 2008). L'activation de eNOS par un stress mécanique ne requiert pas l'influx de Ca^{2+} dans la cellule, comme dans le cas d'une activation par des agonistes vaso-actifs, mais plutôt une phosphorylation par la protéine kinase Akt (Dimmeler *et al.* 1999), elle-même phosphorylée par la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) (Dimmeler *et al.* 1998). L'activation de eNOS mécano-induite est régulée par l'activité des canaux potassiques (notamment IK_{ATP}), des GMPc et AMPc, des phosphosdiestérases (PDI) et nécessite l'intégrité du cytosquelette (Govers *et al*. 2001 ; Lo *et al.* 2005).

Outre son rôle de vasodilatateur, le NO intervient dans la régulation du remodelage vasculaire. En effet, l'inhibition de cette voie atténue la vasodilatation et restreint le phénomène d'adaptation du vaisseaux sanguins à l'augmentation du flux (Tronc *et al.*1996). Cependant, l'activation de Akt et la production de NO favorisent la survie des cellules

vasculaires en s inhibant les voies pro-apoptotiques (Mallat *et al.* 2000 ; Liao *et al.* 2006) (figure 18).

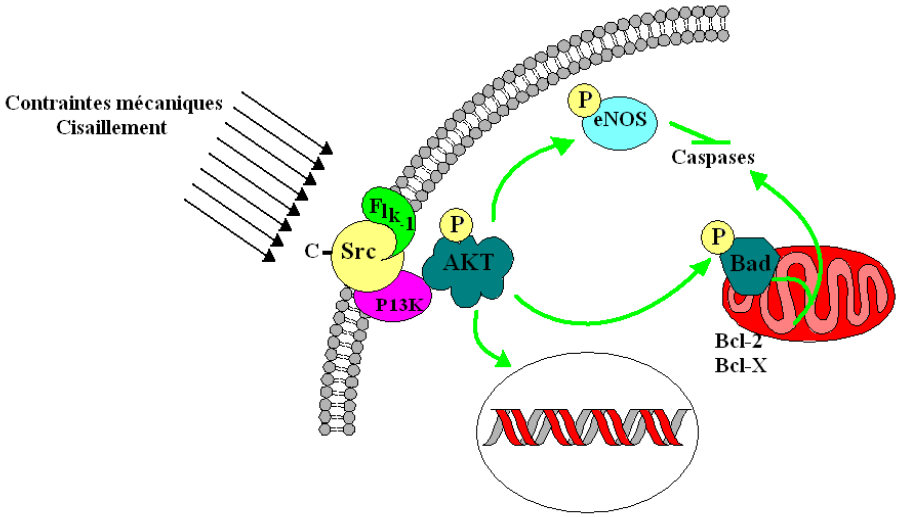


Figure 18 : L'activation de la protéine kinase Akt protège la cellule endothéliale de l'apoptose en inhibant la voie des caspases, soit en activant la synthèse de NO par l'intermédiaire de la NO synthase (eNOS), soit en phosphorylant Bad (*Bcl-2-antago-nist of cell death*), empêchant sa liaison avec Bcl-2 (*B-cell CLL/lymphoma 2*) ou Bcl-XL (*Bcl-2-like 1*) à la membrane des mitochondries. L'activation d'Akt peut également activer l'expression de gènes favorisant la survie cellulaire. Flk-1 : récepteur à activité tyrosine kinase Flk-1 ; c-Src : kinases c-Src ; PI3K : phosphatidylinositol-3-kinase.

- ***Le calcium***

De nombreux articles montrent que le « shear stress » pouvait induire une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium (Belmonte *et al.* 2008). Cette augmentation est liée à l'activité des intégrine (Schaff *et al.* 2008), aux perturbations du cytosquelette (Zhang e*t al.* In press) ou par l'activation des canaux calciques sensibles au stress mécanique. L'augmentation de calcium intracellulaire va s'amplifier par lui-même en en activant les canaux ioniques calciques sensibles aux calciums ou en stimulant la libération par le réticulum endoplasmique du stock de calcium intracellualire : c'est le phénomène de « calcium induced calcium release » ou CICR (Jaffe 2007).

Matériels et Méthodes

Les effets des ACU activés par les ultrasons ont fait de nombreuses études. Cependant, très peu de travaux se sont consacrés aux mécanismes activés au contact des microbulles sous l'effet des ultrasons. Par conséquent, au début de la thèse, il n'y a pas de techniques ni de protocoles d'étude décrits dans les publications qui permettent de mettre en évidence en temps réel les modifications induites par les ACU sur des cellules en culture.

Afin de répondre à nos différentes questions (figure 19), nous avons donc adapté et développé un certain nombre de techniques existantes (figure 19) que nous développerons au cours des paragraphes suivants.

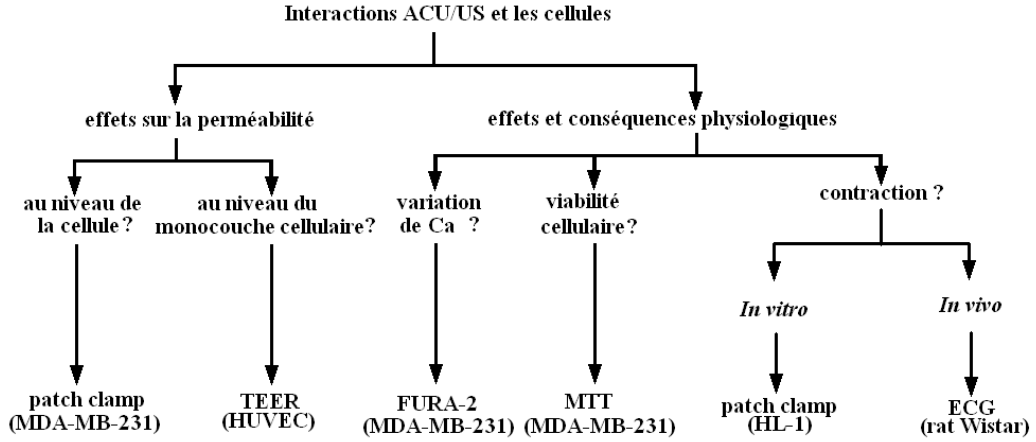


Figure 19 : Techniques utilisées au cours des différents travaux. L'une des premières problématiques est de savoir comment quantifier et observer les variations de la perméabilité membranaire induites par les microbulles et les ultrasons. Afin d'apporter une solution à ce problème, nous avons adapté la technique de patch clamp pour étudier les échanges trans-membranaires à l'échelle cellulaire et la TEER pour les modifications d'une monocouche cellulaire. Nous avons également utilisé le MTT pour évaluer la viabilité cellulaire et une technique d'imagerie par fluorescence utilisant le Fura-2 pour quantifier les variations de calcium intracellulaire. Pour déterminer les conséquences d'une stimulation par les ACU et les US sur le cœur, nous avons réalisé des ECG.

IV. Le Matériel Biologique

1. Etude In Vitro

1.1. Les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231

Il existe un certain nombre de lignées cellulaires issues du cancer mammaire parmi lesquels nous pouvons trouver les MDA-MB-231 (figure 20). Cette lignée cellulaire issue d'un épanchement pleural est une lignée de référence dans les études des cancers du sein (Cailleau *et al.* 1978) car elles sont connues pour être sont des cellules très invasive ayant un fort pouvoir métastatique (Thompson et al. 1992). Ces cellules sont également capables de se différencier et de former des colonies ce qui témoignent de leur fort pouvoir tumorogène (Zhang *et al.* 1991). Les études *in vivo* soulignent que les cellules MDA-MB-231 forment des grosses tumeurs mammaires et produisent des métastases chez les souris « nudes » immunodéprimées ayant subit une injection de cellules dans la veine caudale (Mukhopadhyay *et al.* 1999).

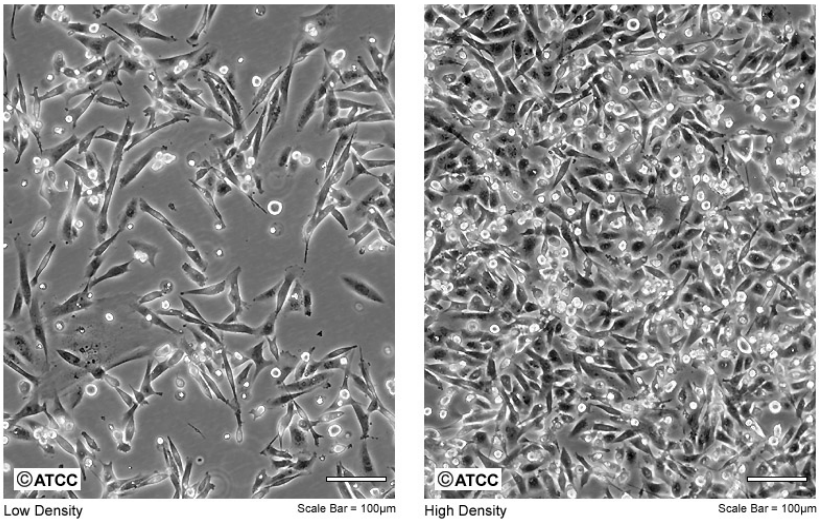


Figure 20 : Cellules MDA-MD-231 (http://www.lgcpromochem-atcc.com)

Les cellules MDA-MB-231 sont cultivées dans du milieu DMEM supplémenté avec 5% de SVF (sans antibiotique). Elles sont placées dans un incubateur dont l'atmosphère est saturée en H_2O, contient 5% de C02 et la température de 37°c. Le temps de doublement théorique de ces cellules est de 23 heures (Zhang *et al.* 1991).

Après un certain nombre de passages (>52 passages), le phénomène de dérive cellulaire peut apparaître ce qui se traduit par une modification du caryotype des cellules (Satya-Prakash *et al.* 1981). Afin de limiter ce phénomène et d'homogénéiser les résultats, les cellules utilisées pour l'ensemble des expériences sont à des passages entre 5 et 20 et elles sont considérées comme identiques.

1.2. Les cellules cardiaques : lignée cellulaire HL-1

La lignée cellulaire HL-1 est une lignée de cellules musculaires cardiaques développées par l'équipe du Pr. William. Cette lignée dérive des cellules AT-1 qui sont des cardiomyocytes de souris issus d'une tumeur auriculaire. Les cellules HL-1 ont conservé les propriétés contractiles, électrophysiologiques, morphologiques et biochimiques des cellules cardiaques auriculaires (Claycomb *et al.* 1998). Pour l'étude *in vitro* des troubles du rythme cardiaque, ces cellules sont donc très indiquées car elles génèrent des potentiels d'action spontanés (automatisme) et constituent l'une des rares lignées de cellules cardiaques.

Les cellules sont cultivées dans des boites de culture préalablement « coatées » avec du collagène supplémenté en fibronectine (Claycomb *et al.* 1998). Le milieu de culture est préparé à partir du milieu Claycomb auquel est additionné 1% de glutamine, 10% de SVF, 1% de vitamine C et 1% de noradrénaline. Les cellules sont incubées dans une atmosphère saturée en H_2O, avec 5% de CO_2 et à 37°C.

2. Etude In Vivo sur le rat Wistar

Les rats Wistar (figure 21) sont des animaux issus d'une lignée de rats albinos créée au Wistar Institute vers 1906 pour servir de modèle pour la recherche biologique et médicale. Ils sont caractérisés par de larges et longues oreilles et par une longueur de queue plus grande que celle du corps. Les rats Sprague-Dawley et les rats Longs-Evans égalements utilisés en laboratoire ont été développés à partir des rats Wistar.



Figure 21 : Rats Wistar (www.damninteresting.com/wp-content/labmouse.jpg).

Les rats Wistar achetés auprès de Charles-Rivers (Charles River, L'Asbresle, France) sont âgées de 40 jours et font entre 350 et 400g au moment de leur arrivée dans l'animalerie. Les rats sont conditionnés 3 par cage et entreposés dans une pièce où la température (22°C) et l'humidité ambiante sont constantes. La lumière est régulée de manière à obtenir des cycles alternés lumière/obscurité de 12h chacun. L'alimentation des rats est composée de granulés appropriés (Harlan Teklad TRM Rat/Mouse Diet, France). Les expériences ne débutent qu'une semaine après leur arrivé afin de leur permettre de s'acclimater à leur nouvel environnement.

V. Méthodes et protocoles

1. La culture cellulaire

La culture cellulaire est essentielle et déterminante pour la qualité des expériences *in vitro* notamment pour l'étude des cellules en patch clamp. Il existe 2 types de stockage des lignées cellulaires : à long terme et à court terme. A long terme, les cellules sont entreposées dans un congélateur à –80°c lorsque le stockage n'excède pas 6 mois avant utilisation. Au-delà, les cellules sont entreposées dans une cryothèque utilisant l'azote liquide. A cours terme, les cellules sont placées dans un incubateur (atmosphère saturée en H_2O, 5% de CO_2, 37°c) et prolifèrent naturellement. Le temps de maintien des cellules dans l'incubateur est déterminé par le nombre de passage qu'ait subit les cellules ne doit pas dépasser une amplitude de 20. Avant que les cellules arrivent à confluence, elles subissent une trypsination afin de pouvoir les ré-ensemencer pour une expérience ou juste pour entretient. La trypsination se fait en milieu stérile (sous hotte à flux laminaire) et se déroule en plusieurs étapes décrites dans figure 22.

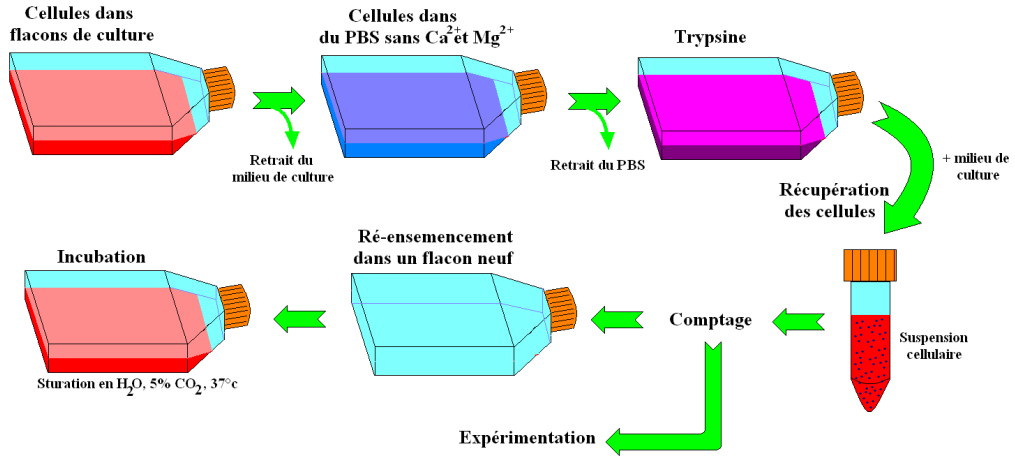


Figure 22 : les différentes étapes de la trypsination et du ré-ensemencements des cellules. La trypsination se fait sous hotte à flux laminaire et se déroule en plusieurs étapes. Le lavage consiste à éliminer le milieu de culture qui contient notamment des inhibiteurs de trypsine. Cette étape se fait en rinçant le tapis cellulaire à plusieurs reprises avec du PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+}. La trypsine est ajoutée ensuite afin de décoller les cellules. Après un temps suffisant, les cellules sont mises en suspension avec le milieu de culture adapté. Le comptage permet de déterminer la concentration cellulaire afin de pouvoir ré-ensemencer les cellules et/ou débuter les expériences.

2. Enregistrement des échanges ioniques : le "Patch Clamp"

2.1. Introduction

La technique du patch clamp permet de quantifier les effets d'une stimulation physique ou chimique sur les courants ioniques ou sur le potentiel de la membrane plasmique d'une cellule. En effet, cette technique permet de mesurer les courants ioniques en imposant un potentiel (configuration « voltage clamp ») ou d'observer les effets sur le voltage en injectant un courant, configuration « current clamp » (Neher et Sackmann 1976; Hamill *et al.* 1981).

Pour les besoins de l'expérience, la configuration de cellule entière en patch rompu (« whole cell ») sera utilisée en configuration « Voltage clamp » et « Current clamp ». L'approche technique se déroule comme décrite dans la figure 23.

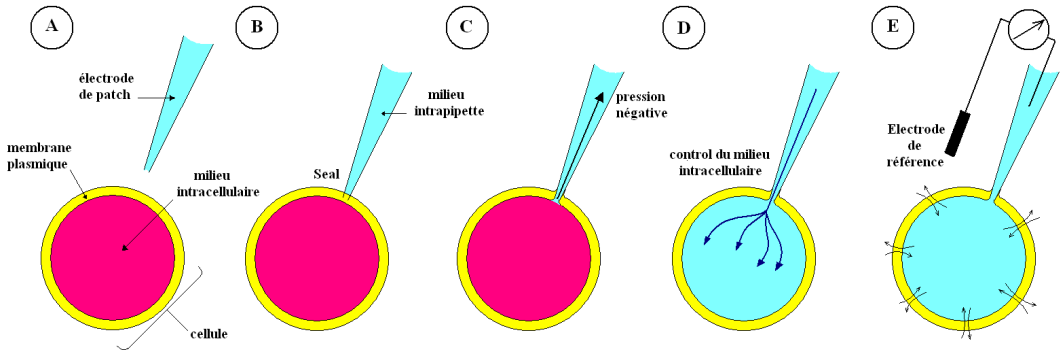


Figure 23 : La technique de patch clamp en configuration cellule entière et en patch rompu. La technique consiste à appliquer une micro-électrode en verre (A), contenant filament d'argent chloruré (AgCl) et un liquide conducteur mimant le contenu intracellulaire, contre la membrane cellulaire et de créer un scellement hermétique : le « seal » (B). Suite à une dépression induite dans la pipette, la membrane va se rompre sous la pointe de la pipette sans altérer le seal (C). Le milieu contenu dans la pipette va perfuser à l'intérieur de la cellule (D) et l'électrode d'AgCl située dans la pipette va pouvoir enregistrer l'activité globale de tous les échanges ioniques de la cellule (E). Dans cette situation, il est donc possible de mesurer le courant ou le potentiel de membrane de la cellule en configuration « current clamp » ou « voltage clamp ».

2.2. L'installation de « Patch clamp »

Le poste de patch clamp est représenté dans la figure 24.

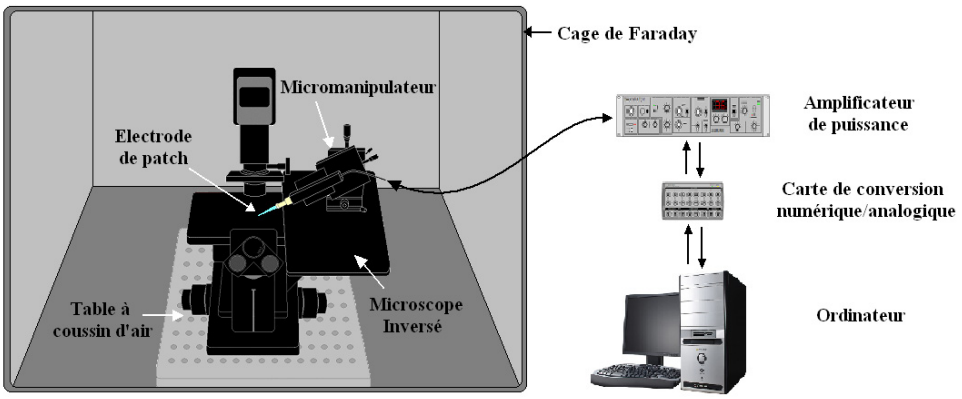


Figure 24 : Poste de « patch clamp». Le poste de « patch » est composé d'un microscope inversé (Nikon® Eclipse® TE2000, Japan) qui repose sur une table à coussin d'air afin d'éliminer les vibrations mécaniques externes (TMC®, USA). La pipette de patch est fixée sur un micromanipulateur piézo-électrique (Sutter Instrument®, USA). La pipette, via un adaptateur d'impédance est reliée à un amplificateur (Axopatch® 200-B, Axon Instrument®, USA) lui-même connecté à une carte de conversion analogique/numérique (courant-voltage) (Digidata® 1322A, Axon Instrument®, USA) qui permet la communication avec un ordinateur. Cet ordinateur permet non seulement d'enregistrer les résultats mais aussi de contrôler les potentiels ou les courants appliqués à la cellule.

2.3. Les conditions expérimentales

- ***Le matériel et les milieux utilisés***

Les pipettes de patch sont réalisées en verre à hématocrite (Vitrex, Polylabo, France) à l'aide d'une étireuse verticale (Sutter Instrument, USA) et sont remplies de « MIP » (milieu intra-pipette) dont la composition, mimant celle du milieu intracellulaire, est décrite dans la figure 25. La qualité des pipettes est vérifiée en mesurant leur résistance électrique dont la valeur doit être comprise entre 3,5 et 5 MΩ. Les cellules baignent dans une solution physiologique saline (PSS) dont la composition est également décrite dans la figure 25.

PSS (pH 7,4)	
Produits	mM
NaCl	140
KCl	4
$MgCl_2$	1
NaH_2PO_4	0,33
HEPES	10
Glucose	11,1
$CaCl_2$	0,002

MIP (pH 7,2)	
Produits	mM
K-Glutamate	125
$CaCl_2$	0,0039
$MgCl_2$	1
KCl	20
MgATP	1
EGTA	1
HEPES	10
NaCl	10

Figure 25 : composition du milieu intra-pipette (MIP) et de la solution physiologique saline (PSS). Le potentiel calcique (pCa) du MIP est de 6,4.

- ***Le potentiel de repos et le potentiel d'équilibre***

La répartition ionique de part et d'autre de la membrane plasmique est inégale. Il y a un gradient de concentration et de charges. Ce gradient électrochimique résulte de la perméabilité sélective aux différents ions de la membrane plasmique des cellules. Il y a une polarisation membranaire, appelée potentiel de membrane (Em) qui est stable dans le temps dans le cas où la cellule ne serait pas stimulée chimiquement, mécaniquement ou électriquement. Cependant, comme les ions sont des particules chargées, leur déplacement sera influencé par le gradient de concentration et par la différence de potentiel électrique qui existe de chaque côté de la membrane. Dès lors, pour chaque espèce ionique, la condition d'équilibre ne sera pas nécessairement obtenue par l'égalisation des concentrations comme pour les solutés électriquement neutres, mais lorsque la différence de concentration sera contrebalancée par la différence de potentiel, appelée potentiel d'équilibre. Ce potentiel d'équilibre est calculé grâce à l'équation de Nernst :

$$E_{(ion)} = \frac{RT}{zF} \ln \left(\frac{[ion]_{ext}}{[ion]_{\text{int}}} \right)$$

R : constante des gaz parfaits (8,314472 $J.mol^{-1}.K.^{-1}$)
T : température absolue (Kelvin)
z : Valence de l'ion
F : constante de Faraday ($9{,}65.10^4$ $C.mol^{-1}$)
$[ion]_{ext}$: concentration extracellulaire
$[ion]_{int}$: concentration intracellulaire

Dès lors, à cause du gradient électrochimique, la quantité d'ions qui entrent est égale à celle qui sorte de la cellule. Le potentiel de membrane est donné par l'équation du potentiel de Goldman-Hodgkin-Katz ou équation de GHK (dans l'exemple ci-dessous, on ne considère que les ions monovalents Na^+, K^+ et Cl^-) qui prend en compte la perméabilité des ions :

$$Em = \frac{R}{F} \ln \frac{P_K[K^+]_{ext}}{P_K[K^+]_{\text{int}} + P_{Na}[Na^+]_{\text{int}} + P_{Cl}[Cl^-]_{ext}}$$

R : constante des gaz parfaits (8,314472 $J.mol^{-1}.K.^{-1}$)
T : température absolue (Kelvin)
F : constante de Faraday ($9{,}65.10^4$ $C.mol^{-1}$)
Px : perméabilité de l'ion x
$[X]_{ext}$: concentration extracellulaire de l'ion X
$[X]_{int}$: concentration intracellulaire de l'ion X

Au travers de cette équation, lorsque les cellules sont placées dans du PSS, on comprend donc que toute augmentation de la perméabilité aux ions K^+ (P_K) entraînera un changement du potentiel de membrane vers le potentiel d'équilibre du K^+, E_K = -90 mV (soit une hyperpolarisation), et toute augmentation de la perméabilité des ions Na^+ (P_{Na}) entraînera un changement du potentiel de membrane vers le potentiel d'équilibre du Na^+, $E_{Na,}$ = +66 mV (soit une dépolarisation).

2.4. Protocoles expérimentaux

- ***Configuration « current clamp »***

La configuration « current clamp » permet de mesurer le potentiel membranaire en fonction du courant injecté. Dans notre étude, nous avons voulu déterminer les effets de microbulles sous stimulation ultrasonore ou non sur le potentiel membranaire d'une cellule au repos. Dans cet objectif, nos mesures de potentiel membranaire se font avec un courant imposé nul (I = 0).

- ***Configuration « voltage clamp »***

La configuration « voltage clamp » permet de mesurer les courants ioniques de la cellule en fonction du potentiel imposé. En effet, pour la majorité des canaux ioniques, leur activité est dépendante du voltage : les canaux ioniques vont être activés ou inactivés par le potentiel avec des sensibilités différentes. De plus, comme la cinétique des canaux est extrêmement variable, il est important d'adapter les protocoles en fonction du courant à étudier.

- *le courant sodique :*

Le courant sodique étudié est un courant très rapide car en effet, son pic est atteint environ 2 ms après le début de la stimulation (figure 26). Les créneaux de dépolarisation utilisés sont donc extrêmement courts : 30ms.

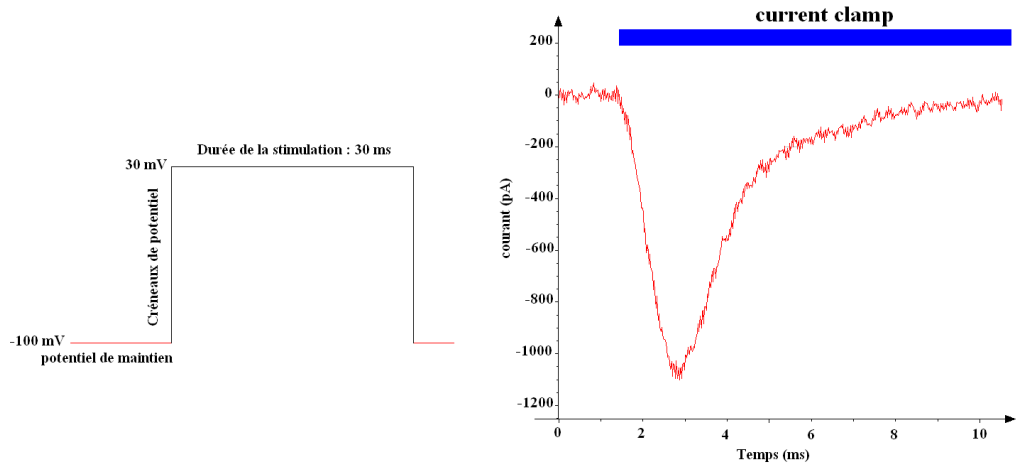
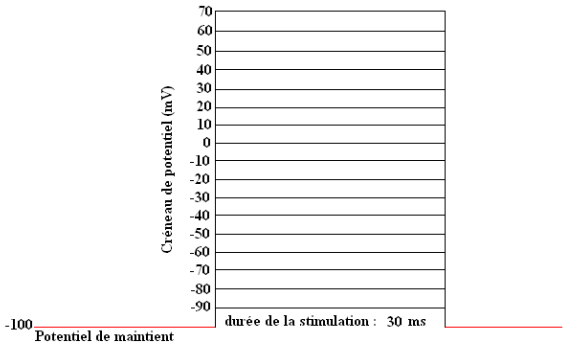


Figure 26 : Exemple d'un courant sodique. A droite, enregistrement d'un courant sodique obtenu sur une cellule HEK transfectée et exprimant transitoirement le canal sodique $Na_{v1.5}$ par imposition d'un potentiel de –5 mV durant 30 ms en partant d'un potentiel de maintien de –100mV.

Le courant sodique est courant également sensible au potentiel donc l'amplitude du courant varie en fonction du potentiel imposé (figure 26). Pour les besoins de son étude, une série de dépolarisations (17 dépolarisations de –90 à +70 mV par pas de 10 mV) est effectuée sous forme de créneaux d'une durée de 30 ms chacun. Cependant entre chaque stimulation, le potentiel est de –100 mV afin de potentialiser l'activité des canaux sodiques : c'est le phénomène de réactivation du canal sodique. A partir des données obtenues, il est possible d'établir une courbe courant (I) en fonction du potentiel (V) (appelée aussi courbe "courant-voltage" ou courbe "IV") qui permet de traduire l'activité maximale du canal en fonction du voltage (figure 27).



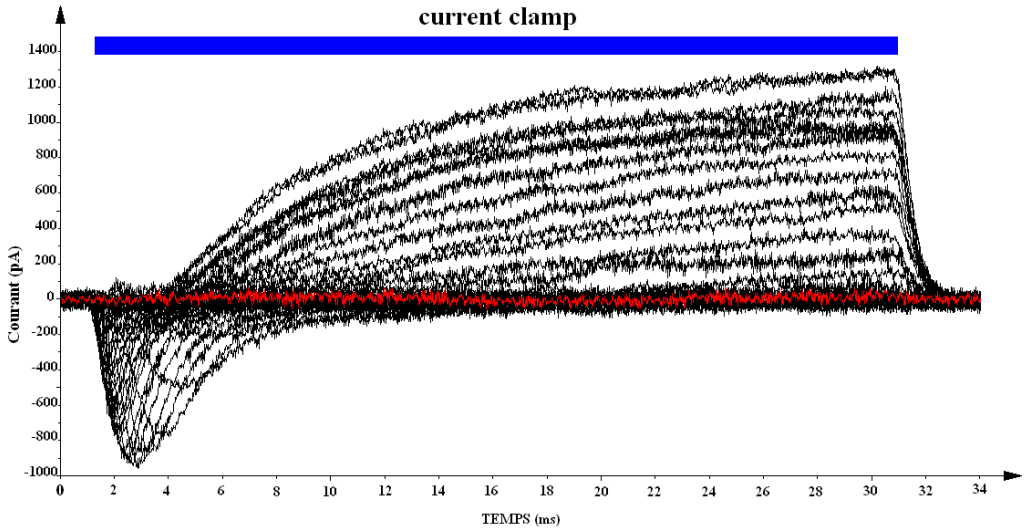
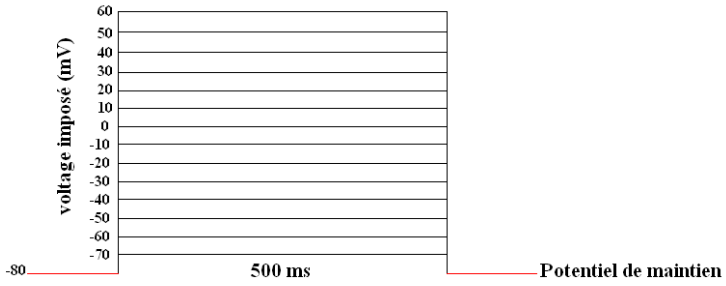


Figure 27 : Protocole d'étude du courant sodique. A droite, exemple d'enregistrements obtenues lorsque, à gauche, des créneaux de potentiel d'une durée de 30 ms sont imposés (de –90 à +70 mV par incrément de 10 mV).

- le courant potassique :

Certains courants potassiques peuvent mettre un certain temps avant d'atteindre leur maximum (300ms environ) : c'est le temps dit d'activation du canal. De plus, comme pour les canaux sodiques, les canaux potassiques sont également pour la majorité, sensible au potentiel. Cependant, d'autres canaux potassiques ont une cinétique d'activation quasiment instantanée et ils peuvent être activés par d'autres régulateurs que le potentiel comme le calcium intracellulaire. Pour étudier le canal potassique, des créneaux de potentiel, d'une durée de 500ms sont effectués (figure 28). Ces créneaux varient entre –70 à +60mV par pas de 10mV.



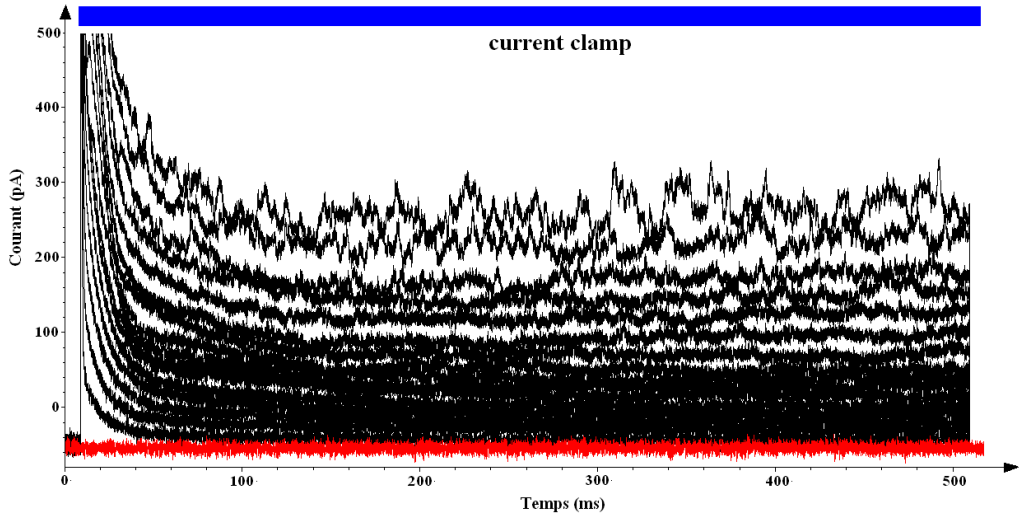


Figure 28 : Protocole utilisé en configuration « voltage clamp » pour l'étude des canaux potassiques. (A) Des créneaux de potentiels de –70 à +60 mV par incréments de 10 mV sont appliqués à la cellule afin de pouvoir étudier les courants potassiques. Ces créneaux ont une durée de 500 ms pour permettre l'ouverture de tous les canaux potassiques. Le deuxième graphe (graphe du bas) est un exemple d'enregistrement que l'on peut obtenir avec ce protocole appliqué aux cellules U87MG connu pour posséder de nombreux canaux potassiques à grande conductance sensibles au calcium.

2.5. les limites de la technique

Les cellules interrogées sont choisies par le manipulateur selon des règles arbitrairement établies, souvent en fonction de la forme et la taille de la cellule. Il en résulte donc une variabilité opérateur dépendant. En effet, en fonction de l'expérimentateur, certaines cellules vont être excluent alors que d'autres non. Cependant, nous ne pouvons affirmer, malgré une forte probabilité, qu'une cellule ronde soit apoptotique et qu'une cellule fusiforme soit viable.

3. Mesure des variations de la concentration intracellulaire en calcium

3.1. Introduction

Le calcium joue un rôle primordial dans de nombreuses fonctions cellulaires. En fonction de sa concentration ou de sa durée, les variations calciques peuvent entraîner des réponses cellulaires très différentes et modifier fondamentalement le fonctionnement de la cellule. Les premières études sur le calcium ont été réalisées sur les cellules cardiaques et ont permis de montrer que le calcium participe notamment au déclenchement et au maintien de la contraction cardiaque (Sydney Ringer 1883). Depuis, de très nombreuses études ont démontré la participation à tous les stades du fonctionnement cellulaire aussi bien comme effecteurs que

comme messagers pour la transduction du signal. La détermination de sa concentration est donc très importante pour comprendre la physiologie cellulaire.

Depuis 1925 de nombreuses techniques ont été mises au point pour visualiser les concentrations calciques dans les phénomènes physiologiques en utilisant un indicateur coloré, des isotopes radioactifs (iode de $^{45}Ca^{2+}$), des indicateurs luminescents et des sondes fluorescentes qui sont encore utilisées actuellement du fait de leur très forte sensibilité.

Le premier indicateur fluorescent, Quin-2, se compose d'un chélateur de Ca^{2+} (l'EGTA ou le BAPTA) associé à un fluorophore. La liaison du calcium avec la sonde provoque une variation de l'intensité de fluorescence émise par la sonde. Depuis le Quin-2, un certain nombre de molécules ont été développées toujours dans le but d'améliorer le rendement quantique (plus « lumineux ») et de diminuer la photosensibilité (diminution du phénomène de photo-blanchiment (« bleaching ») ou perte de l'intensité lumineuse). Cependant, la base est conservée car l'EGTA et le BAPTA sont toujours utilisés comme chélateur de calcium. Désormais, le Fura-2 et l'Indo-1 sont les 2 principales sondes utilisées en imagerie calcique. Pour ces 2 molécules, la liaison du calcium avec la sonde entraîne à la fois une variation de l'intensité de fluorescence et un déplacement du spectre d'excitation (Fura-2) ou du spectre d'émission (Indo-1).

3.2. Principes de l'imagerie calcique en utilisant le FURA-2 :

Comme mentionné précédemment, la liaison du calcium avec la sonde Fura-2 modifie à la fois l'intensité de fluorescence et le spectre d'excitation (figure 29). De ce fait, l'intensité de fluorescence est toujours mesurée à 515 nm mais les excitations se font à 340nm (F_{340}) et 380nm (F_{380}). A 340nm, nous considérons que seules les molécules de Fura-2 libres vont être excitées alors qu'à 380nm, ce sont celles qui sont complexées au calcium. Ainsi, une augmentation de la concentration en Ca^{2+} se traduit par une augmentation de l'intensité fluorescence à F_{340} et une diminution à F_{380}. Le rapport de fluorescences F_{340} / F_{380} est donc un reflet de la concentration intracellulaire en Ca^{2+}.

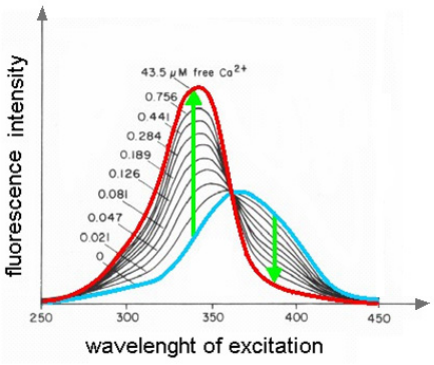


Figure 29 : Spectre d'excitation du FURA-2 en présence de différentes concentrations de Ca^{2+} (0-45 µM). La liaison du calcium avec la sonde entraîne à la fois une variation de l'intensité de fluorescence et un déplacement du spectre d'excitation. (www.bphys.uni-linz.ac.at/bioph/res/icg/fura.html).

Le FURA-2 est imperméable aux membranes cellulaires. Pour permettre son entrée dans la cellule, il est utilisée sous forme acéto-méthyl-ester (FURA2-AM). Ces groupements masquent les fonctions carboxyliques ce qui permet au FURA2-AM de rentrer. Dans la cellule, des estérases cytosoliques désestérifient le FURA2-AM qui ne peut donc plus sortir de la cellule et, surtout, qui redevient sensible au Ca^{2+} environnant.

3.3. Protocoles

Les cellules sont ensemencées à la densité souhaitée dans des boites de culture dédiée à la mesure de fluorescence avec un fond de verre. Elles sont ensuite placées dans l'incubateur à 5% de CO2 et à 37°c durant 24h avant l'expérimentation.

Avant le début de l'expérience, le milieu cellulaire est remplacé par le milieu du PBS contenant du FURA-2 (5 mM). Après 45min à température ambiante dans l'obscurité, une fois que les cellules « sont chargées » en FURA-2 et que la chélation du calcium par la sonde soit réalisé, le PBS est remplacé par une solution physiologique saline (PSS dont la composition est donnée dans la figure 25). La boîte de culture contenant les cellules est ensuite placée sur le plateau du microscope comme présenté sur la figure 30 afin de permettre le début de l'expérience. Le dispositif expérimental est décrit sur la figure 31.

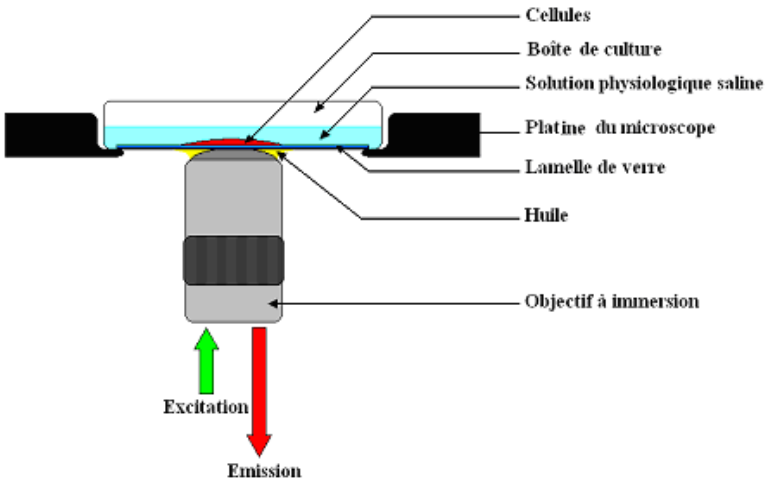


Figure 30 : Dispositif de mesure de la variation calcique par fluorescence. Le dispositif expérimental est composé d'un microscope inversé équipé d'un objectif à immersion (grossissement x60) dédié à la fluorescence UV. Cet objectif permet le passage des ondes lumineuses aussi bien dans le sens de l'excitation que de l'émission.

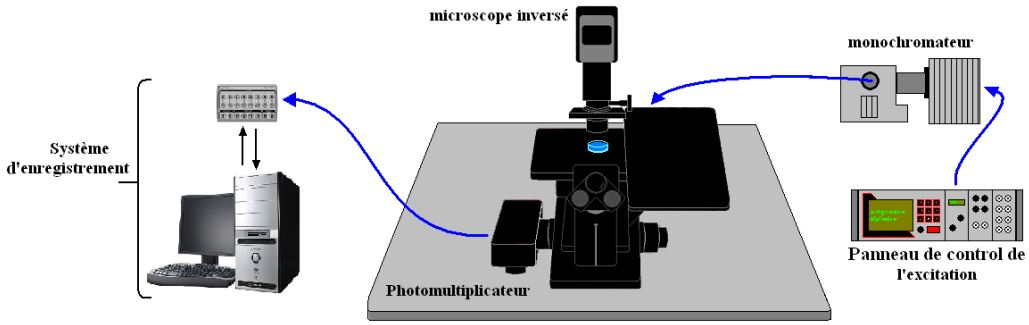


Figure 31 : Schéma du dispositif de mesure en fluorométrie. Le dispositif expérimental est composé d'un microscope inversé équipé d'un objectif à immersion (grossissement x60) dédié à la fluorescence. L'excitation se fait grâce à un monochromateur relié au microscope par une fibre optique. La fluorescence émise et provenant de la cellule et faisant suite à l'excitation photonique est recueillie par un photomultiplicateur via l'objectif.

4. Mesure de la viabilité cellulaire

4.1. Introduction

Le test MTT est un test colorimétrique qui permet de quantifier la viabilité d'une population cellulaire via le métabolisme mitochondriale (Mosman 1983). En effet, le test MTT est très utilisé pour évaluer la prolifération (et la survie cellulaire) et effectuer des tests de cytotoxicité des cellules eucaryotes.

Le MTT est un test quantitatif basé sur l'appréciation du fonctionnement mitochondrial : la succinate déshydrogénase mitochondriale (enzyme dépendante du $NADH^+$ appartenant à la chaîne respiratoire) va réduire les sels solubles de tétrazolium de couleur jaune (MTT : bromure de 3-(4-5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium) en cristaux de formazan. Ces cristaux sont solubles dans les solvants non aqueux (DMSO par exemple) et colorent le milieu en bleue. Ainsi, il existe une relation linéaire entre la densité optique, enregistrée au spectrophotomètre à 570nm, et l'activité cellulaire qui est proportionnelle au nombre de cellules vivantes, donc à la viabilité cellulaire.

4.2. Protocoles

Les cellules sont ensemencées dans des plaques de culture (plaques de culture de 6 puits) de manière à obtenir une confluence comprise entre 60 et 80% le jour de la mesure du test MTT.

Avant la mesure, le milieu de culture est remplacé par 130µL/cm² de solution à 0,5 mg/mL de MTT préparée dans un milieu de culture approprié aux cellules testées. Les plaques sont ensuite placées dans l'incubateur à 37°c (atmosphère saturée en eau, CO_2 à 5%) pour une durée variable en fonction des lignées (1h pour les MDA-MB-231, 45min pour les HL-1, 1h30 pour les U87MG,…). Après la période d'incubation, le surnageant est retiré puis remplacé par du DMSO (130µL/cm² soit 400µL/puits dans les plaques 6 puits) afin de solubiliser les cristaux de formazan. La solubilisation se fait à température ambiante à l'abri de la lumière sous une légère agitation pendant 10 minuntes.

Lorsque les cristaux sont dissous, la plaque est placée dans le spectrophotomètre. Il est parfois nécessaire de diluer la solution si elle est trop concentrée pour ne pas « saturer la mesure de la densité optique ». Cette dilution se fait avec du DMSO.

4.3. Les limites de la technique

Certains composés peuvent altérer le métabolisme mitochondrial modifiant ainsi la production de cristaux de formazan sans pour autant modifier la viabilité cellulaire qui pourrait conduire à une surestimation la cytotoxité. De même, certains produits peuvent augmenter le métabolisme et diminuer la viabilité et ces effets ne seront pas révélés par le test. Il est également difficile de comparer les lignées entre elles car l'activité mitochondriale diffère selon les lignées cellulaires.

5. Mesure de la résistance trans-épithéliale TEER

5.1. Introduction

En 1951, Ussing et Zerhan ont décrit une nouvelle technique permettant de distinguer le transport à travers l'épithélium cutané (Ussing et Erhan 1951). Cette technique, popularisée sous le nom de mesure de TEER ("trans epithelial electric resistance") permet la mesure des mouvements d'eau, d'électrolytes et de solutés variés, en l'absence de potentiel trans-membranaire, sous la forme d'un courant électrique: le courant de court-circuit.

Largement utilisée dans les domaines de la physiologie et de la pharmacologie intestinale, cette technique a permis, dans les années 90, l'étude des mono-couches cellulaires transformées issues du colon humain (Caco-2, HT-29) cultivées sur des membranes polycarbonates avec des pores de diamètres homogènes (0,4 ou 0,8 µm de diamètre). Le principe de cette technique repose essentiellement sur la loi d'Ohm (U = RI). La résistance résulte de la capacité de la mono-couche cellulaire à former une membrane plus ou moins perméable. L'utilisation d'un ohmmètre (Millicell ERS, Millipore, USA) permet la détermination de la résistance qui est proportionnelle à l'uniformité de la mono-couche. Cette résistance dépend donc du degré de confluence et du degré d'interaction entre les cellules.

5.2. Protocoles

Les cellules sont ensemencées dans les inserts à une densité de 100 000 cellules/inserts. Ces inserts sont ensuite placés dans un incubateur à 37°c (atmosphère saturée en eau, CO_2 à 5%). La mesure de la TEER est effectuée tous les 2 jours.

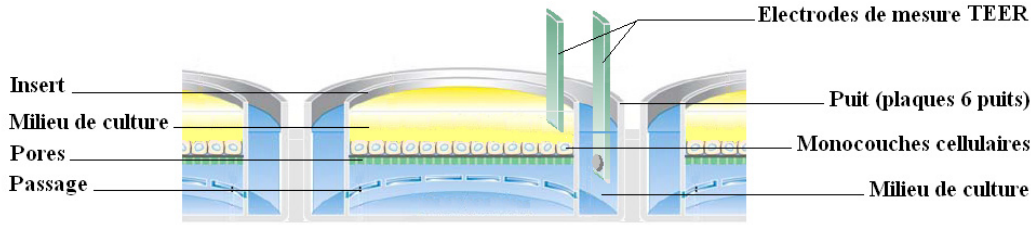


Figure 32 : Système de mesure de la TEER. Les cellules sont ensemencées dans les inserts à une densité de 10^5 cellules/inserts puis disposés dans un incubateur à 37°c (atmosphère saturée en eau, CO_2 à 5%). Pour la mesure, les électrodes de mesure, stérilisées avant chaque mesure, sont placées de part et d'autre de la paroi de l'insert. Le milieu contenu dans l'insert est séparé du milieu contenu dans le puits par une membrane polycarbonate criblée de pores. Ces pores permettent de fermer le circuit formé par les 2 électrodes. Ainsi, la résistance résulte de la conductivité du milieu (constant durant l'expérience), de la résistance de la membrane (constant également) et l'obstruction des pores par les cellules (variable en fonction du degré de confluence, de la perméabilité membranaire et des interactions intercellulaires).

Les électrodes de mesure sont stérilisées avant chaque mesure par immersion dans de l'éthanol 70% durant 1h. Avant la mesure, les cellules sont sorties de l'incubateur et placées sous la hotte à flux laminaire durant 20 min à température ambiante. Cette étape est nécessaire pour s'affranchir, en partie, de variabilité de résistances induites par des changements de la température et de pH. En effet, durant ce lapse de temps, la température du milieu qui était à 37°C est alors de 25 ± 1°C et le pH du milieu, dont le tampon est un tampon bicarbonate, va varier en fonction de la teneur en CO_2 de l'atmosphère.

Les électrodes de mesure sont placées de part et d'autre de la paroi de l'insert (figure 32). Pour chaque puits, 3 mesures sont effectuées puis moyennées car il existe une grande variabilité entre chaque mesure. Après chaque mesure, le milieu des cellules est changé avant de les remettre dans l'incubateur. Le traitement des cellules pour l'étude, débute lorsque les cellules ont atteint la confluence. Cette confluence est obtenue quand la résistance est au maximum (phase de plateau) depuis au moins 3 jours de mesure.

5.4. les limites de la technique

Au cours des différentes expériences, nous avons pu déterminer un certain nombre de contraintes liées à l'utilisation de cette technique. Dans un premier temps, nous nous sommes aperçus que la mesure de la TEER n'était pas applicable à tous les types cellulaires. En effet, les cellules possédant des inhibitions de contact ne pouvaient pas être utilisées puisqu'elles étaient incapables d'établir une monocouche cellulaire, par conséquent, une résistance suffisante. Ensuite, il existe une grande variabilité au niveau de la mesure proprement dite. La résistance varie en fonction de la quantité de milieu, de sa température et de son pH (lui-même dépendant de la teneur en CO_2 de l'atmosphère : 5% dans l'incubateur (pH 7.2) et environ 0% dans l'air (pH beaucoup plus alcalin). Il en résulte donc des écarts-types relativement importants qui varient de manière inversement proportionnelle à la valeur de la TEER.

6. Etude des troubles du rythme cardiaque

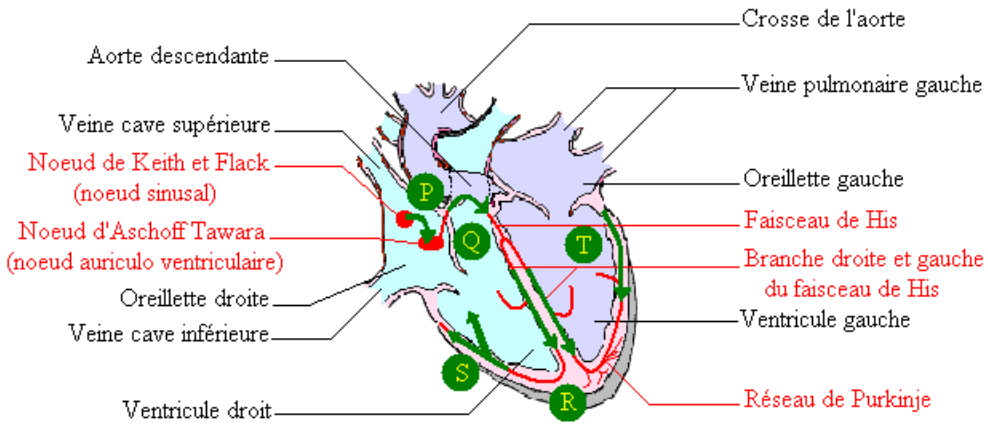
Supprimé : ¶

6.1. Introduction

Parmi les effets secondaires des agents de contraste, des arythmies (notamment extrasystoles ventriculaires = premature ventricular contraction = PVC) ont été rapportées dans des cas très isolés au cours d'un examen clinique utilisant l'échographiede contraste. L'étude des mécanismes qui ont induit à ces phénomènes semble intéressant puisqu'ils font

parties des très rares effets secondaires non liés à une allergie ou à l'injection des agents de contraste.

L'électrocardiogramme (ECG) permet le recueil de l'activité électrique du cœur et donc de mettre en évidence son activité. Pour cela, 2 électrodes sont placées à égale distance du cœur et enregistrent la dépolarisation dans l'axe auriculo-ventriculaire. En effet, sous l'effet d'une onde électrique, le tissus cardiaque se dépolarise rapidement, ce qui donne lieu à un courant électrique. La dépolarisation désigne les brusques mouvements ioniques trans-membranaire qui se transmettent de cellule à cellule et qui ont pour conséquence d'entraîner la contraction (figure 33). L'onde électrique naît dans l'oreillette droite, dans le noeud sinusal, et traverse ensuite les deux oreillettes puis les 2 ventricules. Au niveau du noeud auriculo-ventriculaire d'ASCHOFF-TAWARA, il existe un ralentissement de l'onde de dépolarisation qui permet aux ventricules d'être stimulés avec un certain retard par rapport aux oreillettes, ce qui favorise le remplissage ventriculaire. Grâce au réseau de Purkinje qui s'étend en toile d'araignée sous l'endocarde des deux ventricules, l'onde de dépolarisation se propage dans tout le myocarde qui se dépolarise de l'endocarde vers l'épicarde.



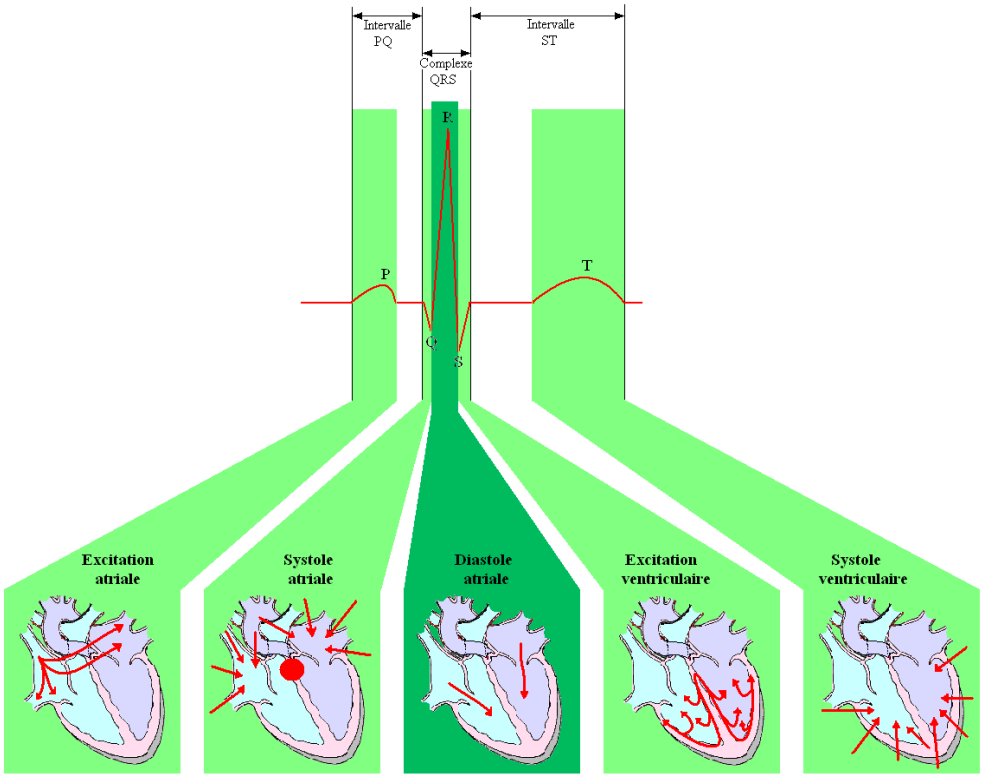


Figure 33 : Principe de l'électrocardiogramme (ECG). L'électrocardiogramme (ECG) est un enregistrement de l'activité électrique du cœur. En effet, sous l'effet d'une onde électrique, le tissu cardiaque se dépolarise rapidement, ce qui donne lieu à un courant électrique qui va induire la contraction d'un tissu musculaire donné : onde de dépolarisation auriculaire (P), dépolarisation ventriculaire (Q, R et S) onde de repolarisation du (T) (Opie 1998).

L'onde de dépolarisation auriculaire porte la dénomination P (majuscule). La dépolarisation ventriculaire s'inscrit selon des ondes appelées Q, R et S. Le myocarde doit, avant un nouveau cycle de dépolarisation/contraction, retrouver ses conditions antérieures au phénomène : c'est la repolarisation nommée onde T (figure 33).

L'activité contractile cardiaque est régulée essentiellement par les potentiels d'action (PA). Ces potentiels d'action sont des activités électriques du myocarde spécifique caractérisées par un ensemble de phases bien définies et identiques pour les cellules de la même région cardiaque. Le PA ne se déclenche que si la membrane cellulaire est suffisamment dépolarisée et atteint une valeur seuil de l'ordre de –60 mV (le potentiel membranaire au repos étant de –85 mV). La forme de PA dépend du tissu cardiaque interrogé,

ainsi, les caractéristiques du PA auriculaire sont très différents de ceux du ventricule (figure 33). Pour les études des extrasystoles et les PVC, il est important de se focaliser uniquement sur le potentiel d'action ventriculaire. Le PA auriculaire repose néanmoins sur les mêmes principes. Le PA du myocarde comprend 5 phases successives (figure 34) :

- Phase 0 : phase de dépolarisation rapide amenant le potentiel de membrane à la valeur seuil puis, si elle est suffisante, à la valeur de +40mV. Cette dépolarisation membranaire est régie par une entrée très rapide du sodium via les canaux sodique (courant I_{Na}).

- Phase 1 : une première courte phase de repolarisation précoce du potentiel de membrane résultant de l'ouverture des canaux I_{to}. L'activation de ces canaux induit une sortie d'ions potassiques. La présence de la phase 1 est facultative puisqu'elle dépend de l'espèce étudiée. En effet, cette phase est présente chez l'humain et le lapin alors qu'elle est absente chez le cochon d'inde.

- Phase 2 : phase de plateau prolongé durant laquelle le potentiel de membrane est proche de 0mV. Cette phase est caractérisée par l'activité simultanée des canaux calciques ($I_{Ca,L}$), canaux potassiques (I_{Kpl}, courant potassique de plateau) et l'échangeur sodium-calcium (I_{Na-Ca}).

- Phase 3 : la phase de repolarisation, qui ramène le potentiel de membrane vers le potentiel de repos (–85 mV) est induite par la sortie de potassium par le biais de plusieurs types de canaux potassiques : I_K, I_{K1}, I_{Ks}, I_{Kr}, $I_{K(ATP)}$, $I_{K(Ach)}$,….

- Phase 4 : le potentiel diastolique ou de repos est dû aux canaux I_{K1}. A la suite du PA, il existe une période réfractaire durant laquelle la cellule n'est pas excitable donc incapable de produire 2 PA consécutif.

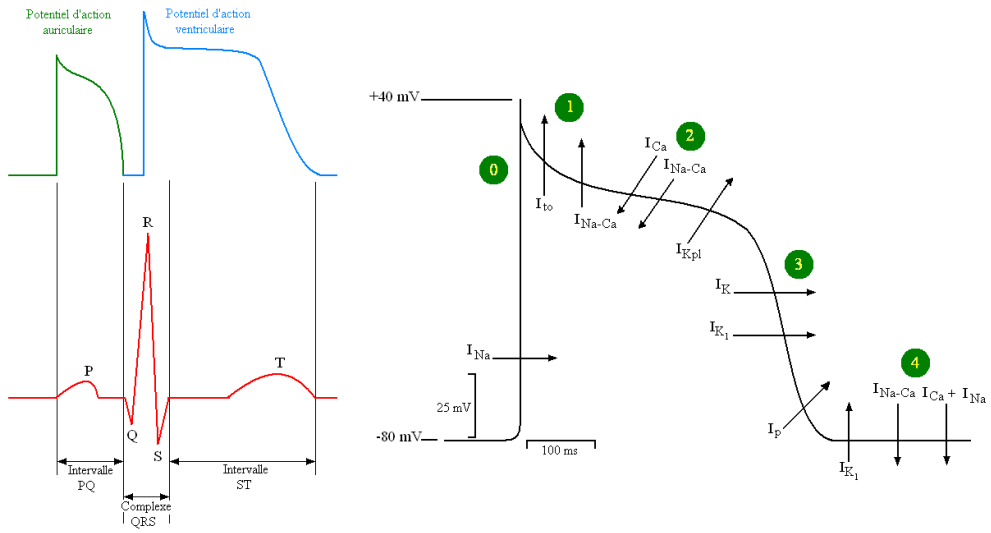


Figure 34 : ECG et potentiel d'action. (A) L'activité contractile cardiaque est régulée essentiellement par les potentiels d'action (PA) qui sont des variations d'une activité électrique du myocarde spécifiques à une région cardiaque (PA auriculaire, PA ventriculaire,..). L'amplitude du PA atteint la valeur de +40mV ce qui tend vers le potentiel d'équilibre de l'ion Na^+. Le PA ventriculaire est composé de 5 phases successives (B). Chacune des différentes phases du PA résulte de l'activité d'une population de canaux ioniques (Hauswirth et Singh 1978).

6.2. Protocole d'étude

- ***Anesthésie :***

L'ensemble des explorations fonctionnelles, aussi bien échographique que chirurgicale, se fera sous anesthésie générale de l'animal. La kétamine seule ne donne pas une myorelaxation et analgésie suffisante ; elle est donc, dans notre étude, utilisée en association avec la xylazine (22 à 50 mg/kg kétamine, 2,5 à 10 mg/kg xylazine). Cette association nécessite l'intubation de l'animal. Pour une exploration échographique sans chirurgie, l'anesthésie se fera par voie aérienne en utilisant de l'isoflurane 5% (Aerane®). Il est important de souligner que l'échographie est indolore et non invasive. L'anesthésie permet juste, dans ce cas, d'endormir l'animal afin de limiter les mouvements pour une meilleure exploration et répétitivité des résultats.

- ***Euthanasie :***

L'euthanasie se fait par injection intraveineuse ou intrapéritonéale de pentobarbital sodique (60 mg/ml) dont la dose est de 120 mg/kg. L'euthanasie se fait systématiquement après chaque intervention chirurgicale.

- ***Injection des agents de contraste :***

Après l'endormissement complet de l'animal, l'injection de l'agent de contraste est réalisée dans la veine caudale chez le rat (figure 35). L'agent de contraste (Sonovue®, Bracco®) est perfusé de manière lente et continue à l'aide d'un système de perfusion dont le débit est de 0,5 ml/min. Le volume total injecté ne doit cependant pas dépasser 10% du volume sanguin circulant de l'animal (environ 55 à 57 ml/kg) pour ne pas tuer l'animal.

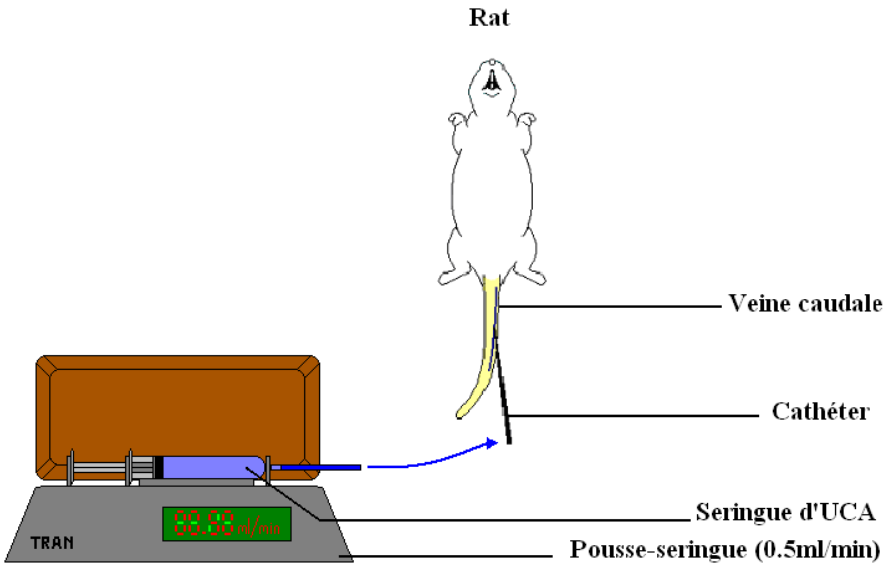


Figure 35 : Protocole de perfusion de l'agent de contraste. Après l'endormissement complet de l'animal, l'injection de l'agent de contraste est réalisée dans la veine caudale chez le rat. L'agent de contraste (Sonovue®, Bracco®) est perfusé par un système de perfusion (débit : 0,5 ml/min).

- ***Chirurgie :***

Suite à l'injection de xylazine et de kétamine, après endormissement complet de l'animal, une ouverture sera réalisée au niveau du cou de l'animal dégageant ainsi la trachée, la carotide gauche et la jugulaire gauche. Cette trachée permettra d'intuber l'animal afin d'éviter les problèmes respiratoires que peut entraîner l'anesthésie. Ensuite, la carotide gauche sera canulée. Le cathéter, rempli de sérum physiologique (NaCl 0,9%), sera poussé vers l'aorte, le cœur puis dans l'oreillette jusqu'aux valvules. Entre 2 contractions cardiaques,

lorsque les valvules s'ouvriront, le cathéter sera introduit dans le ventricule cardiaque (figure 36).

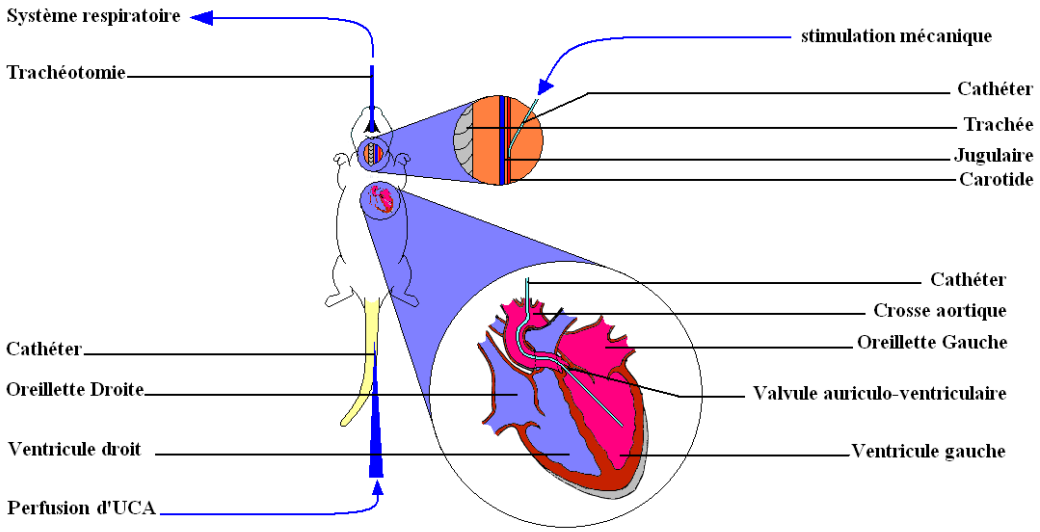


Figure 36 : Protocole de chirurgie sur le rat. Après endormissement complet de l'animal sous l'effet de l'anesthésie, une ouverture sera réalisée au niveau du cou de l'animal qui permettra de dégager la trachée, la jugulaire et la carotide. Une trachéotomie sera effectuée dans un premier temps afin de contrer les problèmes respiratoires liés à l'anesthésie. Le cathéter, rempli de sérum de physiologique (NaCl 0.9%), sera disposé dans la carotide gauche puis poussé vers l'aorte, le cœur et, enfin, dans l'oreillette jusqu'aux valvules. Entre 2 contractions cardiaques, lorsque les valvules s'ouvriront ce qui permettra au cathéter de pénétrer dans le ventricule cardiaque.

- ***Stimulation ultrasonore :***

Placé à la verticale du ventricule, une série de stimulations sera réalisée à l'aide d'un transducteur ultrasonore mono-élément de 1 MHz focalisé à 14 mm (40 cycles, 100 µs de répétition). La sonde ultrasonore est connectée à un amplificateur de puissance lui même relié à un générateur de fréquence (figure 37). Les stimulations auront une durée de 1 min chacune. La pression acoustique appliquée est comprise entre 100 et 500 kPa. Le transducteur est maintenu par un bras fixe afin d'annuler les mouvements liés au manipulateur.

L'ECG est réalisé à un système de mesure bipolaire (BioAmp® ECG recorder, ADintruments, Bella Vista, Australia). Les électrodes de mesure, au nombre de 2, sont placées selon un axe auriculo-ventriculaire. L'ECG est recueilli et analysé grâce à un logiciel dédié (BioAmp® CHART ®, ADintruments, Bella Vista, Australia) (figure 37).

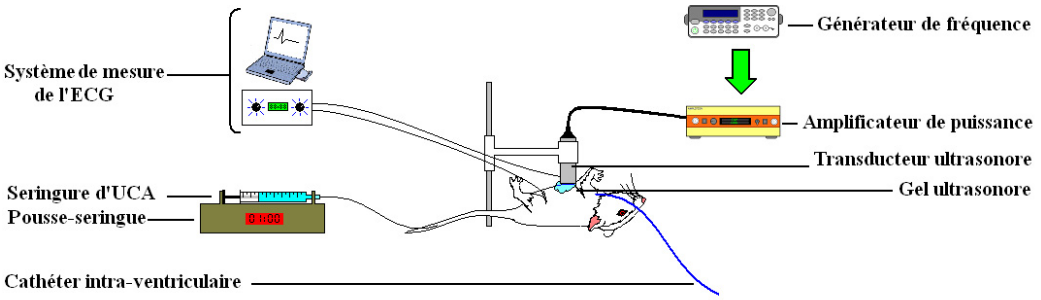


Figure 37 : Système de stimulation ultrasonore et mesure des effets sur le rythme cardiaque ou la pression intraventriculaire. Les stimulations sont réalisées à l'aide d'un transducteur ultrasonore mono-élément de 1 MHz focalisé à 14mm (40 cycles, 100 µs de répétition). La sonde ultrasonore est connectée à un amplificateur de puissance lui-même relié à un générateur de fréquence. Les stimulations auront une durée de 1 min chacune et une pression acoustique comprise entre 100 et 500 kPa. Le transducteur est maintenu par un bras fixe afin d'annuler les mouvements liés au manipulateur.

- ***Stimulation mécanique au niveau ventriculaire:***

Suite au protocole de chirurgie, le cathéter situé dans le ventricule de l'animal est poussé tout contre la paroi musculaire (figure 38). Les stimulations mécaniques sont réalisées en frottant l'extrémité de la canule sur les parois du ventricule. La stimulation cessera lorsque les PVC apparaîtront sur l'ECG.

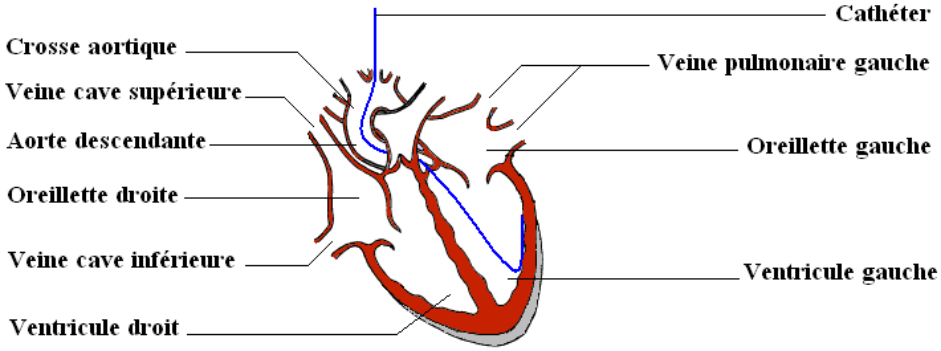


Figure 38 : Stimulation mécanique de la paroi ventriculaire. Suite au protocole de chirurgie, le cathéter situé dans le ventricule de l'animal est poussé tout contre la paroi musculaire. Les stimulations mécaniques sont réalisées en frottant l'extrémité de la canule sur les parois du ventricule. La stimulation cessera lorsque les PVC apparaîtront sur l'ECG.

6.3. les limites de la technique.

Les limites résident principalement au niveau du protocole expériemental utilisé pour les ultrasons. En effet, l'ECG et la chirurgie sont des techniques ayant faits leurs preuves. De plus, il est possible de valider leur qualité via de multiple méthode (présence des ondes PQRS,

mesure de la P° intravasculaire, P° intra-aortique, P° intra-auriculaire et P° intra-ventriculaire). Cependant pour le positionnement de la sonde ultrasonore, il est difficile de connaître avec précision le lieu exact où est située la tache focale sur la paroi ventriculaire. Bien que le cœur (son emplacement et sa disposition) soit facilement déterminé par échographie grâce à un échographe (ESAOTE®), la stimulation ultrasonore n'est pas complètement maitrisée. Même si nous sommes sûres d'être à la verticale du ventricule cardiaque, il est impossible déterminer avec précision les paramètres ultrasonores au niveau de la paroi ventriculaire, principalement à cause de la variabilité qui existe entre les rats (masse graisseuse, épaisseur de la paroi musculaire, taille du cœur,…). Ainsi, certaines questions ne peuvent pas trouver de réponse en utilisant cette technique : - Les effets varient-ils en fonction de la localisation de la tache focale ? de la taille de tache focale ?

- Effet de la pression accoustique sur l'apparition des PVC ? seuil d'appartion des PVC ? ….

Ces questions restent sans réponse à moins, peut être, de pouvoir introduire un hydrophone dans le ventricule cardiaque.

Résultats : « Interaction microbulles-cellules et ultrasons »

VI. Mise en place d'un système d'étude des effets de microbulles

1. Introduction

De nombreuses études ont montré que les microbulles, sous l'effet des ultrasons, entraînaient une augmentation de la perméabilité membranaire. Ces études reposaient essentiellement sur l'observation, *via* les techniques d'imagerie de l'apparition de pores ou l'incorporation de molécules fluorescente (Dextran) ou la quantification de la transfection par des plasmides codant pour des protéines fluorescentes (GFP : Green Fluorescent Protein).

L'augmentation de la perméabilité induite par les ultrasons et les microbulles est un phénomène transitoire et rapide. Il faut donc un dispositif capable de mesurer pratiquement en temps réels les flux trans-membranaires induits par les ultrasons et les microbulles.

Cependant, il existe un certain nombre de contraintes incontournables rendant le dispositif de patch clamp et d'ultrason difficilement compatibilité :

- la demi-vie des agents de contraste, notamment le Sonovue® utilisé dans ces expériences, est relativement courte (<10 min dans l'atmosphère de la pièce). Il est donc nécessaire de pouvoir introduire les microbulles au dernier moment, juste avant l'enregistrement lorsque la cellule a été rompue.

- alors que le dispositif de mesure électrophysiologique est extrêmement sensible aux bruits électriques, la sonde ultrasonore quant à elle en produit beaucoup.

- le transducteur ultrasonore est focalisé (la distance focale est de 14 mm) et doit être immergé dans un milieu liquide. Les boites de culture pour le patch clamp sont relativement petites et ne permettent qu'une hauteur de liquide maximale de 1cm. De plus afin de limiter au maximum les phénomènes de réfraction des ondes ultrasonores, le transducteur ne peut être placé à la perpendiculaire de la surface de la boîte. Le placement de sonde ne doit pas non plus gêner la luminosité du dispositif.

Le but de ce premier travail est donc de résoudre les problèmes subjacents aux 2 techniques afin de pouvoir réaliser les mesures de variations de la perméabilité cellulaire.

2. Mis en place des dispositifs expérimentaux

Afin de palier au problème de la demi-vie des microbulles de Sonovue®, nous avons disposé une tête de perfusion, reliée à une pompe péristaltique au niveau des cellules. Cette pompe permet d'acheminer activement les ACU contrairement à la plupart des systèmes de périfusion qui sont basés sur la gravité. Ainsi, une fois que le seal est réalisé et que la cellule

est rompue, les microbulles sont préparées puis perfusés avec un débit constant de 0,05 ml/min.

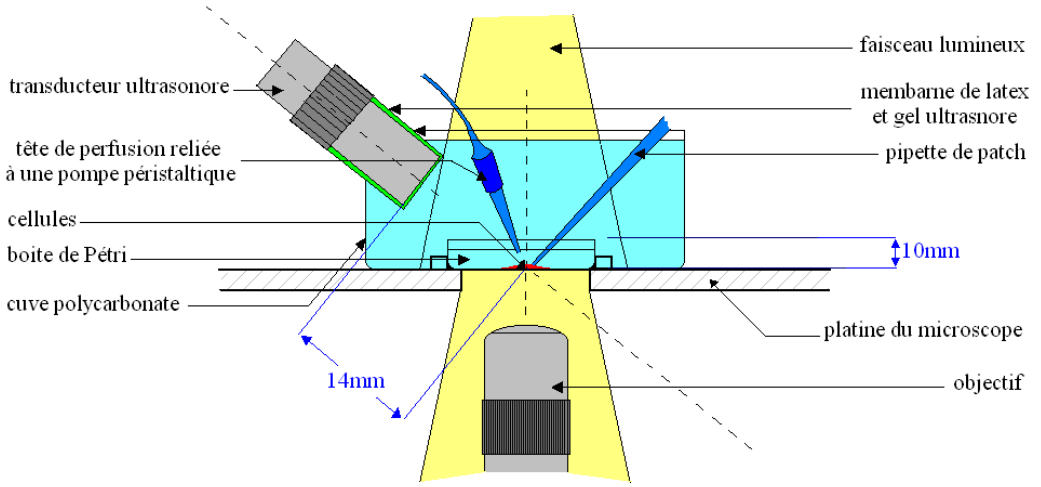


Figure 39 : Dispositif expérimental permettant d'étudier les effets des ultrasons et des microbulles par la technique du patch clamp.

Pour une stimulation efficace et optimale par les ultrasons, la boite contenant les cellules sont placées dans une cuve en polycarbonate qui sera par la suite remplie de PSS. Cette cuve permet, du fait de son volume, de respecter la distance focale du transducteur (Figure 39).

Les bruits électriques quant à eux, sont supprimés par la présence d'une membrane de latex qui entoure et isole électriquement le transducteur du compartiment liquidien. Cependant, pour ne pas éliminer non plus les ultrasons, nous avons mis du gel échographique à l'interface entre la sonde et la membrane optimisant ainsi la transmission ultrasonore. L'article ci-suit est une mise à l'épreuve du dispositif afin de démontrer la faisabilité.

3. Résumé de l'article

Le but de notre étude était d'étudier l'interaction ACU-cellules. Pour cela, nous avons utilisé la technique de patch clamp en configuration cellule entière et patch rompue. En mode current-clamp, nous avons mesuré les variations du potentiel de membrane d'une cellule MDA-MB-231 au contact d'une microbulle de SonoVue® oscillante. Les ultrasons ont été appliqués en utilisant un transducteur mono-élément de 1 MHz.

Nos résultats ont montré que, dans les conditions où nous observons habituellement la sonoporation (150 kPa), les oscillations induisent des hyperpolarisations répétables sur la cellule (n=6 cellules). Il est important de souligner que ces hyperpolarisations apparaissent et

disparaissent en fonction des US et que, dans les conditions expérimentales, la viabilité des cellules n'est pas affectée. L'amplitude des hyperpolarisations est fonction de l'amplitude des US. Des hyperpolarisations similaires peuvent être provoqué par une pression mécanique sur la membrane plasmique suggérant ainsi l'implication des canaux ioniques activés par le stress mécanique (SAC).

En conclusion, l'étude montre que les oscillations des ACU provoquent des modifications des propriétés électrophysiologiques de la cellule via les échanges ioniques trans-membranaires. Les mécanismes impliqués sont probablement liés à l'activation des SAC.

4. Article

EFFECT OF ULTRASOUND-ACTIVATED MICROBUBBLES ON THE CELL ELECTROPHYSIOLOGICAL PROPERTIES

T. A. TRAN[1-3], S. ROGER[2-3], J.Y. LE GUENNEC[2-3], F. TRANQUART[1-3] and A. BOUAKAZ[1-3]

1- INSERM U619, Tours, France

2- INSERM E0211, Tours, France

3- Université François Rabelais, Tours, France

3. Conclusion et perspectives

Ce travail a permis de mettre en place un dispositif capable de mettre en évidence la modification des échanges trans-membranaires en temps réel tout en respectant un cahier des charges bien précis. En plus de présenter les solutions techniques apportées à l'étude des effets des microbulles excitées sur des cellules interrogées en patch clamp, cet article met en évidence les effets des microbulles sous les effets des US. En effet, nous avons pu observer que les ACU activés par les ultrasons induisent un stress mécanique et entraînent l'apparition d'un courant électrique probablement via l'ouverture de canaux ioniques de type SAC.

Cette étude nous a surtout permis d'ouvrir de nombreuses perspectives d'étude :

- il existe un grand nombre de SAC, la première chose à faire est donc de caractériser les conductances activées par les oscillations des microbulles sur les cellules MDA-MB-231.

- ensuite, dans le but de développer la thérapie par les US et la ACU, il est important de déterminer le rôle des SAC dans les phénomènes d'augmentation de la perméabilité et de l'incorporation des molécules dans la cellule (Technique de TEER et de transfection).

- au delà de la thérapie, dans le cadre de l'utilisation des ACU et des US en clinique, l'activation des SAC peut elle générer ou expliquer l'apparition de certains effets secondaires (étude des arythmies et de PVC).

VII. Effets sur les propriétés électrophysiologiques des cellules

1. Introduction

Précédemment, nous avons pu observer que les oscillations des microbulles activées par les ultrasons génèrent des hyperpolarisations sur les cellules MDA-MB-231. Le travail fut donc de caractériser les canaux mis en jeu dans les mécanismes déclenchant l'hyperpolarisation.

2. résumé de l'article

L'objectif de ce travail est d'étudier ces mécanismes encore mal connus. Nous avons utilisé la technique de patch clamp rompu (configuration cellule-entière) en mode current clamp pour mesurer le potentiel de membrane évaluant ainsi les variations ioniques trans-membranaires. Nous avons également mesuré les variations intracellulaires de calcium grâce au FURA-2.

Nous avons observé que les microbulles sous l'effet des ultrasons (transducteur mono-élément de 1 MHz, 40 cycles répétés tous les 100 μs) induisent des hyperpolarisations répétables sur les cellules MDA-MB-231. Ces hyperpolarisations sont inhibées par l'IbTx et sont moduler par la qualité du contact, indispensable, entre la membrane cellulaire et la microbulle ainsi que l'amplitude de la pression acoustique. Ce résultat indique l'implication des canaux BK_{Ca} qui peuvent aussi être activés par le calcium. Des hyperpolarisations similaires, également inhibées par l'IbTx, peuvent être provoqué par une pression mécanique sur la membrane cellulaire soulignant bien les effets mécaniques de la microbulle. Il est important de souligner qu'en mesurant les variations de calcium intracellulaire, nous observons un décalage entre l'augmentation de calcium et l'hyperpolarisation indiquant que les BK_{Ca} sont directement par le stress mécanique et non par le calcium.

Ces résultats montrent que les oscillations des microbulles dans l'activation à ultrasons entraînent l'activation des canaux modulés par le stress mécanique modifiant par ainsi les échanges trans-membrainaire. Sur les MDA-MB 231, la réponse cellulaire aux stress mécaniques (induites manuellement ou par les oscillations des ACU) est caractérisée par l'activation des BK_{Ca} qui entraînent des hyperpolarisations et par l'augmentation retardée et progressive de la concentration intracellulaire de calcium.

3. Article

Characterization of cell membrane response to ultrasound activated microbubbles

T. A. TRAN[1-3], J.Y. LE GUENNEC[2-3], P. BOUGNOUX[2-3], F. TRANQUART[1-3] and A. BOUAKAZ[1-3]

1- INSERM U619, Tours, France

2- INSERM E0211, Tours, France

3- Université François Rabelais, Tours, France

4.. Conclusion et perspectives

Au cours de cette étude, nous avons confirmé le fait que les microbulles activées par les ultrasons génèrent un stress mécanique sur la membrane cellulaire. Sur les cellules MDA-MB-231, la réponse cellulaire est caractérisée par des hyperpolarisations consécutives à l'activation des canaux BK_{Ca} et par une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire.

Il est important de noter que les BK_{Ca} ne sont pas classés parmi les SAC mais ces expériences montrent que l'activité de ces canaux BK_{Ca} est modulée par le stress mécanique comme le démontre encore peu d'articles (Li *et al.* 2004 ; Qi *et al.* 2005). Cependant, il découle aussi de ce travail un grand nombre de question :

- bien qu'existant sur la grande majorité de cellules, les BK_{Ca} ne sont pas ubiquitaires. Il est donc fort probable que la réponse aux stress mécaniques dépend du type de cellules interrogées. Ainsi, nous pouvons regarder l'impact des stimulations et comparer les effets sur différentes lignées cellulaires. De même, l'activation des SAC peut avoir des effets très différents (les canaux sodiques vont plutôt dépolariser et les canaux potassiques, hyperpolariser). Il est donc important d'étudier les conséquences sur la cellule de l'activation de ce type de canaux afin de mieux comprendre les effets biologiques des ACU et des US.

- nous avons également mis en évidence l'augmentation de calcium intracellulaire. Cette augmentation e été également décrit par d'autres équipes (Van Wamel *et al.* 2006 ; Deng *et al.* 2004 ; Jufferman *et al.* 2006 ; Kumon *et al.* 2007) cependant aucune hypothèse sur le mécanisme a été proposée. En basant notre hypothèse sur un stress mécanique induit par les ACU, nous pouvons étudier les voies activées par l'étirement amenant à l'augmentation du calcium intracellulaire (canaux calciques activés par le stress, la voie des MAP-kinases,…).

- dans le cadre de la thérapie, nous pouvons nous demander si l'activation de tels canaux peut entraîner l'augmentation de la perméabilité cellulaire et surtout améliorer l'incorporation des molécules dans la cellule comme habituellement observée. Au-delà des effets sur la cellule, nous avons avancé l'hypothèse que l'hyperpolarisation membranaire, en modifiant les interactions électrostatiques, pouvait améliorer les liaisons et donc la stabiliser l'adhésion des molécules d'intérêt sur la membrane plasmique ce qui a pour effet d'améliorer leur incorporation cellulaire.

VIII. Effets des microbulles sur le fonctionnement du cœur

1. Introduction

Les précédents travaux ont pu mettre en évidence que les microbulles ultrasonorement activées induisent un stress mécanique sur les cellules activant par ainsi, des SAC. Parmi les effets secondaires connus des agents de contraste (voir annexe 1), les arythmies et particulièrement les contractions ventriculaires précoces (PVC : premature ventricular contraction) ont soulevé notre intérêt. En effet, beaucoup de travaux ont démontré l'implication des SAC dans la genèse d'une contraction des cellules contractiles. Il nous a donc semblé important d'étudier les mécanismes par lesquels les PVC apparaissent sous l'effet des ultrasons et des ACU. L'étude consiste a mettre en évidence, *in vivo* et *in vitro*, les liens qui existent entre les SAC, les ACU et les arythmies chez le lapin et le rat.

2. Résumé de l'article

L'échographie de contraste est une technique d'imagerie non invasive qui utilise des agents de contraste ultrasonore (ACU). Dans de très rares situations, sur de très rares patients, nous observons la présence de contraction ventriculaire prématuré (PVC). Récemment, nous avons pu démontrer via la technique de patch clamp, que les ACU sous l'effet des ultrasons (US) induisent un stress mécanique qui se solde par l'ouverture des canaux ioniques sensibles à l'étirement (SAC). Au niveau du cœur, ces canaux peuvent en s'activant entraîner des arythmies en provoquant des contractions des fibres musculaires. Notre étude a pour but de démontrer, *in vivo* et *in vitro*, la relation entre le stress mécanique induit par les ACU et les US et les PVC.

In vivo, sur 5 rats anesthésiés, nous avons effectué un électrocardiogramme (ECG) durant les stimulations ultrasonore (transducteur mono-élément de 1MHz, 40 cycles répétés toutes les 100µs, 300kPa) et durant la perfusion d'ACU au niveau de la veine caudal (SonoVue^{TM} à 0,5ml/min.). Les ECG révèlent des perturbations des ondes de polarisation cardiaque qui traduisent et illustrent les troubles de la conduction et des contractions au niveau ventriculaire. Des troubles similaires sont provoqués lorsque, après le protocole de chirurgie, une pression mécanique est appliquée sur la paroi ventriculaire. *In vitro*, avec la technique de patch clamp en configuration cellule entière et en mode current clamp, nous avons observé que les ACU sous l'effet des US entraîne des dépolarisations membranaires d'une cellule de la lignée cellulaire cardiaque HL-1. De plus, sur ces mêmes cellules, une

pression mécanique induite manuellement avec une baguette de verre, peut induire l'apparition de potentiel d'action (PA). Ces PA peuvent être à l'origine des contractions des cellules contractiles.

En conclusion, cette étude a démontre que les PVC observés lors de l'utilisation des US en présence d'ACU, résulte d'un stress mécanique provoqué très certainement par les oscillations des microbulles. Cette hypothèse est confirmée par des dépolarisations membranaires induites par les microbulles et à l'apparition de PA suite à un stress mécanique sur les cellules cardiaques HL-1.

3. Article

On the mechanisms of ultrasound contrast agents induced arrhythmias

T. A. TRAN[1-3], J.Y. LE GUENNEC[2-3], P. BOUGNOUX[2-3], F. TRANQUART[1-3] and A. BOUAKAZ[1-3]

1- UMR INSERM U930, Tours, France

2- INSERM U921, Tours, France

3- Université François Rabelais, Tours, France

On the mechanisms of ultrasound contrast agents-induced arrhythmias

T.A. Tran[1-3], J.Y. Le Guennec[2-3], D. Babuty[4], P. Bougnoux[2-3], F. Tranquart[1-3] and A. Bouakaz[1-3]

1. UMR Inserm U930 - CNRS FRE 2448, Tours France
2. Inserm, U921, Tours, F-37000 France
3. Université François Rabelais, Tours, France
4. Cardiology department, CHU Trousseau, Tours, France

Short title: mechanisms of ultrasound contrast agents-induced arrhythmias

Corresponding author:

Ayache Bouakaz, PhD

Inserm UMR Inserm U930, B1A, Hôpital Bretonneau
2 bd Tonnellé, 37044 Tours Cedex 9, France
Tel: +33 (2) 47479748
Fax: +33 (2) 47479767
Email: bouakaz@med.univ-tours.fr

Abstract

Although ultrasound contrast imaging has been established as a noninvasive technique, reports have shown that, among few patients, imaging contrast agents at high mechanical indices engenders premature ventricular contractions (PVCs). We have shown recently through electrophysiological studies that the oscillations of microbubbles next to a cell induce a mechanical pressure on its membrane resulting in a polarization and in the activation of stretch activated channels (SAC). These channels, described initially in the muscular cells, are ionic channels available in almost all cell types and might initiate disorders of the heart beat rate, triggering ventricular fibrillations. The aim of this study is to demonstrate, *in vivo* and *in vitro*, the relationship between PVCs and SAC opening.

Five anesthesized rats were used. PVC's were created *in vivo* with ultrasound and Sonovue microbubbles injected intravenously through the tail vein. PVC's were also created with a manually induced mechanical stimulus, which consisted of stimulations by a flexible catheter introduced into the rat aorta and pushed until the left ventricle. PVC's were quantified through ECG measurements. In-vitro experiments consisted of patch Clamp measurements in ruptured-whole cell configuration to monitor the modification of the electrical potential on HL-1 heart cell line. The stimulation was carried out either manually with a glass rod or with ultrasound and Sonovue microbubbles. For both in-vivo and vitro experiments, ultrasound consisted of 40-cycle waveforms at 1MHz and peak negative pressures up to 300 kPa.

In vivo, microbubbles and ultrasound at 300 kPa induced modification of rat's ECG while pressures below 300 kPa did not induce any PVC. Ultrasound alone did not modify the rat's ECG. Similar PVC's were also created when a mechanical stimulation with a catheter was applied. Regular heart beat rate was recovered immediately after the stimulation was stopped. *In vitro*, electrophysiological recordings showed that the mechanical stretch induced a cell membrane depolarization due to SAC opening. Similar effect was observed with US and microbubbles. The cell potential increased as a consequence of the stimulus and returned to its initial value when the stimulation was released. The membrane depolarization triggers additional action potential and by that the generation of premature contractions such as PVC's.

In conclusion, we presume that PVC's are generated through a cascade of events characterized by a mechanical action of oscillating microbubbles, opening of stretch activated ion channels, membrane depolarization and triggering of action potentials.

Key words: contrast agent, premature ventricular contraction, ultrasound, ionic channels.

Introduction:

Ultrasound contrast imaging is currently a well-established clinical imaging technique. Ultrasound contrast agents (UCA) consisting of tiny gas microbubbles have demonstrated clinical benefits in various clinical applications and mainly in echocardiography. In cardiology, they are clinically approved for left ventricular opacification and border delineation (Raichlen *et al.* 2001) and extensive trials have been carried out to demonstrate benefits of microbubbles in estimating myocardial perfusion. They are also widely used with Doppler ultrasound to improve flow-related measurements (Funamoto *et al.* 2008). Although ultrasound (US) imaging with microbubbles is now recognized as a noninvasive imaging technique with no serious side effects, disorders of the heart beat rate have been reported among few patients when contrast microbubbles are combined with insonification at high mechanical indices. These heart beat disorders appear as premature ventricular contractions (PVCs) (Van Der Wouw *et al.* 2000). These biological effects have been confirmed recently on a patient study (Okazaki 2004) where their occurrence as a function of acoustic power and contrast agent dose has been documented. In order to investigate further this biological effect, several research groups have carried out animal experiments and similar findings have been reported in rats and frogs (Dalecki *et al.,* 1991; Dalecki *et al*., 1993; McRobbie *et al.,* 1997, Zachari *et al.*, 2002). More recently, *in-vitro* studies have shown that contractions can be induced on ventricular cardiomyocytes with gas microbubbles under ultrasound stimulation (Kudo *et al*., 2004).

Although the interaction between ultrasound and microbubbles has been an active research field since decades, the interaction between ultrasound and cells in presence of microbubbles is still not fully understood but is currently the focus of many research groups, mainly for therapeutic applications.

We have shown recently through electrophysiological studies that microbubbles oscillating in the vicinity of a cell under the action of ultrasound pressure waves induce a mechanical pressure on the cell membrane resulting in the activation of stretch activated channels (SAC) (Tran *et al.*, 2007, Tran *et al.*, 2008). These channels, described initially in the muscular cells, are ionic channels which one finds in almost all cell types (Benham *et al.* 1986, Robitaille *et al.* 1993, Nelson *et al.* 1995, Marrion *et al.* 1998). Stretch activated channels are known to control the muscular contractions and thus play a major role on the heart rate and the contraction force (Hu and Sachs 1997; Kohl and Sachs 2001; Kuijper *et al.* 2007). Indeed, the activation of these channels, even locally, may involve disorders of the

heart beat rate inducing ventricular fibrillations (Li *et al.* 2004, Healy *et al.* 2005, Chorro *et al.* 2005).

In this technical note, we aim to provide preliminary understanding on the origins and the mechanisms of premature ventricular contractions caused by ultrasound and microbubbles. Although PVCs have been demonstrated in patients and quantified in animals and in cell culture, we focus in our study, through in-vitro and in-vivo experiments, on elucidating the relationship between occurrence of PVCs and SAC triggered by oscillating contrast microbubbles during ultrasound exposure. To confirm our hypothesis, the effects of a local mechanical action on a rat's left ventricle as well as on cultured HL-1 cell line were recorded and compared to those caused by microbubbles and ultrasound.

Materials and methods:

In vitro experiment: cell line and electrophysiology recording.

HL-1 cardiac cell lines generously provided by Claycomb laboratory (Department of Biochemistry & Molecular Biology, New Orleans, USA) were used in this study. HL-1 cells were isolated from an atrial cancer cells. The cells were cultured on pre-coating culture dish (gelatin and fibronectin) in a Claycomb culture medium, supplemented with 10% fetal bovine serum, 0.1 mM norepinephrine and 2 mM L-glutamine. Cells were incubated at 37° C in the area saturated by H_2O and 5% CO2 (Claycomb *et al.* 1998).

The patch clamp technique was used to monitor the modification of the cell membrane potential induced by the stretch stimulation with a glass rod (Tran *et al.* 2008). Patch clamp was realized in the "whole cell" configuration (Neher and Sakmann 1976 ; Hamill *et al.* 1981), where the cell membrane potential was recorded under a current-clamp mode with no current injected (I = 0) at room temperature. PClamp® software was used for the generation of voltage commands, acquisition and analysis of results.

In vivo experiment: Animals and electrocardiography.

A total number of 5 pathogen-free male Sprague-Dawley rats were purchased from Iffa-Credo (Charles River, L'Asbresle, France) when they were 40 days old. The care of these animals was carried out in accordance with our institution guidelines. They were housed 3 per cage and maintained at constant temperature and humidity (22°C) with a 12 hr light/dark cycle. All rats were fed a general purpose breeding and rearing diet (Harlan Teklad TRM Rat/Mouse Diet, France). The rats were anaesthetized by a subcutaneous injection of urethane

(Sigma-Aldrich, L'Isle D'Abeau Chesnes, France) at the dose of 1.5g/kg body weight. After the recordings, the animals were sacrificed using a lethal subcutaneous injection of pentobarbital sodium salt (Sigma-Aldrich, L'Isle D'Abeau Chesnes, France) in accordance with local Ethical Committee guidelines.

Electrocardiogram (ECG) was picked up with 2 needle electrodes placed on the atrioventricular axis and recorded with BioAmp® ECG recorder (ADintruments, Bella Vista, Australia). ECG signals were acquired and transferred to a personal computer for storage and further analysis. ECG was recorded during both US and mechanical stimulations.

Ultrasound Setup:

The ultrasound setup consisted of a 1MHz transducer (Sofranel, Sartrouville France) focused at 14mm. Transmitted electrical signals were generated by a function generator (Agilent technologies, USA), and then amplified with a power amplifier (Amplifier Research, Souderton, PA).

For *in vitro* experiments, the transducer was mounted in a holder and fixed with an angle of 45° to the cell line. The transmitted acoustic pressures consisted of waveforms of 40 cycles, repeated every 100 µs with a negative pressure up to 300 kPa.

In the *in vivo* setup, the transducer was mounted in a holder and fixed vertically on the rat's chest. Ultrasound was applied until arrhythmias appeared but no longer than 5 minutes. Note that the acoustic pressure values are calculated from the measurements in water and are not derated for tissue attenuation.

Ultrasound contrast agent :

Sonovue® (Bracco®) is composed of sulfur hexafluoride gas microbubbles coated by a highly elastic phospholipid monolayer shell. The size distribution of Sonovue® microbubbles ranges from 1 to 12 µm with a total number of $2x10^8$ /ml (Gorce and Arditi 1999).

For in-vitro experiments, Sonovue® microbulles were diluted to 1/1000 and perfused to the area near the cells using a peristaltic pump at a rate of 0.5 ml per minute.

For in-vivo studies, a dilution of 1/250 was used and perfused into the rat tail vein at a rate of 0.5 ml per minute.

Mechanical stimulation:

In vitro :

During patch clamp, a mechanical pressure was applied on the plasma membrane of HL-1 cell with a small glass rod mounted on a micromanipulator (Tran *et al.* 2008). Single stimulations were applied rapidly and repeatedly.

In vivo :

A catheter (1mm of diameter) was introduced into the rat aorta and then pushed until the left ventricle of the anesthetized rat. The catheter was pushed manually upon the left ventricle wall to create local mechanical stimulations (Fig. 1). The mechanical pressure was applied briefly.

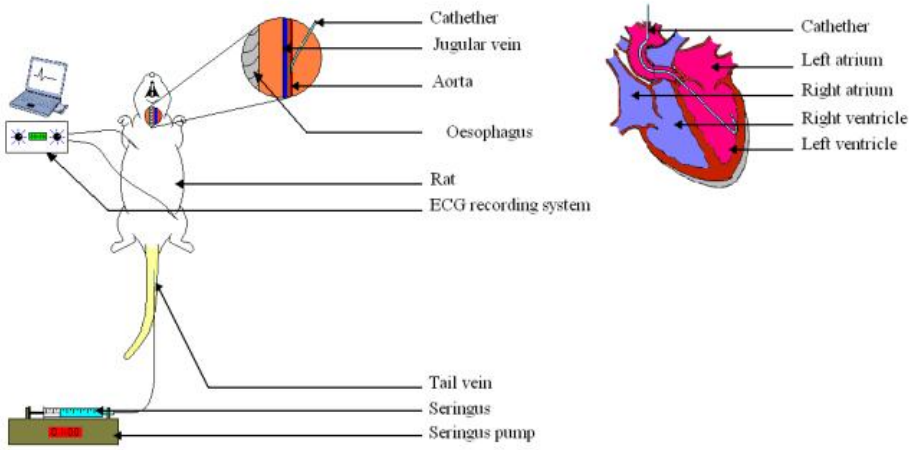


Figure 1 : Mechanical stimulation on the left ventricular wall. The catheter was introduced into the aorta and then, pushed until the left ventricle for a manual stimulation.

Results:

In vitro :

Effects of mechanical stimulation on cell electrophysiological properties :

The results displayed in Fig. 2 demonstrate that a mechanical stimulation on HL-1 heart cell line induced an increase of the membrane potential expressed as a depolarization. When the depolarization amplitude is sufficiently high, action potential (AP) appears. This action potential on the heart tissue induces a contraction and is likely to engender a ventricular contraction if this occurs at the ventricular level (n=5).

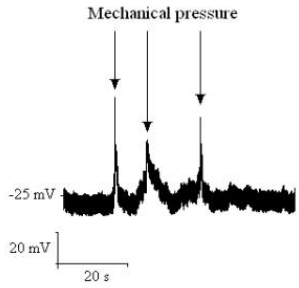


Figure 2 : HL-1 cell membrane potential modifications as induced by manual stimulation (arrows).

Effects of UCA and US on cell electrophysiological properties :

The results from patch clamp measurements show that microbubbles and ultrasound induce similar effect on HL-1 cells as displayed by the membrane potential curve in Fig. 3. A number of depolarization peaks appear briefly (n=2 cells). Similarly, we hypothesize that the cell membrane depolarization as caused by US and microbubbles might initiate action potentials and thus muscular contraction when occurring in-vivo. Ultrasound alone or microbubbles alone did not show any modification on the cell membrane potential (Fig. 4)

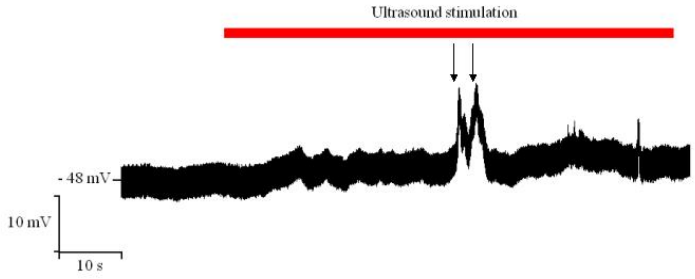


Figure 3 : HL-1 cell membrane potential modifications as induced by microbubbles and ultrasound at 1 MHz frequency, 300kPa, 40 cycles and repetition rate of 100µs.

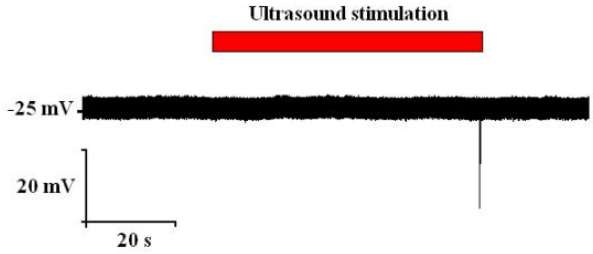


Figure 4 : HL-1 membrane potential recording during ultrasound stimulation without UCA perfusion.

In vivo:

Effect of ultrasound activated microbubbles on ECG waveform :

The results from in-vivo experiments show that ultrasound and microbubbles induce disorders in the heartbeat as demonstrated in the ECG recording of the anesthesized rat shown in Fig. 5. Ultrasound stimulation at 300 kPa in presence of Sonovue® microbubbles engenders perturbation of the ECG signal conduction and thus PVCs appear. Control condition realized with ultrasound alone did not show any modification in the ECG recording. The recording shows that ultrasound waves transmitted in presence of microbubbles induce an increase in QT interval (n = 5 rats). This modification is translated by a difficulty of the ventricle to relax. The inverted R peak seems to underline the appearance of an abnormal depolarization beginning at the ventricular level. Moreover, we observed that the P wave (atrial depolarization) disappears. After the perturbation, the cardiac rhythm observed on ECG seems to accelerate and might correspond to an activation of an adaptation or compensation phenomenon.

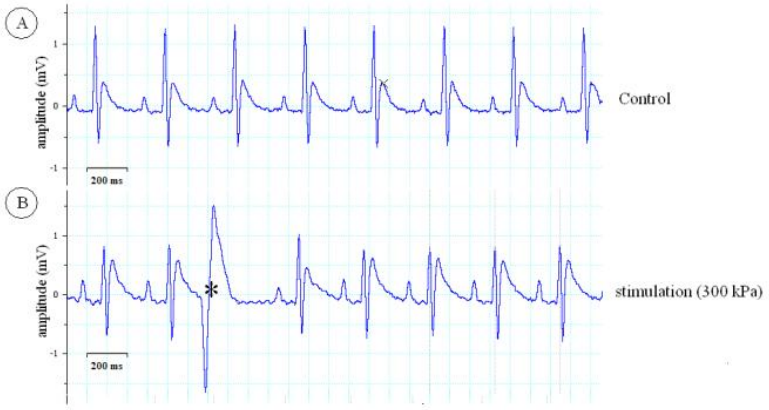


Figure 5 : Rat's ECG recording. A: control during SonoVue® perfusion; B: during ultrasound stimulation in presence of Sonovue® with the appearance of a premature ventricular contraction (*).

Effect of mechanical stimulation on ECG waveform :

Figure 6 shows a similar phenomenon occurring when a mechanical stimulation was applied locally on the left ventricle wall. The mechanical stimulation with the catheter provokes perturbations of heart conduction and therefore provokes PVCs (n = 5 rats).

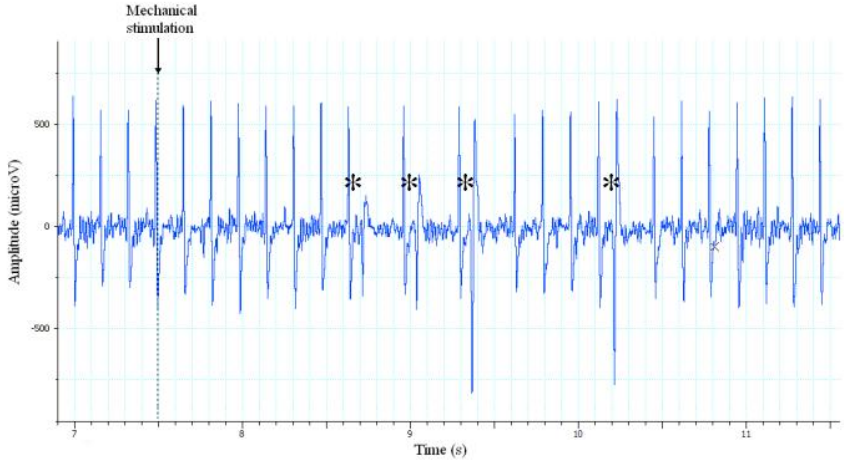


Figure 6 : Rat's ECG recording with mechanical stimulation and the appearance of PVCs (*).

Discussion and conclusions:

While details regarding ultrasound scanning conditions and quantification of PVCs in our experiment may be debated, the main focus of our technical note was simply the discussion of the mechanisms behind the appearance of PVC's that were reported when contrast imaging is performed at high mechanical indices. Results from our in-vivo experiments have confirmed that microbubbles under specific ultrasound excitation induce premature ventricular contractions. This biological effect is likely attributed to a mechanical action of oscillating microbubbles since a mechanical pressure applied manually on the left ventricle wall with a catheter produced a similar modification on the ECG recording. This phenomenon is expressed by a modification of the depolarization waveform as recorded on the ECG and thus PVCs appearance. This result confirms that the arrhythmias induced by ultrasound-activated microbubbles are likely related to a mechanical stretch.

This hypothesis was emphasized through *in vitro* study using cardiac cells. Our findings suggest that this mechanism is provoked by the mechanical action of oscillating microbubbles, which activates ionic channels (SAC). Indeed, in a previous work (Tran *et al.* 2008), we have shown that oscillating microbubbles in the vicinity of a cell membrane trigger SAC opening. In the case of cardiac cells, the activation of ionic channels was expressed by a depolarization of the membrane as reported in other studies (Kohl *et al.* 1992). When the magnitude of the membrane depolarization is sufficiently high, action potentials are created (Nishimura *et al.* 2008). Moreover, it has been shown that mechanical stretch applied directly to cardiac tissue influences cardiac cell resting potential and triggers the appearance of AP (Coulshed and Cowan 1991, Taggart *et al.* 1992, Borjorges-Kuri and Pastelin 1994). Since similar depolarization of the plasma membrane of HL-1 cells was observed with both ultrasound and microbubbles or with a manual stimulation, we assume that a mechanical stretch on the cell membrane is a pivotal mechanism of the role of circulating microbubbles in modifying the rhythm of the AP on the HL-1 cells. In conclusion, our results, from both in-vivo and in-vitro experiments, suggest the implication of stretch activated channels in the appearance of premature ventricular contractions. Under specific US scanning conditions, oscillation of contrast microbubbles near a cardiac cell trigger a cascade of events characterized by SAC opening and cell membrane depolarization, AP appearance followed by PVCs generation. Further work should consist on an exhaustive characterization of the ionic channels involved in the cell membrane depolarization.

Bibliography:

BENHAM, C. D. & BOLTON, T. B. (1986). Spontaneous transient outward currents in single visceral and vascular smooth muscle cells of the rabbit. *J Physiol* **381,** 385-406.

BORIORGES-KURI, R. & PASTELIN, G. (1994). An electrophysiological study on stretching of Purkinje fibers. *Proceedings of the 16th Annual International conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society* **16,** 195-296.

CHORRO, F. J., TRAPERO, I., GUERRERO, J., SUCH, L. M., CANOVES, J., MAINAR, L., FERRERO, A., BLASCO, E., SANCHIS, J., MILLET, J., TORMOS, A., BODI, V. & ALBEROLA, A. (2005). Modification of ventricular fibrillation activation patterns induced by local stretching. *J Cardiovasc Electrophysiol* **16,** 1087-96.

CLAYCOMB, W. C., LANSON, N. A., JR., STALLWORTH, B. S., EGELAND, D. B., DELCARPIO, J. B., BAHINSKI, A. & IZZO, N. J., JR. (1998). HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95,** 2979-84.

COULSHED, D. S. & COWAN, J. C. (1991). Contraction-excitation feedback in an ejecting whole heart model--dependence of action potential duration on left ventricular diastolic and systolic pressures. *Cardiovasc Res* **25,** 343-52.

DALECKI, D., KELLER, B. B., CARSTENSEN, E. L., NEEL, D. S., PALLADINO, J. L. & NOORDERGRAAF, A. (1991). Thresholds for premature ventricular contractions in frog hearts exposed to lithotripter fields. *Ultrasound Med Biol* **17,** 341-6.

DALECKI, D., KELLER, B. B., RAEMAN, C. H. & CARSTENSEN, E. L. (1993). Effects of pulsed ultrasound on the frog heart: I. Thresholds for changes in cardiac rhythm and aortic pressure. *Ultrasound Med Biol* **19,** 385-90.

FUNAMOTO, K., HAYASE, T., SAIJO, Y. & YAMBE, T. (2008). Numerical Experiment for Ultrasonic-Measurement-Integrated Simulation of Three-Dimensional Unsteady Blood Flow. *Ann Biomed Eng*.

GORCE, J. M. & ARDITI , M. (1999). Experimental and simulated acoustic properties of Sonovue®: Predicted behavior in fundamental and harmonic imaging modes. *The fourth Heart Centre Symposium* **4,** 80-81.

HAMILL, O. P., MARTY, A., NEHER, E., SAKMANN, B. & SIGWORTH, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* **391,** 85-100.

HEALY, S. N. & MCCULLOCH, A. D. (2005). An ionic model of stretch-activated and stretch-modulated currents in rabbit ventricular myocytes. *Europace* **7 Suppl 2,** 128-34.

HU, H. & SACHS, F. (1997). Stretch-activated ion channels in the heart. *J Mol Cell Cardiol* **29,** 1511-23.

KOHL, P., KAMKIN, A. G., KISELEVA, I. S. & STREUBEL, T. (1992). Mechanosensitive cells in the atrium of frog heart. *Exp Physiol* **77,** 213-6.

KOHL, P. & SACHS, F. (2001). Mechanoelectric feedback in cardiac cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **359,** 1173-1185.

KUDO, N. & YOKOYAMA, G. (2004). A study on premature ventricular contractions caused by ultrasound exposure with microbubbles using cultured ventricular muscle cells. *J.physics* **1,** 118-121.

KUIJPERS, N. H., TEN EIKELDER, H. M., BOVENDEERD, P. H., VERHEULE, S., ARTS, T. & HILBERS, P. A. (2007). Mechanoelectric feedback leads to conduction slowing and block in acutely dilated atria: a modeling study of cardiac electromechanics. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **292,** H2832-53.

LI, W., KOHL, P. & TRAYANOVA, N. (2004). Induction of ventricular arrhythmias following mechanical impact: a simulation study in 3D. *J Mol Histol* **35,** 679-86.

MACROBBIE, A. G., RAEMAN, C. H., CHILD, S. Z. & DALECKI, D. (1997). Thresholds for premature contractions in murine hearts exposed to pulsed ultrasound. *Ultrasound Med Biol* **23,** 761-5.

MARRION, N. V. & TAVALIN, S. J. (1998). Selective activation of Ca2+-activated K+ channels by co-localized Ca2+ channels in hippocampal neurons. *Nature* **395,** 900-5.

NEHER, E. & SAKMANN, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* **260,** 799-802.

NELSON, M. T., CHENG, H., RUBART, M., SANTANA, L. F., BONEV, A. D., KNOT, H. J. & LEDERER, W. J. (1995). Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science* **270,** 633-7.

NISHIMURA, S., SEO, K., NAGASAKI, M., HOSOYA, Y., YAMASHITA, H., FUJITA, H., NAGAI, R. & SUGIURA, S. (2008). Responses of single-ventricular myocytes to dynamic axial stretching. *Prog Biophys Mol Biol*.

OKAZAKI, J., ISHIKURA, F., ASANUMA, T., OTANI, K. & BEPPU, S. (2004). [Premature ventricular contraction during myocardial contrast echocardiography:

relationship with imaging method, acoustic power and dose of contrast agent]. *J Cardiol* **43,** 69-74.

RAICHLEN, J. S., FORSBERG, F. & GOLDBERG, B. B. (2001). *Ultrasound Contrast Agents: Basic Principles and Clinical Applications*, ed. Martin Dunitz. edition.

ROBITAILLE, R., ADLER, E. M. & CHARLTON, M. P. (1993). Calcium channels and calcium-gated potassium channels at the frog neuromuscular junction. *J Physiol Paris* **87,** 15-24.

ROBITAILLE, R., GARCIA, M. L., KACZOROWSKI, G. J. & CHARLTON, M. P. (1993). Functional colocalization of calcium and calcium-gated potassium channels in control of transmitter release. *Neuron* **11,** 645-55.

TAGGART, P., SUTTON, P., JOHN, R., LAB, M. & SWANTON, H. (1992). Monophasic action potential recordings during acute changes in ventricular loading induced by the Valsalva manoeuvre. *Br Heart J* **67,** 221-9.

TAGGART, P., SUTTON, P. & LAB, M. (1992). Interaction between ventricular loading and repolarisation: relevance to arrhythmogenesis. *Br Heart J* **67,** 213-5.

TAGGART, P., SUTTON, P., LAB, M., RUNNALLS, M., O'BRIEN, W. & TREASURE, T. (1992). Effect of abrupt changes in ventricular loading on repolarization induced by transient aortic occlusion in humans. *Am J Physiol* **263,** H816-23.

TRAN, T. A., LE GUENNEC, J. Y., BOUGNOUX, P., TRANQUART, F. & BOUAKAZ, A. (2008). Characterization of cell membrane response to ultrasound activated microbubbles. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control* **55,** 43-9.

TRAN, T. A., ROGER, S., LE GUENNEC, J. Y., TRANQUART, F. & BOUAKAZ, A. (2007). Effect of ultrasound-activated microbubbles on the cell electrophysiological properties. *Ultrasound Med Biol* **33,** 158-63.

VAN DER WOUW, P. A., BRAUNS, A. C., BAILEY, S. E., POWERS, J. E. & WILDE, A. A. (2000). Premature ventricular contractions during triggered imaging with ultrasound contrast. *J Am Soc Echocardiogr* **13,** 288-94.

ZACHARY, J. F., HARTLEBEN, S. A., FRIZZELL, L. A. & O'BRIEN, W. D., JR. (2002). Arrhythmias in rat hearts exposed to pulsed ultrasound after intravenous injection of a contrast agent. *J Ultrasound Med* **21,** 1347-56; discussion 1343-45.

6. Conclusion et perspectives

Les expériences montrent que les US et les ACU peuvent induire des troubles des ondes de dépolarisation sur l'ECG. Ces modifications de la forme des ondes de l'ECG traduisent la présence d'arythmies. Comme démontré dans l'article, ces troubles peuvent être imputer aux stress mécaniques exercés par les oscillations des microbulles. Cette hypothèse est soutenue par la possibilité de reproduire ces troubles par des pressions mécaniques manuellement induites. De plus, *in vitro*, sur la lignée de cellules cardiaques HL-1, les microbulles oscillantes entraînent des dépolarisations qui, lorsqu'elles sont suffisantes, génèrent à leur tour un potentiel d'action (PA).

Ces expériences sont importantes par ce qu'elles mettent en évidence les mécanismes déclenchés par les US et les ACU qui conduisent aux PVC. Cependant, maintenant que l'on connaît les mécanismes, il est important de savoir enlever tout risque que les arythmies apparaissent. Pour cela, en perspective il faut :

- caractériser les canaux ioniques activés par les ACU sous l'effet des US. Les résultats sur les cellules HL-1 sont différents de ceux obtenus sur les cellules MDA-MB-231 (dépolarisation/hyperpolarisation) impliquant de ce fait des canaux différents. Bien que ces canaux soit des sensibles aux stress mécaniques, les mécanismes d'activation peuvent varier tout comme leur sensibilité (directement ou indirectement activé par les stimuli mécanique).

- étudier les paramètres ultrasonores afin de déterminer le seuil d'apparition des arythmies. En effet, comme la plupart des phénomènes de mécano-transduction, il y probablement une relation entre la dose (pression acoustique, fréquence de l'onde ultrasonore) et les effets (nombre de PVC, importance des arythmies) qui serait corréler avec la sensibilité aux stimuli des mécanismes impliqués.

- une fois les canaux caractérisés et les mécanismes élucidés, nous pouvons mettre en place des stratégies pour éviter ou réduire tous risques d'arythmies. Nous pouvons imaginer par exemple, inhiber les SAC avec des antibiotiques comme la streptomycine (Belus and White 2002 ; Fu *et al.* 2007 ; Ward *et al.* 2008) ou encore développer de nouveaux paramètres ultrasonores.

- au niveau de la compréhension du mécanisme, il y a 2 hypothèses possibles. Les SAC peuvent être activer soit par la pression acoustique intra-ventriculaire, générée par les ultrasons et amplifiée par les agents de contraste, ou par l'oscillation des microbulles. Pour déterminer le mécanisme impliqué, nous pouvons mesurer la pression intra-ventriculaire.

IX. Effets sur la résistance trans-endothéliale et les transfections.

1. Introduction

Nous avons pu mettre en évidence que les microbulles sous l'effet des ultrasons activent les SAC et les canaux modulées par le stress mécanique comme les BK_{Ca} sur les cellules MDA-MB-231. Une question incontournable nous a tout de suite apparue à savoir : Quel est le rôle des canaux BK_{Ca} dans le mécanisme d'augmentation de la perméabilité membranaire ou dans le phénomène de transfection ?

Pour répondre à cette question, nous avons tout d'abord adapter le système de TEER au dispositif ultrasonore afin d'étudier les effets des ultrasons sur la perméabilité trans-endothéliale et le rôle des SAC. Nous avons ensuite mis en place un dispositif et un protocole d'étude afin de pouvoir transfecter les cellules avec le plasmide codant pour la GFP. Nous pourrons ainsi étudier l'importance des BKCa dans les mécanismes amenant à la transfection.

2. Matériels et méthodes

2.1. TEER : dispositif et protocole expérimentales

- ***Les cellules HUVEC***

Les cellules HUVEC (Human Ombilical Vein Endothelial Cells) sont isolées à partir d'une veine ombilicale d'une personne saine (Figure 40). Ces cellules proviennent de chez PromoCell® (PromoCell® Gmbh, Heidelberg, Allemagne) sous forme congeler dans des cryotubes. Elles décongelées puis cultivées dans une milieu approprié selon leurs recommandations du fournisseur PromoCell® (milieu de culture pour HUVEC, incubateur saturée en H_2O, 5% de CO_2 et à 37°c).

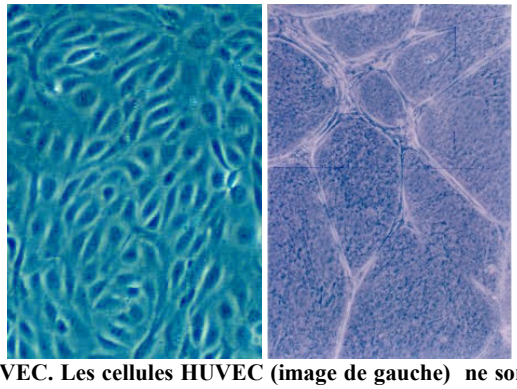


Figure 40 : les cellules HUVEC. Les cellules HUVEC (image de gauche) ne sont pas une lignée cellulaire en tant que telle car leur nombre de doublement en culture *in vitro* est limitée (entre 16 et 20 doublements) après quoi, elles ne prolifèrent plus et se différencient. (image de droite) Sur boîte de pétri coatée avec du Matrigel®, les HUVEC forment des tubules (http://www.cellapplications.com/HumanCells/HUVEC.htm).

Après au moins 1 semaine de culture après la réception des cellules, les cellules sont trypsinées puis ré-ensemencées dans les inserts de TEER® (Nunc® polycarbonate membrane 0,4µm, Nunc® GmbH & Co.KG, Wiesbaden, Allemagne) à hauteur de 200 000 cellules/insert.

- ***Dispositif et protocole expérimental***

Lorsque la résistance mesurée tous les 2 jours est stable depuis au moins 6 jours, ce qui signifie que la membrane est complètement recouverte par les cellules et que ces dernières ont atteint la confluence, les stimulations ultrasonores débutent.

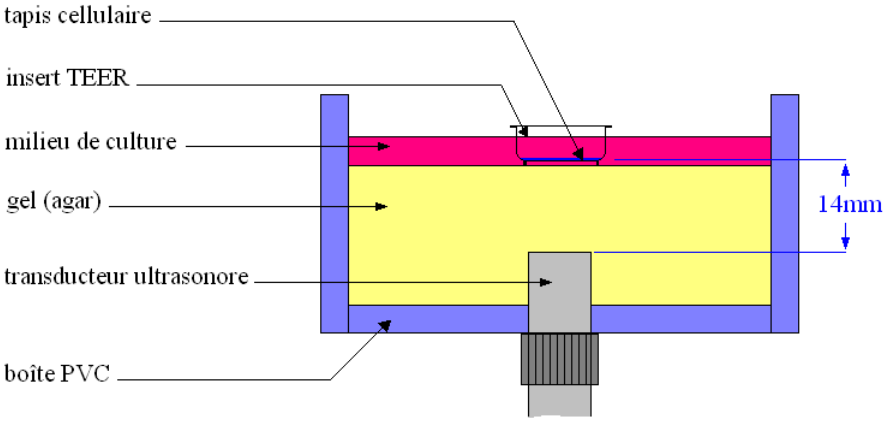


Figure 41 : Dispositif de stimulation ultrasonore des inserts servant pour la TEER. L'insert de TEER est positionné sur un gel (eau + 5% agar) de telle manière que la sonde soit placée à 14mm. Le milieu de culture recouvre la surface du gel (10mm de hauteur) tout comme la membrane de polycarbonate.

L'insert de TEER est retiré de la plaque de culture puis disposé sur le dispositif expérimental comme décrit sur la figure 41. Il est important de souligner que l'ensemble des manipulations se déroule sous une hotte à flux laminaire et que le dispositif expérimental est stérile.

Juste avant la stimulation ultrasonore, les microbulles de Sonovue® diluée dans du milieu de culture (1/10 000) sont injectées lentement afin de ne pas léser la monocouche cellulaire à l'aide d'une seringue. La quantité injectée est de 100µL (environ 10^5 microbulles). La stimulation ultrasonore (transducteur mono-élément 1MHz, 40 cycles, répétition 100µs, 300 kPA) dure 1min. Les inserts sont ensuite replacés dans la plaque de culture afin de pouvoir mesurer la résistance. La TEER est mesuré à 3 temps différents : juste avant la stimulation (control), 30s après la stimulation (t1) et 5 min après stimulation (t2).

2.2. les transfections

- ***Les cellules U-87 MG***

Les cellules U-87 MG, montrées dans la figure 42 (lignée cellulaire issue de gliome humain) proviennent de chez ATCC® (LGC Standards Sarl, Molsheim, France) sous forme congeler dans des cryotubes. Elles décongelées puis cultivées dans une milieu approprié (milieu DMEM et 10% de SVF) selon leurs recommandations de ATCC® (incubateur saturée en H_2O, 5% de CO_2 et à 37°c).

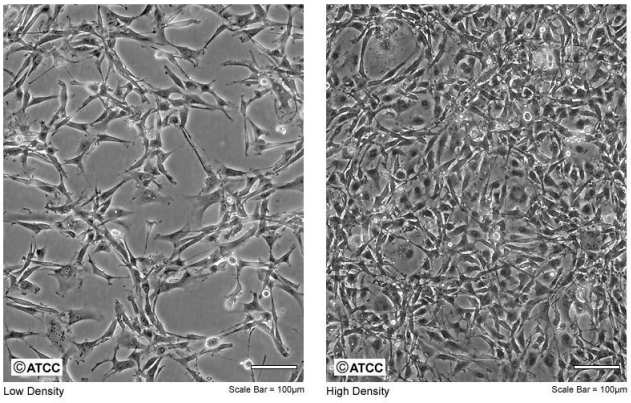


Figure 42 : les cellules U-87 MG. Les cellules U-87 MG à faible confluence (à gauche) et à forte confluence (à droite) (http://www.lgcpromochem-atcc.com/common/images/Cells/HTB-14_mg1.jpg).

- ***Dispositif et protocole expérimental***

Lorsque les cellules ont atteint un degré suffisant de confluence (entre 70 et 90% de confluence), elles sont trypsinées et recueilli dans du milieu dépourvu de SVF. Le SVF contient en effet des enzymes qui peuvent altérer les plasmides. Les cellules sont ensuite placées dans une cuve en polycarbonate puis dans le dispositif de transfection comme décrit dans la figure 43.

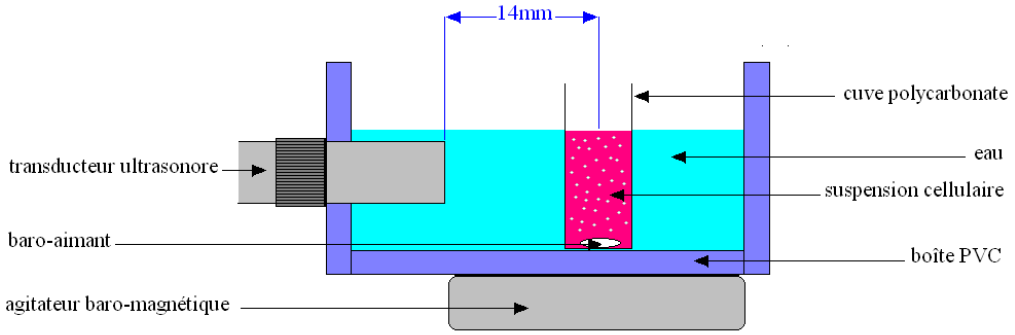


Figure 43 : Dispositif de transfection par les ultrasons et les microbulles. Les cellules en suspension dans leur milieu de culture sont placé dans une cuve en polycarbonate, très peu réflective pour les ondes ultrasonore. Le centre de la cuve est placé au point focal à 14mm du transducteur. Un système d'agitation baro-magnétique est mis en place afin de maintenir les cellules en suspension. La boite contenant le dispositif contient de l'eau pour permettre une transmission optimale des ultrasons vers les cellules.

Juste avant la stimulation ultrasonore, les microbulles de BR14® diluée dans du milieu de culture sans SVF (1/10 000) sont injectées de même que l'ADN. La quantité injectée est de 100 µL (environ 10^5 microbulles) de microbulle et 50 µg d'ADN (plasmide codant pour la GFP).

La stimulation ultrasonore (transducteur mono-élément 1MHz, 40 cycles, répétition 100µs) dure 1min. Après la transfection, les cellules sont ré-ensemencées dans des boîtes de culture de 35 mm. Du SVF est ajouté au milieu de culture afin d'obtenir une concentration finale de 10% avant de replacer les cellules dans l'incubateur. 24h après mis en culture, la transfection est quantifiée par la technique de cytométrie en flux.

3. Résultats et Discussions

Dans le souci d'homogénéiser les résultats avec les précédentes études nous avons voulu utiliser les MDA-MB-231. Cependant, il s'avère que ces cellules ne convenaient pas à nos expériences. Pour la mesure de la TEER, la résistance de la mono-couche cellulaire est trop faible, très certainement à cause des inhibitions de contact, induisant une grande variabilité et des résultats inexploitables (résultats non présentés). Les cellules MDA-MB-231 sont généralement difficiles à transfecter et d'ailleurs, nous n'avons pas pu le faire avec la méthode développée dans cette étude. En effet, malgré l'augmentation de la quantité d'ADN, de la quantité de microbulles et de la pression acoustique, moins de 5% des cellules expriment la GFP. Cette quantité de cellules est insuffisante pour observer les effets d'une drogue sur le mécanisme de transfection (résultats non présentés).

Le choix s'est alors porté sur les cellules HUVEC et les cellules U-87 MG. Les HUVEC ont été utilisées pour les mesures de TEER et les expériences ont montré que les microbulles sous l'effet des ultrasons entraînent une diminution de la résistance de la monocouche cellulaire (Van Wamel *et al.* 2006). De plus, nous avons vérifié que les HUVEC possèdent sur leur membrane les canaux BK_{Ca} comme le démontre un certain nombre de travaux (Kulhmann *et al.* 2004 ; Korosoglou *et al.* 2006). Les U-87 MG, quant à elles, sont très utilisées pour les transfections de divers plasmides. Les transfections médiées par les ultrasons et les microbulles sont particulièrement efficaces sur cette lignée cellulaire (Siu *et al.* 2007). Nous avons également pu observer, comme dans de nombreuses études (Nicoll 1988 ; Fields *et al.* 2002 ; Fioretti et al. 2006 ; Weaver et al. 2007 ; Azanza *et al.* 2008) la présence des canaux BK_{Ca} dans ce type cellulaire.

3.1. La résistance trans-endothéliale

Les mesures de la résistance trans-endothéliale (figure 44) montrent qu'en dessous de 200 kPa (onde de 1 MHz, 40 cycles, répétition de 100µs), les microbulles et les ultrasons n'induisent pas de variation de la perméabilité alors que, à 400 kPa, il y a une augmentation de la perméabilité qui se traduit par une diminution de la résistance. On remarque aussi que cette variation est transitoire puisque, 5min après la stimulation, la résistance n'est pas significativement différente du témoin.

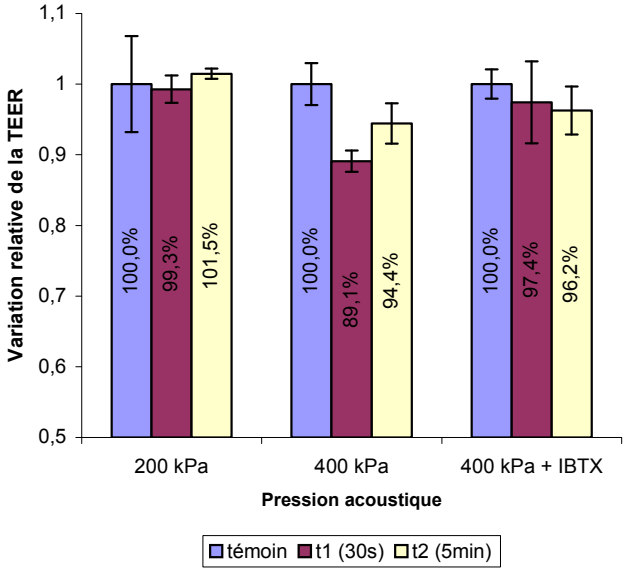


Figure 44 : Effet des ultrasons et des microbulles sur la TEER. Les cellules sont soumises à une stimulation ultrasonore (transducteur 1 MHz, 40 cycles, répétition 100µs) générant 200 ou 400 kPa d'une durée de 1 minute. Ensuite, nous avons injecté de l'ibériotoxine (IbTx 10^{-7} M) avant de stimuler un troisième groupe d'inserts. La résistance est mesurée à 3 temps différents : juste avant la stimulation (control), 30s après la stimulation (t1) et 5 min après stimulation (t2) (n= 3 puits pour chacune des mesures).

En présence d'ibériotoxine (IbTx), on observe que, malgré une tendance à la diminution, la résistance ne varie pas de manière significative. Il semble donc que les canaux BK_{Ca} participent aux phénomènes de perméabilisation induits par le stress mécanique. Cependant, il n'est pas possible au travers de cette technique de déterminer si la variation est induite par une augmentation de la perméabilité trans-membranaire ou une modification des liaisons inter-cellulaires libérant des passages entre les cellules. La réponse sera en partie fournie par l'étude des transfections qui va rendre compte des modifications à l'échelle de la cellule.

3.2. Transfection de la GFP

Sur les cellules U87MG, la quantité de cellules transfectées représente plus de 33% des cellules viables (figure 45). Cette valeur n'est cependant pas modifiée lorsque la transfection s'effectue en présence d'IbTx (10^{-7}M). Ces résultats semblent donc montrer que les canaux BKCa exprimés à la surface des membranes des cellules U87MG ne participent pas au phénomène d'intégration du plasmide dans la cellule.

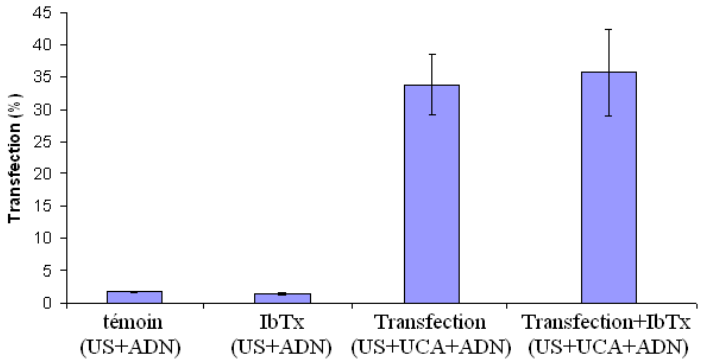


Figure 45 : Transfection de la GFP en utilisant les ultrasons et les microbulles. Les cellules U87MG sont stimulées par les ultrasons (transducteur 1MHz, 400 kPa, 40 cycles, 100 µs de répétition) en présence d'ADN (10µg). La stimulation ultrasonore dure 2min en absence ou en présence de microbulles et présence ou en absence d'IbTx (10^{-7}M). Le taux de transfection est évaluer grâce à la cytométrie en flux (n=2 pour chacune des conditions expérimentales).

Or, lorsque nous observons le taux de mortalité des cellules après le protocole de transfection, l'IbTx (10^{-7}M) augmente la mortalité des cellules (figure 46). Cet effet ne peut être imputé à la toxicité de l'IbTx puisqu'en absence de microbulles, il n'y a pas de différence avec la condition témoin.

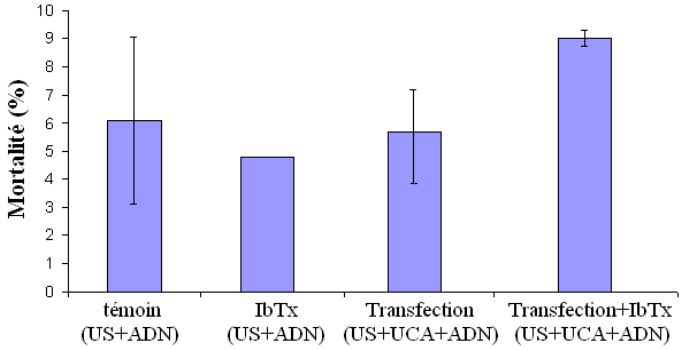


Figure 46 : Mortalité cellulaire suite au protocole de transfection de la GFP en utilisant les ultrasons et les microbulles. Les cellules U87MG sont stimulées par les ultrasons (transducteur 1MHz, 400 kPa, 40 cycles, 100 µs de répétition, 2 min) en présence d'ADN (10µg) dans différentes conditions : en présence ou non de microbulles et en présence ou non d'IbTx (10^{-7}M). La mortalité cellulaire est évaluée grâce à la cytométrie en flux (n=2 pour chacune des conditions expérimentales).

Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que les SAC doivent jouer un rôle de protection de la cellule contre le stress mécanique. Nous pouvons imaginer que les canaux BK_{Ca}, en s'activant, permet à la cellule de mieux supporter le stress mécanique ainsi que la transfection. Dans l'état actuel de nos expériences, nous ne pouvons affirmer ces faits sans expériences complémentaires, cependant cette expérience permet d'ouvrir une voie très intéressante d'étude du rôle des SAC et les conséquence de leur activation.

4. Conclusion et perspectives

Il est important de rappeler que les résultats obtenues ne sont que préliminaires et n'ont pour but que d'ouvrir des nouvelles perspectives et d'établir des hypothèses. Ils ne permettent pas, au vu du peu d'expérience réalisée, de valider ni de donner des conclusions. Il est donc nécessaire de renouveler, dans un premier temps, les expériences afin de pouvoir confirmer le raisonnement.

Cependant, au travers de ces expériences, il semblerait que les microbulles entraînent une augmentation de la perméabilité trans-épithéliale. Cette augmentation semble être le résultat d'une modification des liaisons inter-cellulaires. Les effets de l'IbTx soulignent l'importance des SAC dans ces interactions mais leur rôle exacte reste à être déterminé.

Néanmoins, les expériences de transfection montrent que les SAC n'ont pas de rôle dans les mécanismes de transfection induits pas les microbulles et les ultrasons. Ce résultat soutient l'hypothèse que d'autres voies de signalisation ou d'autres canaux ioniques (insensibles à l'IbTx) activés par les oscillations des microbulles peuvent être impliqués. Il est important de souligner que le rôle des canaux ioniques sensibles à l'IbTx et activés par le stress mécanique n'est pas négligeable. Ils semblent effectivement liés aux phénomènes de protection cellulaire puisque leur inhibition semble entraîner une augmentation de la mortalité cellulaire. D'ailleurs, leur activation peut probablement avoir des conséquences sur le fonctionnement cellulaire et générer des effets secondaires.

Cependant, ces premiers résultats permettent de mettre en place un certain nombre de perspectives car elles posent de très nombreuses questions :

- les canaux ioniques sensibles à l'IbTx semblent être impliqués dans la modification de la résistance trans-endothéliale d'une monocouche de cellules HUVEC. Cette modification de la résistance indique une modification des jonctions ou liaisons inter-cellulaires. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse d'un éventuel rôle des SAC dans les liaisons inter-cellulaires ou dans le dynamisme du cytosquelette.

- les canaux ioniques sensibles à l'IbTx semblent protéger les cellules U87MG contre le stress mécanique et les effets de la transfection. Ainsi, nous pouvons nous demander si, par un activateur ou en potentialisant l'activité de ces canaux (en augmentant par exemple la concentration de calcium pour les BK_{Ca}), nous pouvons augmenter la viabilité des cellules et avoir une meilleure résistance à la transfection ce qui, par conséquent, permet d'améliorer le rendement de la technique.

Conclusion générale

La thérapie basée sur les ultrasons et les microbulles est une technique qui comporte de nombreux avantages. Ciblé et contrôlé, le traitement permettrait de réduire la quantité de principe actif et les effets secondaires tout en conservant une efficacité équivalente au mode d'administration classique. Cependant les mécanismes et les interactions microbulles-cellules sont mal connues et peu étudiés. Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont essayé de contribuer à une meilleure compréhension de ces mécanismes. Ils ont notamment permis de mettre en évidence un phénomène de stress mécanique induit par les oscillations de la microbulle. Ce stress mécanique est important en différant points.

Nous avons démontré qu'il est à l'origine de l'un des rares effets secondaires non liés à une allergie ou à l'injection des ACU qui sont les arythmies. Cette mise en évidence permet, en connaissance de cause, d'éviter les PVC en inhibant les SAC par des toxines ou tout simplement des antibiotiques comme la streptomycine (Belus and White 2001 ; Belus and White 2002 ; Belus and White 2003 ; Fu *et al.* 2007 ; Ward *et al.* 2008) ou encore modifiant les paramètres acoustiques (puisqu'il existe une relation du type effet-dose).

Les stimulations mécaniques peuvent aussi activer les SAC et induire une modification du potentiel de la membrane cellulaire. Nous pouvons penser qu'en modifiant les charges de la surface membranaire, l'interaction des différents éléments environnants avec la membrane plasmique change également. Dans le cadre d'une thérapie, ces modifications peuvent aider à l'incorporation des molécules en favorisant l'adhésion à la membrane plasmique, en jouant sur les forces électromotrices ou encore en stimulant d'autre voie de signalisation. Au cours de cette étude, nous avons focalisé notre attention sur les effets des perturbations mécaniques sur les canaux ioniques et leur implication dans l'augmentation de la perméabilité membranaire. Or, la mécano-transduction peut comporter plusieurs étapes. En effet, la variation du potentiel de membrane peut moduler l'activité d'autres canaux ioniques sensibles aux potentiels (voltage operated channels = VOC). Parmi les canaux activés par le voltage, les canaux calciques sont importants car ils permettent l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium que nous avons observée au cours de nos expériences et décrits dans de nombreuses publications. Le calcium est très important au niveau cellulaire car il peut déclencher un très grand nombre de cascades de réactions et joue aussi bien le rôle de second messager que d'effecteur.

De plus, les canaux ioniques ne sont pas les seuls éléments sensibles aux stress mécaniques. Il semble en effet que les canaux n'interviennent par directement dans les mécanismes d'incorporation des molécules mais plus dans les liaisons intercellulaires et dans la protection des cellules au cours de la transfection médiées par les ACU et les US. Nous

pouvons donc imaginer la participation d'autres mécanismes déclenchés par les stimulations mécaniques (voie des MAP-kinase, AMPc, eNOS,…) dans les mécanismes de perméabilité au niveau membranaire.

En fait, ces travaux posent un certain nombre de questions et ouvrent la voie vers de nombreuses études complémentaires comme par exemple :

- Il est important de déterminer quelles sont les autres voies activées par les oscillations des ACU. Pour cela nous pouvons envisager de mesurer l'activité enzymatique des enzymes participant aux différentes voies.

- Le massage cellulaire par la microbulle activée par les ultrasons entraîne des déformations de la membrane plasmique. Ces déformations doivent très certainement induire des perturbations au niveau du cytosquelette. Quels sont les conséquences d'une atteinte de l'intégrité du cytosquelette?

- Nous savons que les lipides jouent un rôle prépondérant dans la fluidité membranaire qui va elle-même régir la perception de la cellule au stress mécanique (lié probablement aux phénomènes viscoélastiques ou à l'activité des protéines membranaires). Ainsi, en modifiant la composition de la microbulle, nous pouvons modifier la composition lipidique de la membrane plasmique par enrichissement locale si celle-ci s'incorpore dans la membrane. Il est donc important de savoir le rôle exact de la composition lipidique dans l'incorporation des molécules et l'activation des voies réactionnelles sensibles aux stress.

BIBLIOGRAPHIE

(1994). AIUM/NEMA safety standard for diagnostic ultrasound equipment. AIUM/NEMA Standards publication. *J Ultrasound Med*, 13, 69-72.

(1996). EFSUMB. Thermal an mechanical indices. *Eur J Ultrasound*, 4, 145-150.

(1997). EFSUMB. Terms used in describing ultrasonic exposure. *Eur J Ultrasound*, 5, 127-130.

(2000). Safety statement, 2000. International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology (ISUOG). *Ultrasound Obstet Gynecol*, 16(6), 594-596.

Abe, J., Baines, C.P., & Berk, B.C. (2000). Role of mitogen-activated protein kinases in ischemia and reperfusion injury : the good and the bad. *Circ Res*, 86(6), 607-609.

Abramowicz, J.S., Kossoff, G., Marsal, K., & Ter Haar, G. (2002). Literature review by the ISUOG Bioeffects and Safety Committee. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 19(3), 318-319.

Adam, R.M., Roth, J.A., Cheng, H.L., Rice, D.C., Khoury, J., Bauer, S.B., Peters, C.A., & Freeman, M.R. (2003). Signaling through PI3K/Akt mediates stretch and PDGF-BB-dependent DNA synthesis in bladder smooth muscle cells. *J Urol*, 169(6), 2388-2393.

Adelman, J.P., Shen, K.Z., Kavanaugh, M.P., Warren, R.A., Wu, Y.N., Lagrutta, A., Bond, C.T., & North, R.A. (1992). Calcium-activated potassium channels expressed from cloned complementary DNAs. *Neuron*, 9(2), 209-216.

Akamatsu, N. (1981). [Ultrasound irradiation effects on pre-implantation embryos (author's transl)]. *Acta Obstet Gynaecol Jpn*, 33(7), 969-978.

Althaus, M., Bogdan, R., Clauss, W.G., & Fronius, M. (2007). Mechano-sensitivity of epithelial sodium channels (ENaCs): laminar shear stress increases ion channel open probability. *Faseb J*, 21(10), 2389-2399.

Angles, J.M., Walsh, D.A., Li, K., Barnett, S.B., & Edwards, M.J. (1990). Effects of pulsed ultrasound and temperature on the development of rat embryos in culture. *Teratology*, 42(3), 285-293.

Arbeille, P., & Herault, S. (1997). Généralités sur les mécanismes physiques des effets biologiques des ultrasons. *JEMU*, 18, 306-014.

Ariani, M., Fishbein, M.C., Chae, J.S., Sadeghi, H., Michael, A.D., Dubin, S.B., & Siegel, R.J. (1991). Dissolution of peripheral arterial thrombi by ultrasound. *Circulation*, 84(4), 1680-1688.

Atkinson, N.S., Robertson, G.A., & Ganetzky, B. (1991). A component of calcium-activated potassium channels encoded by the Drosophila slo locus. *Science*, 253(5019), 551-555.

Azanza, M.J., Perez-Castejon, C., Pes, N., Perez-Bruzon, R.N., Aisa, J., Junquera, C., Maestu, C., Lahoz, M., Martinez-Ciriano, C., Vera-Gil, A., & Del Moral, A. (2008). Characterization by immunocytochemistry of ionic channels in Helix aspersa suboesophageal brain ganglia neurons. *Histol Histopathol*, 23(4), 397-406.

Azuma, H., Tomita, N., Kaneda, Y., Koike, H., Ogihara, T., Katsuoka, Y., & Morishita, R. (2003). Transfection of NFkappaB-decoy oligodeoxynucleotides using efficient ultrasound-mediated gene transfer into donor kidneys prolonged survival of rat renal allografts. *Gene Ther*, 10(5), 415-425.

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

Barberis, L., Wary, K.K., Fiucci, G., Liu, F., Hirsch, E., Brancaccio, M., Altruda, F., Tarone, G., & Giancotti, F.G. (2000). Distinct roles of the adaptor protein Shc and focal adhesion kinase in integrin signaling to ERK. *J Biol Chem*, 275(47), 36532-36540.

Barman, S.A., Zhu, S., Han, G., & White, R.E. (2003). cAMP activates BKCa channels in pulmonary arterial smooth muscle via cGMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 284(6), L1004-1011.

Barman, S.A., Zhu, S., & White, R.E. (2004). Protein kinase C inhibits BKCa channel activity in pulmonary arterial smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 286(1), L149-155.

Barnett, S.B., Walsh, D.A., & Angles, J.A. (1990). Novel approach to evaluate the interaction of pulsed ultrasound with embryonic development. *Ultrasonics*, 28(3), 166-170.

Barnett, S.B., ter Haar, G.R., Ziskin, M.C., Nyborg, W.L., Maeda, K., & Bang, J. (1994). Current status of research on biophysical effects of ultrasound. *Ultrasound Med Biol*, 20(3), 205-218.

Barnett, S.B., Ter Haar, G.R., Ziskin, M.C., Rott, H.D., Duck, F.A., & Maeda, K. (2000). International recommendations and guidelines for the safe use of diagnostic ultrasound in medicine. *Ultrasound Med Biol*, 26(3), 355-366.

Beckmann, C., Rinne, A., Littwitz, C., Mintert, E., Bosche, L.I., Kienitz, M.C., Pott, L., & Bender, K. (2008). G Protein-Activated (GIRK) Current in Rat Ventricular Myocytes is Masked by Constitutive Inward Rectifier Current (I(K1)). *Cell Physiol Biochem*, 21(4), 259-268.

Belmonte, S., & Morad, M. (2008). Shear fluid-induced Ca2+ release and the role of mitochondria in rat cardiac myocytes. *Ann N Y Acad Sci*, 1123, 58-63.

Belmonte, S., & Morad, M. (2008). 'Pressure-flow'-triggered intracellular Ca2+ transients in rat cardiac myocytes: possible mechanisms and role of mitochondria. *J Physiol*, 586(5), 1379-1397.

Belus, A., & White, E. (2001). Effects of antibiotics on the contractility and Ca2+ transients of rat cardiac myocytes. *Eur J Pharmacol*, 412(2), 121-126.

Belus, A., & White, E. (2002). Effects of streptomycin sulphate on I(CaL), I(Kr) and I(Ks) in guinea-pig ventricular myocytes. *Eur J Pharmacol*, 445(3), 171-178.

Belus, A., & White, E. (2003). Streptomycin and intracellular calcium modulate the response of single guinea-pig ventricular myocytes to axial stretch. *J Physiol*, 546(Pt 2), 501-509.

Benham, C.D., Bolton, T.B., Lang, R.J., & Takewaki, T. (1986). Calcium-activated potassium channels in single smooth muscle cells of rabbit jejunum and guinea-pig mesenteric artery. *J Physiol*, 371, 45-67.

Benham, C.D., & Tsien, R.W. (1987). A novel receptor-operated Ca2+-permeable channel activated by ATP in smooth muscle. *Nature*, 328(6127), 275-278.

Benos, D.J. (1982). Amiloride: a molecular probe of sodium transport in tissues and cells. *Am J Physiol*, 242(3), C131-145.

Birnbaum, Y., Luo, H., & Nagai, T. (1998). Non invasive in vivo clot dissolution without athrombolytic drug. *Circulation*, 97, 130-134.

Birnbaum, Y., Iakobishvili, Z., Porter, A., Hasdai, D., Atar, S., Siegel, R.J., & Battler, A. (2000). Microparticle-containing oncotic solutions augment in-vitro clot disruption by ultrasound. *Thromb Res*, 98(6), 549-557.

Blaug, S., Hybiske, K., Cohn, J., Firestone, G.L., Machen, T.E., & Miller, S.S. (2001). ENaC- and CFTR-dependent ion and fluid transport in mammary epithelia. *Am J Physiol Cell Physiol*, 281(2), C633-648.

Bouakaz, A. (2005). HDR : les produits de contraste.

Bowman, C.L., Gottlieb, P.A., Suchyna, T.M., Murphy, Y.K., & Sachs, F. (2007). Mechanosensitive ion channels and the peptide inhibitor GsMTx-4: history, properties, mechanisms and pharmacology. *Toxicon*, 49(2), 249-270.

Brannen, G.E., & Bush, W.H. (1985). Percutaneous ultrasonic versus surgical removal of kidney stones. *Surg Gynecol Obstet*, 161(5), 473-478.

Brannen, G.E., Bush, W.H., Correa, R.J., Gibbons, R.P., & Elder, J.S. (1985). Kidney stone removal: percutaneous versus surgical lithotomy. *J Urol*, 133(1), 6-12.

Bravo-Zehnder, M., Orio, P., Norambuena, A., Wallner, M., Meera, P., Toro, L., Latorre, R., & Gonzalez, A. (2000). Apical sorting of a voltage- and Ca2+-activated K+ channel alpha -subunit in Madin-Darby canine kidney cells is independent of N-glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(24), 13114-13119.

Brayden, J.E., & Nelson, M.T. (1992). Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science*, 256(5056), 532-535.

Brayman, A.A., Coppage, M.L., Vaidya, S., & Miller, M.W. (1999). Transient poration and cell surface receptor removal from human lymphocytes in vitro by 1 MHz ultrasound. *Ultrasound Med Biol*, 25(6), 999-1008.

Browe, D.M., & Baumgarten, C.M. (2003). Stretch of beta 1 integrin activates an outwardly rectifying chloride current via FAK and Src in rabbit ventricular myocytes. *J Gen Physiol*, 122(6), 689-702.

Browe, D.M., & Baumgarten, C.M. (2003). Stretch of beta 1 integrin activates an outwardly rectifying chloride current via FAK and Src in rabbit ventricular myocytes. *J Gen Physiol*, 122(6), 689-702.

Brown, A.H., & Davies, P.G. (1972). Ultrasonic decalcification of calcified cardiac valves and annuli. *Br Med J*, 3(5821), 274-277.

Brown, N.A., Nassiri, D., & ter Haar, G. (1991). Comments on "Effects of pulsed ultrasound and temperature on the development of rat embryos in culture". *Teratology*, 43(6), 551, 553-554.

Butler, A., Tsunoda, S., McCobb, D.P., Wei, A., & Salkoff, L. (1993). mSlo, a complex mouse gene encoding "maxi" calcium-activated potassium channels. *Science*, 261(5118), 221-224.

Cailleau, R., Olive, M., & Cruciger, Q.V. (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro*, 14(11), 911-915.

Carbajal, J.M., & Schaeffer, R.C., Jr. (1999). RhoA inactivation enhances endothelial barrier function. *Am J Physiol*, 277(5 Pt 1), C955-964.

Carlier, M.F., Pantaloni, D., & Korn, E.D. (1985). Polymerization of ADP-actin and ATP-actin under sonication and characteristics of the ATP-actin equilibrium polymer. *J Biol Chem*, 260(11), 6565-6571.

Carstensen, E.L., & Gates, A.H. (1984). The effects of pulsed ultrasound on the fetus. *J Ultrasound Med*, 3(4), 145-147.

Carstensen, E.L. (1987). Acoustic cavitation and the safety of diagnostic ultrasound. *Ultrasound Med Biol*, 13(10), 597-606.

Cassis, A.N., Brannen, G.E., Bush, W.H., Correa, R.J., & Chambers, M. (1991). Endopyelotomy: review of results and complications. *J Urol*, 146(6), 1492-1495.

Chan, K.K., Watmough, D.J., Moir, K., & Hope, D.T. (1985). Measurement of the efficiency of tissue removal with the Cavitron Ultrasonic Surgical Aspirator and the comparison with a new motor-driven probe. *Ultrasound Med Biol*, 11(3), L533-537.

Chan, K.K., Watmough, D.J., Hope, D.T., & Moir, K. (1986). A new motor-driven surgical probe and its in vitro comparison with the Cavitron Ultrasonic Surgical Aspirator. *Ultrasound Med Biol*, 12(4), 279-283.

Chang, C.P., Dworetzky, S.I., Wang, J., & Goldstein, M.E. (1997). Differential expression of the alpha and beta subunits of the large-conductance calcium-activated potassium channel: implication for channel diversity. *Brain Res Mol Brain Res*, 45(1), 33-40.

Chen, K.D., Li, Y.S., Kim, M., Li, S., Yuan, S., Chien, S., & Shyy, J.Y. (1999). Mechanotransduction in response to shear stress. Roles of receptor tyrosine kinases, integrins, and Shc. *J Biol Chem*, 274(26), 18393-18400.

Chen, S., Ding, J.H., Bekeredjian, R., Yang, B.Z., Shohet, R.V., Johnston, S.A., Hohmeier, H.E., Newgard, C.B., & Grayburn, P.A. (2006). Efficient gene delivery to pancreatic islets with ultrasonic microbubble destruction technology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(22), 8469-8474.

Child, S.Z., Hartman, C.L., Schery, L.A., & Cartensen, E.L. (1990). Lung damage from exposure to pulsed ultrasound. *Ultrasound Med Biol*, 16, 817-825.

Clapham, D.E., Runnels, L.W., & Strubing, C. (2001). The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci*, 2(6), 387-396.

Claycomb, W.C., Lanson, N.A., Jr., Stallworth, B.S., Egeland, D.B., Delcarpio, J.B., Bahinski, A., & Izzo, N.J., Jr. (1998). HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(6), 2979-2984.

Clayman, R.V. (1984). Techniques in percutaneous removal of renal calculi. Mechanical extraction and electrohydraulic lithotripsy. *Urology*, 23(5 Spec No), 11-19.

Coetzee, W.A., Amarillo, Y., Chiu, J., Chow, A., Lau, D., McCormack, T., Moreno, H., Nadal, M.S., Ozaita, A., Pountney, D., Saganich, M., Vega-Saenz de Miera, E., & Rudy, B. (1999). Molecular diversity of K+ channels. *Ann N Y Acad Sci*, 868, 233-285.

Colas, S., Paon, L., Denis, F., Prat, M., Louisot, P., Hoinard, C., Le Floch, O., Ogilvie, G., & Bougnoux, P. (2004). Enhanced radiosensitivity of rat autochthonous mammary tumors by dietary docosahexaenoic acid. *Int J Cancer*, 109(3), 449-454.

Colas, S., Maheo, K., Denis, F., Goupille, C., Hoinard, C., Champeroux, P., Tranquart, F., & Bougnoux, P. (2006). Sensitization by dietary docosahexaenoic acid of rat mammary carcinoma to anthracycline: a role for tumor vascularization. *Clin Cancer Res*, 12(19), 5879-5886.

Comerford, A., Plank, M.J., & David, T. (2008). Endothelial nitric oxide synthase and calcium production in arterial geometries: an integrated fluid mechanics/cell model. *J Biomech Eng*, 130(1), 011010.

Cox, D.H., Cui, J., & Aldrich, R.W. (1997). Allosteric gating of a large conductance Ca-activated K+ channel. *J Gen Physiol*, 110(3), 257-281.

Dauzat, M., Deklunder, G., Aldis, A., Rabinovitch, M., Burte, F., & Bret, P.M. (1994). Gas bubble emboli detected by transcranial Doppler sonography in patients with prosthetic heart valves: a preliminary report. *J Ultrasound Med*, 13(2), 129-135.

De Jong, N., Ten Cate, F.J., Lancee, C.T., Roeland, J.R., & Bom, N. (1991). Principles and recent developments in ultrasound contrast agents. *Ultrasonics*, 29, 324-330.

Delius, M., Denk, R., Berding, C., Liebich, H.G., Jordan, M., & Brendel, W. (1990). Biological effects of shock waves: cavitation by shock waves in piglet liver. *Ultrasound Med Biol*, 16(5), 467-472.

Delius, M., Jordan, M., Liebich, H.G., & Brendel, W. (1990). Biological effects of shock waves: effect of shock waves on the liver and gallbladder wall of dogs--administration rate dependence. *Ultrasound Med Biol*, 16(5), 459-466.

Deng, C.X., Sieling, F., Pan, H., & Cui, J. (2004). Ultrasound-induced cell membrane porosity. *Ultrasound Med Biol*, 30(4), 519-526.

Denis, F., Colas, S., Chami, L., Louisot, P., Le Floch, O., Tranquart, F., & Bougnoux, P. (2003). Changes in tumor vascularization after irradiation, anthracyclin, or antiangiogenic treatment in nitrosomethyl ureas-induced rat mammary tumors. *Clin Cancer Res*, 9(12), 4546-4552.

Dijkmans, P.A., Juffermans, L.J., Musters, R.J., van Wamel, A., ten Cate, F.J., van Gilst, W., Visser, C.A., de Jong, N., & Kamp, O. (2004). Microbubbles and ultrasound: from diagnosis to therapy. *Eur J Echocardiogr*, 5(4), 245-256.

Dimmeler, S., Assmus, B., Hermann, C., Haendeler, J., & Zeiher, A.M. (1998). Fluid shear stress stimulates phosphorylation of Akt in human endothelial cells: involvement in suppression of apoptosis. *Circ Res*, 83(3), 334-341.

Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., & Zeiher, A.M. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, 399(6736), 601-605.

Ding, J.P., Li, Z.W., & Lingle, C.J. (1998). Inactivating BK channels in rat chromaffin cells may arise from heteromultimeric assembly of distinct inactivation-competent and noninactivating subunits. *Biophys J*, 74(1), 268-289.

Doupnik, C.A. (2008). GPCR-Kir Channel Signaling Complexes: Defining Rules of Engagement. *J Recept Signal Transduct Res*, 28(1), 83-91.

Doupnik, C.A. (2008). GPCR-Kir channel signaling complexes: defining rules of engagement. *J Recept Signal Transduct Res*, 28(1-2), 83-91.

Drobinski, G., Brisset, D., Philippe, F., Kremer, D., Laurian, C., Montalescot, G., & Thomas, D. (1993). Effects of ultrasound energy on total peripheral artery occlusions: initial angiographic and angioscopic results. *J Interv Cardiol*, 6(2), 157-163.

Drobinski, G., Brisset, D., Philippe, F., Kremer, D., Laurian, C., Montalescot, G., & Thomas, D. (1993). [Effects of ultrasound energy on femoral artery occlusion. Angiographic and angioscopic results]. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 86(9), 1331-1336.

Drobinski, G., Philippe, F., Bucherer, C., Ankri, A., Lacombe, C., Kremer, D., Brisset, D., Montalescot, G., Thomas, D., & Grosgogeat, Y. (1993). [Effects of ultrasonic energy on blood clots in vitro]. *Arch Mal Coeur Vaiss*, 86(6), 915-920.

Droste, D.W., Hansberg, T., Kemeny, V., Hammel, D., Schulte-Altedorneburg, G., Nabavi, D.G., Kaps, M., Scheld, H.H., & Ringelstein, E.B. (1997). Oxygen inhalation can differentiate gaseous from nongaseous microemboli detected by transcranial Doppler ultrasound. *Stroke*, 28(12), 2453-2456.

Duan, J., Zhou, H., Chen, X., Pan, X., Yuan, X., Li, X., Xiao, Y., & Hu, X. (1998). A study on visual evoked potential to show the relationship between the eyes and the twelve regular channels. *J Tradit Chin Med*, 18(2), 140-145.

Duvshani-Eshet, M., & Machluf, M. (2005). Therapeutic ultrasound optimization for gene delivery: a key factor achieving nuclear DNA localization. *J Control Release*, 108(2-3), 513-528.

Duvshani-Eshet, M., Adam, D., & Machluf, M. (2006). The effects of albumin-coated microbubbles in DNA delivery mediated by therapeutic ultrasound. *J Control Release*, 112(2), 156-166.

Duvshani-Eshet, M., Baruch, L., Kesselman, E., Shimoni, E., & Machluf, M. (2006). Therapeutic ultrasound-mediated DNA to cell and nucleus: bioeffects revealed by confocal and atomic force microscopy. *Gene Ther*, 13(2), 163-172.

Duvshani-Eshet, M., Benny, O., Morgenstern, A., & Machluf, M. (2007). Therapeutic ultrasound facilitates antiangiogenic gene delivery and inhibits prostate tumor growth. *Mol Cancer Ther*, 6(8), 2371-2382.

Duvshani-Eshet, M., & Machluf, M. (2007). Efficient transfection of tumors facilitated by long-term therapeutic ultrasound in combination with contrast agent: from in vitro to in vivo setting. *Cancer Gene Ther*, 14(3), 306-315.

Duvshani-Eshet, M., Keren, H., Oz, S., Radzishevsky, I.S., Mor, A., & Machluf, M. (2008). Effect of peptides bearing nuclear localization signals on therapeutic ultrasound mediated gene delivery. *J Gene Med*.

Dworetzky, S.I., Boissard, C.G., Lum-Ragan, J.T., McKay, M.C., Post-Munson, D.J., Trojnacki, J.T., Chang, C.P., & Gribkoff, V.K. (1996). Phenotypic alteration of a human BK (hSlo) channel by hSlobeta subunit coexpression: changes in blocker sensitivity, activation/relaxation and inactivation kinetics, and protein kinase A modulation. *J Neurosci*, 16(15), 4543-4550.

Earley, S., Waldron, B.J., & Brayden, J.E. (2004). Critical role for transient receptor potential channel TRPM4 in myogenic constriction of cerebral arteries. *Circ Res*, 95(9), 922-929.

Ellegala, D.B., Leong-Poi, H., Carpenter, J.E., Klibanov, A.L., Kaul, S., Shaffrey, M.E., Sklenar, J., & Lindner, J.R. (2003). Imaging tumor angiogenesis with contrast ultrasound and microbubbles targeted to alpha(v)beta3. *Circulation*, 108(3), 336-341.

Endoh, M., Koibuchi, N., Sato, M., Morishita, R., Kanzaki, T., Murata, Y., & Kaneda, Y. (2002). Fetal gene transfer by intrauterine injection with microbubble-enhanced ultrasound. *Mol Ther*, 5(5 Pt 1), 501-508.

Everbach, E.C., & Francis, C.W. (2000). Cavitational mechanisms in ultrasound-accelerated thrombolysis at 1 MHz. *Ultrasound Med Biol*, 26(7), 1153-1160.

Fields, R.D., & Stevens-Graham, B. (2002). New insights into neuron-glia communication. *Science*, 298(5593), 556-562.

Fioretti, B., Castigli, E., Micheli, M.R., Bova, R., Sciaccaluga, M., Harper, A., Franciolini, F., & Catacuzzeno, L. (2006). Expression and modulation of the intermediate-conductance Ca2+-activated K+ channel in glioblastoma GL-15 cells. *Cell Physiol Biochem*, 18(1-3), 47-56.

Fioretti, B., Castigli, E., Micheli, M.R., Bova, R., Sciaccaluga, M., Harper, A., Franciolini, F., & Catacuzzeno, L. (2006). Expression and modulation of the intermediate-conductance Ca2+-activated K+ channel in glioblastoma GL-15 cells. *Cell Physiol Biochem*, 18(1-3), 47-56.

Fischell, T.A., Abbas, M.A., Grant, G.W., & Siegel, R.J. (1991). Ultrasonic energy. Effects on vascular function and integrity. *Circulation*, 84(4), 1783-1795.

Fischell, T.A., & Stadius, M.L. (1991). New technologies for the treatment of obstructive arterial disease. *Cathet Cardiovasc Diagn*, 22(3), 205-233.

Fischer, A., Ozbek, C., Bay, W., & Hamann, G.F. (1999). Cerebral microemboli during left heart catheterization. *Am Heart J*, 137(1), 162-168.

Frenkel, P.A., Chen, S., Thai, T., Shohet, R.V., & Grayburn, P.A. (2002). DNA-loaded albumin microbubbles enhance ultrasound-mediated transfection in vitro. *Ultrasound Med Biol*, 28(6), 817-822.

Frizzell, L.A., Miller, D.L., & Nyborg, W.L. (1986). Ultrasonically induced intravascular streaming and thrombus formation adjacent to a micropipette. *Ultrasound Med Biol*, 12(3), 217-221.

Fu, L., Cao, J.X., Xie, R.S., Li, J., Han, Y., Zhu, L.Q., & Dai, Y.N. (2007). The effect of streptomycin on stretch-induced electrophysiological changes of isolated acute myocardial infarcted hearts in rats. *Europace*, 9(8), 578-584.

Fuciarelli, A.F., Sisk, E.C., Thomas, R.M., & Miller, D.L. (1995). Induction of base damage in DNA solutions by ultrasonic cavitation. *Free Radic Biol Med*, 18(2), 231-238.

Gacetta, D.J., Cohen, M.J., Crummy, A.B., Joseph, D.B., Kuglitsch, M., & Mack, E. (1984). Ultrasonic lithotripsy of gallstones after cholecystostomy. *AJR Am J Roentgenol*, 143(5), 1088-1089.

Gaitan, G.F., & Crum, L.A. (1990). Observation of sonoluminescence from a single stable cavitation bubble in a water/glycerine misture. *eds. Frontier of non linear acoustics.*, 463-469.

Gannier, F., White, E., Lacampagne, A., Garnier, D., & Le Guennec, J.Y. (1994). Streptomycin reverses a large stretch induced increases in [Ca2+]i in isolated guinea pig ventricular myocytes. *Cardiovasc Res*, 28(8), 1193-1198.

Garaj-Vrhovac, V., Kopjar, N., Besendorfer, V., & Papes, D. (1999). Induction of micronuclei in human lymphocytes after occupational exposure to ultrasound. *Chemosphere*, 38(15), 3541-3553.

Georgiadis, D., Preiss, M., Lindner, A., Gybels, Y., Zierz, S., & Zerkowski, H.R. (1997). Doppler microembolic signals in children with prosthetic cardiac valves. *Stroke*, 28(7), 1328-1329.

Gerriets, T., Grossherr, M., Misfeld, M., Nees, U., Reusche, E., Stolz, E., Sievers, H.H., Kaps, M., & Kraatz, E.G. (2004). Strategies for the reduction of cerebral microembolism during transmyocardial laser revascularization. *Lasers Surg Med*, 34(5), 379-384.

Gessner, G., Schonherr, K., Soom, M., Hansel, A., Asim, M., Baniahmad, A., Derst, C., Hoshi, T., & Heinemann, S.H. (2005). BKCa channels activating at resting potential without calcium in LNCaP prostate cancer cells. *J Membr Biol*, 208(3), 229-240.

Giangiacomo, K.M., Garcia, M.L., & McManus, O.B. (1992). Mechanism of iberiotoxin block of the large-conductance calcium-activated potassium channel from bovine aortic smooth muscle. *Biochemistry*, 31(29), 6719-6727.

Giangiacomo, K.M., Sugg, E.E., Garcia-Calvo, M., Leonard, R.J., McManus, O.B., Kaczorowski, G.J., & Garcia, M.L. (1993). Synthetic charybdotoxin-iberiotoxin chimeric peptides define toxin binding sites on calcium-activated and voltage-dependent potassium channels. *Biochemistry*, 32(9), 2363-2370.

Giangiacomo, K.M., Kamassah, A., Harris, G., & McManus, O.B. (1998). Mechanism of maxi-K channel activation by dehydrosoyasaponin-I. *J Gen Physiol*, 112(4), 485-501.

Glagov, S. (1994). Intimal hyperplasia, vascular modeling, and the restenosis problem. *Circulation*, 89(6), 2888-2891.

Goldberg, S.N., Ahmed, M., Weinstein, J., Hare, B., Bloch, S., & Sheiman, R.G. (2002). Low-power transverse ultrasonic treatment of portal vein thrombosis in an animal model. *J Vasc Interv Radiol*, 13(9 Pt 1), 915-921.

Gottlieb, P., Folgering, J., Maroto, R., Raso, A., Wood, T.G., Kurosky, A., Bowman, C., Bichet, D., Patel, A., Sachs, F., Martinac, B., Hamill, O.P., & Honore, E. (2008). Revisiting TRPC1 and TRPC6 mechanosensitivity. *Pflugers Arch*, 455(6), 1097-1103.

Gottlieb, P., Folgering, J., Maroto, R., Raso, A., Wood, T.G., Kurosky, A., Bowman, C., Bichet, D., Patel, A., Sachs, F., Martinac, B., Hamill, O.P., & Honore, E. (2008). Revisiting TRPC1 and TRPC6 mechanosensitivity. *Pflugers Arch*, 455(6), 1097-1103.

Govers, R., & Rabelink, T.J. (2001). Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol*, 280(2), F193-206.

Gramiak, R., & Shah, P.M. (1968). Echocardiography of the aortic root. *Invest Radiol*, 3(5), 356-366.

Greenleaf, W.J., Bolander, M.E., Sarkar, G., Goldring, M.B., & Greenleaf, J.F. (1998). Artificial cavitation nuclei significantly enhance acoustically induced cell transfection. *Ultrasound Med Biol*, 24(4), 587-595.

Groh, W.J., Gibson, K.J., & Maylie, J.G. (1996). Hypotonic-induced stretch counteracts the efficacy of the class III antiarrhythmic agent E-4031 in guinea pig myocytes. *Cardiovasc Res*, 31(2), 237-245.

Gudi, S.R., Clark, C.B., & Frangos, J.A. (1996). Fluid flow rapidly activates G proteins in human endothelial cells. Involvement of G proteins in mechanochemical signal transduction. *Circ Res*, 79(4), 834-839.

Guharay, F., & Sachs, F. (1984). Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle. *J Physiol*, 352, 685-701.

Guzman, H.R., McNamara, A.J., Nguyen, D.X., & Prausnitz, M.R. (2003). Bioeffects caused by changes in acoustic cavitation bubble density and cell concentration: a unified explanation based on cell-to-bubble ratio and blast radius. *Ultrasound Med Biol*, 29(8), 1211-1222.

Haag, P., Frauscher, F., Gradl, J., Seitz, A., Schafer, G., Lindner, J.R., Klibanov, A.L., Bartsch, G., Klocker, H., & Eder, I.E. (2006). Microbubble-enhanced ultrasound to deliver an antisense oligodeoxynucleotide targeting the human androgen receptor into prostate tumours. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 102(1-5), 103-113.

Hagiwara, N., Masuda, H., Shoda, M., & Irisawa, H. (1992). Stretch-activated anion currents of rabbit cardiac myocytes. *J Physiol*, 456, 285-302.

Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch*, 391(2), 85-100.

Hamm, C.W., Gunn, J., & De Scheerder, I. (1994). On Behalf of the crusade investigators. Early results from themulti-center European registry of therapeutic ultrasonic coronary angioplasty. *Circulation*, 90, 332.

Hansen, D.E., Borganelli, M., Stacy, G.P., Jr., & Taylor, L.K. (1991). Dose-dependent inhibition of stretch-induced arrhythmias by gadolinium in isolated canine ventricles. Evidence for a unique mode of antiarrhythmic action. *Circ Res*, 69(3), 820-831.

Hansen, M., Boitano, S., Dirksen, E.R., & Sanderson, M.J. (1993). Intercellular calcium signaling induced by extracellular adenosine 5'-triphosphate and mechanical stimulation in airway epithelial cells. *J Cell Sci*, 106 (Pt 4), 995-1004.

Harpaz, D., Chen, X., Francis, C.W., & Meltzer, R.S. (1994). Ultrasound accelerates urokinase-induced thrombolysis and reperfusion. *Am Heart J*, 127, 1211-1219.

Hauswirth, O., & Singh, B.N. (1978). Ionic mechanisms in heart muscle in relation to the genesis and the pharmacological control of cardiac arrhythmias. *Pharmacol Rev*, 30(1), 5-63.

Hauswirth, O., & Singh, B.N. (1978). Ionic mechanisms in heart muscle in relation to the genesis and the pharmacological control of cardiac arrhythmias. *Pharmacol Rev*, 30(1), 5-63.

Hilal-Dandan, R., & Brunton, L.L. (1995). Transmembrane mechanochemical coupling in cardiac myocytes: novel activation of Gi by hyposmotic swelling. *Am J Physiol*, 269(3 Pt 2), H798-804.

Hill, C.R., Joshi, G.P., & Revell, S.H. (1972). A search for chromosome damage following exposure of Chinese hamster cells to high intensity, pulsed ultrasound. *Br J Radiol*, 45(533), 333-334.

Hodgson, W.J., & DelGuercio, L.R. (1984). Preliminary experience in liver surgery using the ultrasonic scalpel. *Surgery*, 95(2), 230-234.

Hoffmann, E.K., Lambert, I.H., & Simonsen, L.O. (1988). Mechanisms in volume regulation in Ehrlich ascites tumor cells. *Ren Physiol Biochem*, 11(3-5), 221-247.

Hoger, J.H., Ilyin, V.I., Forsyth, S., & Hoger, A. (2002). Shear stress regulates the endothelial Kir2.1 ion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(11), 7780-7785.

Hongo, K., Pascarel, C., Cazorla, O., Gannier, F., Le Guennec, J.Y., & White, E. (1997). Gadolinium blocks the delayed rectifier potassium current in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Exp Physiol*, 82(4), 647-656.

Honore, E. (2007). The neuronal background K2P channels: focus on TREK1. *Nat Rev Neurosci*, 8(4), 251-261.

Hsieh, J.C., Jurutka, P.W., Nakajima, S., Galligan, M.A., Haussler, C.A., Shimizu, Y., Shimizu, N., Whitfield, G.K., & Haussler, M.R. (1993). Phosphorylation of the human vitamin D receptor by protein kinase C. Biochemical and functional evaluation of the serine 51 recognition site. *J Biol Chem*, 268(20), 15118-15126.

Hsu, S.H., & Huang, T.B. (2004). Bioeffect of ultrasound on endothelial cells in vitro. *Biomol Eng*, 21(3-5), 99-104.

Huber, P.E., Mann, M.J., Melo, L.G., Ehsan, A., Kong, D., Zhang, L., Rezvani, M., Peschke, P., Jolesz, F., Dzau, V.J., & Hynynen, K. (2003). Focused ultrasound (HIFU) induces localized enhancement of reporter gene expression in rabbit carotid artery. *Gene Ther*, 10(18), 1600-1607.

Hughes, D.E., & Nyborg, W.L. (1962). Cell disruption by ultrasound. *Science*, 138, 108-114.

Ishida, T., Peterson, T.E., Kovach, N.L., & Berk, B.C. (1996). MAP kinase activation by flow in endothelial cells. Role of beta 1 integrins and tyrosine kinases. *Circ Res*, 79(2), 310-316.

Jackson, W.F., & Blair, K.L. (1998). Characterization and function of Ca(2+)-activated K+ channels in arteriolar muscle cells. *Am J Physiol*, 274(1 Pt 2), H27-34.

Jaffe, L.F. (2007). Stretch-activated calcium channels relay fast calcium waves propagated by calcium-induced calcium influx. *Biol Cell*, 99(3), 175-184.

Jaffe, L.F. (2007). Stretch-activated calcium channels relay fast calcium waves propagated by calcium-induced calcium influx. *Biol Cell*, 99(3), 175-184.

Jaffe, L.F. (2007). Stretch-activated calcium channels relay fast calcium waves propagated by calcium-induced calcium influx. *Biol Cell*, 99(3), 175-184.

Jo, H., Sipos, K., Go, Y.M., Law, R., Rong, J., & McDonald, J.M. (1997). Differential effect of shear stress on extracellular signal-regulated kinase and N-terminal Jun kinase in endothelial cells. Gi2- and Gbeta/gamma-dependent signaling pathways. *J Biol Chem*, 272(2), 1395-1401.

Juffermans, L.J., Dijkmans, P.A., Musters, R.J., Visser, C.A., & Kamp, O. (2006). Transient permeabilization of cell membranes by ultrasound-exposed microbubbles is related to formation of hydrogen peroxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291(4), H1595-1601.

Kaczorowski, G.J., Knaus, H.G., Leonard, R.J., McManus, O.B., & Garcia, M.L. (1996). High-conductance calcium-activated potassium channels; structure, pharmacology, and function. *J Bioenerg Biomembr*, 28(3), 255-267.

Kaps, M., Hansen, J., Weiher, M., Tiffert, K., Kayser, I., & Droste, D.W. (1997). Clinically silent microemboli in patients with artificial prosthetic aortic valves are predominantly gaseous and not solid. *Stroke*, 28(2), 322-325.

Kentish, J.C., Davey, R., & Largen, P. (1992). Isoprenaline reverses the slow force responses to a length change in isolated rabbit papillary muscle. *Pflugers Arch*, 421(5), 519-521.

Kim, D., & Fu, C. (1993). Activation of a nonselective cation channel by swelling in atrial cells. *J Membr Biol*, 135(1), 27-37.

Kim, H.J., Greenleaf, J.F., Kinnick, R.R., Bronk, J.T., & Bolander, M.E. (1996). Ultrasound-mediated transfection of mammalian cells. *Hum Gene Ther*, 7(11), 1339-1346.

Kirillov, S.K., Pliashkevich, A.V., & Filippova, N.A. (1990). [A method of prevention of vascular thrombosis using an electrolyte solution and ultrasonic cavitation]. *Klin Khir*(11), 74-75.

Kleyman, T.R., & Cragoe, E.J., Jr. (1988). Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport. *J Membr Biol*, 105(1), 1-21.

Klibanov, A.L., Hughes, M.S., Villanueva, F.S., Jankowski, R.J., Wagner, W.R., Wojdyla, J.K., Wible, J.H., & Brandenburger, G.H. (1999). Targeting and ultrasound imaging of microbubble-based contrast agents. *Magma*, 8(3), 177-184.

Knaus, H.G., Folander, K., Garcia-Calvo, M., Garcia, M.L., Kaczorowski, G.J., Smith, M., & Swanson, R. (1994). Primary sequence and immunological characterization of beta-subunit of high conductance Ca(2+)-activated K+ channel from smooth muscle. *J Biol Chem*, 269(25), 17274-17278.

Kondo, T., & Yoshii, G. (1985). Effect of intensity of 1.2 MHz ultrasound on change in DNA synthesis of irradiated mouse L cells. *Ultrasound Med Biol*, 11(1), 113-119.

Korosoglou, G., Behrens, S., Bekeredjian, R., Hardt, S., Hagenmueller, M., Dinjus, E., Bohm, K.J., Unger, E., Katus, H.A., & Kuecherer, H. (2006). The potential of a new stable ultrasound contrast agent for site-specific targeting. An in vitro experiment. *Ultrasound Med Biol*, 32(10), 1473-1478.

Korovkina, V.P., & England, S.K. (2002). Detection and implications of potassium channel alterations. *Vascul Pharmacol*, 38(1), 3-12.

Korovkina, V.P., & England, S.K. (2002). Molecular diversity of vascular potassium channel isoforms. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 29(4), 317-323.

Kuhlmann, C.R., Li, F., Ludders, D.W., Schaefer, C.A., Most, A.K., Backenkohler, U., Neumann, T., Tillmanns, H., Waldecker, B., Erdogan, A., & Wiecha, J. (2004). Dose-dependent activation of Ca2+-activated K+ channels by ethanol contributes to improved endothelial cell functions. *Alcohol Clin Exp Res*, 28(7), 1005-1011.

Kumon, R.E., Aehle, M., Sabens, D., Parikh, P., Kourennyi, D., & Deng, C.X. (2007). Ultrasound-induced calcium oscillations and waves in Chinese hamster ovary cells in the presence of microbubbles. *Biophys J*, 93(6), L29-31.

Lacampagne, A., Gannier, F., Argibay, J., Garnier, D., & Le Guennec, J.Y. (1994). The stretch-activated ion channel blocker gadolinium also blocks L-type calcium channels

in isolated ventricular myocytes of the guinea-pig. *Biochim Biophys Acta*, 1191(1), 205-208.

Lai, C.Y., Wu, C.H., Chen, C.C., & Li, P.C. (2006). Quantitative relations of acoustic inertial cavitation with sonoporation and cell viability. *Ultrasound Med Biol*, 32(12), 1931-1941.

Lansman, J.B., Hallam, T.J., & Rink, T.J. (1987). Single stretch-activated ion channels in vascular endothelial cells as mechanotransducers? *Nature*, 325(6107), 811-813.

Lanza, G.M., Wallace, K.D., Scott, M.J., Cacheris, W.P., Abendschein, D.R., Christy, D.H., Sharkey, A.M., Miller, J.G., Gaffney, P.J., & Wickline, S.A. (1996). A novel site-targeted ultrasonic contrast agent with broad biomedical application. *Circulation*, 94(12), 3334-3340.

Lassau, N., Bahurel-Barrera, H., & Poitevin, X. (2006). [Ultrasound imaging]. *J Radiol*, 87(7-8), 906-908.

Lassau, N., Chami, L., & Peronneau, P. (2006). [Current events about echography in 2006: position of the ultrasound functional imaging for the early evaluation of targeted therapeutics]. *Bull Cancer*, 93(12), 1207-1211.

Lassau, N., Chami, L., Benatsou, B., Peronneau, P., & Roche, A. (2007). Dynamic contrast-enhanced ultrasonography (DCE-US) with quantification of tumor perfusion: a new diagnostic tool to evaluate the early effects of antiangiogenic treatment. *Eur Radiol*, 17 Suppl 6, F89-98.

Lassau, N., Chami, L., & Peronneau, P. (2007). [Imaging of melanoma: accuracy of ultrasonography before and after contrast injection for diagnostic and early evaluation of treatments]. *Bull Cancer*, 94(1), 93-98.

Lassau, N., & Roche, A. (2007). [Imaging and angiogenesis: DCE-US (dynamic contrast enhanced-ultrasonography)]. *Bull Cancer*, 94 Spec No, S247-253.

Latorre, R., Oberhauser, A., Labarca, P., & Alvarez, O. (1989). Varieties of calcium-activated potassium channels. *Annu Rev Physiol*, 51, 385-399.

Lauer, C.G., Burge, R., Tang, D.B., Bass, B.G., Gomez, E.R., & Alving, B.M. (1992). Effect of ultrasound on tissue-type plasminogen activator-induced thrombolysis. *Circulation*, 86(4), 1257-1264.

Laumonnier, F., Roger, S., Guerin, P., Molinari, F., M'Rad, R., Cahard, D., Belhadj, A., Halayem, M., Persico, A.M., Elia, M., Romano, V., Holbert, S., Andres, C., Chaabouni, H., Colleaux, L., Constant, J., Le Guennec, J.Y., & Briault, S. (2006). Association of a functional deficit of the BKCa channel, a synaptic regulator of

neuronal excitability, with autism and mental retardation. *Am J Psychiatry*, 163(9), 1622-1629.

Lauritzen, I., Chemin, J., Honore, E., Jodar, M., Guy, N., Lazdunski, M., & Jane Patel, A. (2005). Cross-talk between the mechano-gated K2P channel TREK-1 and the actin cytoskeleton. *EMBO Rep*, 6(7), 642-648.

Layden, B.T., Saengsawang, W., Donati, R.J., Yang, S., Mulhearn, D.C., Johnson, M.E., & Rasenick, M.M. (2008). Structural model of a complex between the heterotrimeric G protein, Gsalpha, and tubulin. *Biochim Biophys Acta*, 1783(6), 964-973.

Layden, B.T., Saengsawang, W., Donati, R.J., Yang, S., Mulhearn, D.C., Johnson, M.E., & Rasenick, M.M. (2008). Structural model of a complex between the heterotrimeric G protein, Gsalpha, and tubulin. *Biochim Biophys Acta*, 1783(6), 964-973.

Le Guennec, J.Y., Lacampagne, A., & Garnier, D. (1996). Orthophosphate salts induce calcium current recovery from blockade by gadolinium in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Exp Physiol*, 81(4), 577-585.

Lee, S., Park, M., So, I., & Earm, Y.E. (1994). NADH and NAD modulates Ca(2+)-activated K+ channels in small pulmonary arterial smooth muscle cells of the rabbit. *Pflugers Arch*, 427(3-4), 378-380.

Lee, S.H., & Earm, Y.E. (1994). Caffeine induces periodic oscillations of Ca(2+)-activated K+ current in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Pflugers Arch*, 426(3-4), 189-198.

Lee, W.J., Chu, J.S., Huang, C.S., Chang, M.F., Chang, K.J., & Chen, K.M. (1996). Breast cancer vascularity: color Doppler sonography and histopathology study. *Breast Cancer Res Treat*, 37(3), 291-298.

Lehoux, S., & Tedgui, A. (1998). Signal transduction of mechanical stresses in the vascular wall. *Hypertension*, 32(2), 338-345.

Leighton, T.G. (1992). The acoustic bubble. *London: Academic Press*.

Levine, J.B., Morrow, E.M., Berdichevsky, Y., & Martin, G.E. (2007). BKca channel in autism and mental retardation. *Am J Psychiatry*, 164(6), 977-978; author reply 978-979.

Levy, D.J., Child, J.S., Rambod, E., Gharib, M., Milo, S., & Reisner, S.A. (1999). Microbubbles and mitral valve prostheses - transesophageal echocardiographic evaluation. *Eur J Ultrasound*, 10(1), 31-40.

Li, S.G., Lawler, J.E., Randall, D.C., & Brown, D.R. (1997). Sympathetic nervous activity and arterial pressure responses during rest and acute behavioral stress in SHR versus WKY rats. *J Auton Nerv Syst*, 62(3), 147-154.

Li, C., & Xu, Q. (2000). Mechanical stress-initiated signal transductions in vascular smooth muscle cells. *Cell Signal*, 12(7), 435-445.

Li, Y.S., Haga, J.H., & Chien, S. (2005). Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells. *J Biomech*, 38(10), 1949-1971.

Liao, X., Liu, J.M., Du, L., Tang, A., Shang, Y., Wang, S.Q., Chen, L.Y., & Chen, Q. (2006). Nitric oxide signaling in stretch-induced apoptosis of neonatal rat cardiomyocytes. *Faseb J*, 20(11), 1883-1885.

Liao, X., Liu, J.M., Du, L., Tang, A., Shang, Y., Wang, S.Q., Chen, L.Y., & Chen, Q. (2006). Nitric oxide signaling in stretch-induced apoptosis of neonatal rat cardiomyocytes. *Faseb J*, 20(11), 1883-1885.

Liao, X., Liu, J.M., Du, L., Tang, A., Shang, Y., Wang, S.Q., Chen, L.Y., & Chen, Q. (2006). Nitric oxide signaling in stretch-induced apoptosis of neonatal rat cardiomyocytes. *Faseb J*, 20(11), 1883-1885.

Liebeskind, D., Bases, R., Elequin, F., Neubort, S., Leifer, R., Goldberg, R., & Koenigsberg, M. (1979). Diagnostic ultrasound: effects on the DNA and growth patterns of animal cells. *Radiology*, 131(1), 177-184.

Lindner, J.R., & Kaul, S. (2001). Delivery of drugs with ultrasound. *Echocardiography*, 18(4), 329-337.

Lindner, J.R., Song, J., Christiansen, J., Klibanov, A.L., Xu, F., & Ley, K. (2001). Ultrasound assessment of inflammation and renal tissue injury with microbubbles targeted to P-selectin. *Circulation*, 104(17), 2107-2112.

Liu, Y., Yang, H., & Sakanishi, A. (2006). Ultrasound: mechanical gene transfer into plant cells by sonoporation. *Biotechnol Adv*, 24(1), 1-16.

Lo, H.C., Lin, S.C., & Wang, Y.M. (2004). The relationship among serum cytokines, chemokine, nitric oxide, and leptin in children with type 1 diabetes mellitus. *Clin Biochem*, 37(8), 666-672.

Lo, Y.C., Tsou, H.H., Lin, R.J., Wu, D.C., Wu, B.N., Lin, Y.T., & Chen, I.J. (2005). Endothelium-dependent and -independent vasorelaxation by a theophylline derivative MCPT: roles of cyclic nucleotides, potassium channel opening and phosphodiesterase inhibition. *Life Sci*, 76(8), 931-944.

Lu, Q.L., Liang, H.D., Partridge, T., & Blomley, M.J. (2003). Microbubble ultrasound improves the efficiency of gene transduction in skeletal muscle in vivo with reduced tissue damage. *Gene Ther*, 10(5), 396-405.

Luo, H., Nishioka, T., Fishbein, M.C., Cercek, B., Forrester, J.S., Kim, C.J., Berglund, H., & Siegel, R.J. (1996). Transcutaneous ultrasound augments lysis of arterial thrombi in vivo. *Circulation*, 94(4), 775-778.

Mallat, A. (1998). Hepatic stellate cells and intrahepatic modulation of portal pressure. *Digestion*, 59(4), 416-419.

Marthy, A. (1981). Ca-dependent K channels with large unitary conductance in chromaffin cell membranes. *Nature*, 291, 497-500.

Mason, T.J. (1991). Practical sonochemistry. User's guide to applications in chemistry and chemical engineering. *Ellis Horwood publisher*.

McCobb, D.P., Fowler, N.L., Featherstone, T., Lingle, C.J., Saito, M., Krause, J.E., & Salkoff, L. (1995). A human calcium-activated potassium channel gene expressed in vascular smooth muscle. *Am J Physiol*, 269(3 Pt 2), H767-777.

McKay, M.C., Dworetzky, S.I., Meanwell, N.A., Olesen, S.P., Reinhart, P.H., Levitan, I.B., Adelman, J.P., & Gribkoff, V.K. (1994). Opening of large-conductance calcium-activated potassium channels by the substituted benzimidazolone NS004. *J Neurophysiol*, 71(5), 1873-1882.

McManus, O.B., Harris, G.H., Giangiacomo, K.M., Feigenbaum, P., Reuben, J.P., Addy, M.E., Burka, J.F., Kaczorowski, G.J., & Garcia, M.L. (1993). An activator of calcium-dependent potassium channels isolated from a medicinal herb. *Biochemistry*, 32(24), 6128-6133.

Meera, P., Wallner, M., Song, M., & Toro, L. (1997). Large conductance voltage- and calcium-dependent K+ channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(25), 14066-14071.

Mehier-Humbert, S., Bettinger, T., Yan, F., & Guy, R.H. (2005). Plasma membrane poration induced by ultrasound exposure: implication for drug delivery. *J Control Release*, 104(1), 213-222.

Mehier-Humbert, S., Bettinger, T., Yan, F., & Guy, R.H. (2005). Ultrasound-mediated gene delivery: kinetics of plasmid internalization and gene expression. *J Control Release*, 104(1), 203-211.

Mehier-Humbert, S., & Guy, R.H. (2005). Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells. *Adv Drug Deliv Rev*, 57(5), 733-753.

Mehier-Humbert, S., Yan, F., Frinking, P., Schneider, M., Guy, R.H., & Bettinger, T. (2007). Ultrasound-mediated gene delivery: influence of contrast agent on transfection. *Bioconjug Chem*, 18(3), 652-662.

Meltzer, R.S., Serruys, P.W., McGhie, J., Verbaan, N., & Roelandt, J. (1980). Pulmonary wedge injections yielding left-sided echocardiographic contrast. *Br Heart J*, 44(4), 390-394.

Meltzer, R.S., Porder, J.B., & Border, K. (1996). Ultrasound bioeffects mechanisms and safety. *eds Ultrasound angioplasty.*, 55-68.

Miller, D.L., Thomas, R.M., & Frazier, M.E. (1991). Single strand breaks in CHO cell DNA induced by ultrasonic cavitation in vitro. *Ultrasound Med Biol*, 17(4), 401-406.

Miller, D.L., Thomas, R.M., & Frazier, M.E. (1991). Ultrasonic cavitation indirectly induces single strand breaks in DNA of viable cells in vitro by the action of residual hydrogen peroxide. *Ultrasound Med Biol*, 17(7), 729-735.

Miller, D.L., & Thomas, R.M. (1996). The role of cavitation in the induction of cellular DNA damage by ultrasound and lithotripter shock waves in vitro. *Ultrasound Med Biol*, 22(5), 681-687.

Miller, M.W., Miller, D.L., & Brayman, A.A. (1996). A review of in vitro bioeffects of inertial ultrasonic cavitation from a mechanistic perspective. *Ultrasound Med Biol*, 22(9), 1131-1154.

Miller, D.L., & Quddus, J. (2001). Lysis and sonoporation of epidermoid and phagocytic monolayer cells by diagnostic ultrasound activation of contrast agent gas bodies. *Ultrasound Med Biol*, 27(8), 1107-1113.

Miller, D.L., & Song, J. (2003). Tumor growth reduction and DNA transfer by cavitation-enhanced high-intensity focused ultrasound in vivo. *Ultrasound Med Biol*, 29(6), 887-893.

Miller, D.L. (2008). Safety assurance in obstetrical ultrasound. *Semin Ultrasound CT MR*, 29(2), 156-164.

Miura, S., Tachibana, K., Okamoto, T., & Saku, K. (2002). In vitro transfer of antisense oligodeoxynucleotides into coronary endothelial cells by ultrasound. *Biochem Biophys Res Commun*, 298(4), 587-590.

Monteverde Grether, C., Velez y Tello de Meneses, M., de la Llata Romero, M., Valero, G., Ambrosio, E., Jauregui Aguilar, R., & Nava Lopez, G. (1990). [Transluminal coronary angioplasty using ultrasound]. *Arch Inst Cardiol Mex*, 60(1), 27-38.

Morris, C.E., & Sigurdson, W.J. (1989). Stretch-inactivated ion channels coexist with stretch-activated ion channels. *Science*, 243(4892), 807-809.

Morris, C.E. (1990). Mechanosensitive ion channels. *J Membr Biol*, 113(2), 93-107.

Mukherjee, D., Wong, J., Griffin, B., Ellis, S.G., Porter, T., Sen, S., & Thomas, J.D. (2000). Ten-fold augmentation of endothelial uptake of vascular endothelial growth factor with ultrasound after systemic administration. *J Am Coll Cardiol*, 35(6), 1678-1686.

Mukhopadhyay, R., Theriault, R.L., & Price, J.E. (1999). Increased levels of alpha6 integrins are associated with the metastatic phenotype of human breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis*, 17(4), 325-332.

Na, S., Collin, O., Chowdhury, F., Tay, B., Ouyang, M., Wang, Y., & Wang, N. (2008). Rapid signal transduction in living cells is a unique feature of mechanotransduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(18), 6626-6631.

Neher, E., & Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, 260(5554), 799-802.

Nehrke, K., Quinn, C.C., & Begenisich, T. (2003). Molecular identification of Ca2+-activated K+ channels in parotid acinar cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 284(2), C535-546.

Nelson, M.T., Patlak, J.B., Worley, J.F., & Standen, N.B. (1990). Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am J Physiol*, 259(1 Pt 1), C3-18.

Nelson, M.T. (1992). Regulation of arterial tone by potassium channels. *Jpn J Pharmacol*, 58 Suppl 2, 238P-242P.

Nelson, M.T., & Brayden, J.E. (1993). Regulation of arterial tone by calcium-dependent K+ channels and ATP-sensitive K+ channels. *Cardiovasc Drugs Ther*, 7 Suppl 3, 605-610.

Nelson, M.T., Cheng, H., Rubart, M., Santana, L.F., Bonev, A.D., Knot, H.J., & Lederer, W.J. (1995). Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science*, 270(5236), 633-637.

Nelson, M.T., & Quayle, J.M. (1995). Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol*, 268(4 Pt 1), C799-822.

Ng, K.Y., & Liu, Y. (2002). Therapeutic ultrasound: its application in drug delivery. *Med Res Rev*, 22(2), 204-223.

Nicoll, R.A. (1988). The coupling of neurotransmitter receptors to ion channels in the brain. *Science*, 241(4865), 545-551.

Oancea, E., Wolfe, J.T., & Clapham, D.E. (2006). Functional TRPM7 channels accumulate at the plasma membrane in response to fluid flow. *Circ Res*, 98(2), 245-253.

O'Brien, W.D., Jr., & Zachary, J.F. (1994). Mouse lung damage from exposure to 30 kHz ultrasound. *Ultrasound Med Biol*, 20(3), 287-297.

Ohmori, H. (1984). Studies of ionic currents in the isolated vestibular hair cell of the chick. *J Physiol*, 350, 561-581.

Ohno, M., Gibbons, G.H., Dzau, V.J., & Cooke, J.P. (1993). Shear stress elevates endothelial cGMP. Role of a potassium channel and G protein coupling. *Circulation*, 88(1), 193-197.

Ophir, J., & Parker, K.J. (1989). Contrast agents in diagnostic ultrasound. *Ultrasound Med Biol*, 15(4), 319-333.

Opie, L.H. (1998). The Heart : physiology from cell to circulation: Lippincott-Raven.

Pan, H., Zhou, Y., Izadnegahdar, O., Cui, J., & Deng, C.X. (2005). Study of sonoporation dynamics affected by ultrasound duty cycle. *Ultrasound Med Biol*, 31(6), 849-856.

Parsons, J.T. (2003). Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci*, 116(Pt 8), 1409-1416.

Parsons, J.T. (2003). Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci*, 116(Pt 8), 1409-1416.

Peng, W., Hoidal, J.R., & Farrukh, I.S. (1996). Regulation of Ca(2+)-activated K+ channels in pulmonary vascular smooth muscle cells: role of nitric oxide. *J Appl Physiol*, 81(3), 1264-1272.

Peng, W., Karwande, S.V., Hoidal, J.R., & Farrukh, I.S. (1996). Potassium currents in cultured human pulmonary arterial smooth muscle cells. *J Appl Physiol*, 80(4), 1187-1196.

Philippe, F., Drobinski, G., Bucherer, C., Ankri, A., Lacombe, C., Kremer, D., Brisset, D., & Montalescot, G. (1993). Effects of ultrasound energy on thrombi in vitro. *Cathet Cardiovasc Diagn*, 28(2), 173-178.

Philippe, F., Drobinski, G., Bucherer, C., Ankri, A., Lacombe, C., Kremer, D., Brisset, D., & Montalescot, G. (1993). Effects of ultrasound energy on thrombi in vitro. *Cathet Cardiovasc Diagn*, 28(2), 173-178.

Piskorowski, R., & Aldrich, R.W. (2002). Calcium activation of BK(Ca) potassium channels lacking the calcium bowl and RCK domains. *Nature*, 420(6915), 499-502.

Piskorowski, R.A., & Aldrich, R.W. (2006). Relationship between pore occupancy and gating in BK potassium channels. *J Gen Physiol*, 127(5), 557-576.

Pislaru, S.V., Pislaru, C., Kinnick, R.R., Singh, R., Gulati, R., Greenleaf, J.F., & Simari, R.D. (2003). Optimization of ultrasound-mediated gene transfer: comparison of contrast agents and ultrasound modalities. *Eur Heart J*, 24(18), 1690-1698.

Plesset, M.S., & Chapman, R.B. (1971). Collapse of an initially spherical vapour cavity in the neightborhood of a solid boundary. *J Fluid Mech*, 47, 283-290.

Pleumsamran, A., & Kim, D. (1995). Membrane stretch augments the cardiac muscarinic K+ channel activity. *J Membr Biol*, 148(3), 287-297.

Porter, T.R., LeVeen, R.F., Fox, R., Kricsfeld, A., & Xie, F. (1996). Thrombolytic enhancement with perfluorocarbon-exposed sonicated dextrose albumin microbubbles. *Am Heart J*, 132(5), 964-968.

Porter, T.R., Hiser, W.L., Kricsfeld, D., Deligonul, U., Xie, F., Iversen, P., & Radio, S. (2001). Inhibition of carotid artery neointimal formation with intravenous microbubbles. *Ultrasound Med Biol*, 27(2), 259-265.

Postema, M., van Wamel, A., ten Cate, F.J., & de Jong, N. (2005). High-speed photography during ultrasound illustrates potential therapeutic applications of microbubbles. *Med Phys*, 32(12), 3707-3711.

Qi, Z., Chi, S., Su, X., Naruse, K., & Sokabe, M. (2005). Activation of a mechanosensitive BK channel by membrane stress created with amphipaths. *Mol Membr Biol*, 22(6), 519-527.

Ramnarine, K.V., Nassiri, D.K., McCarthy, A., & Brown, N.A. (1998). Effects of pulsed ultrasound on embryonic development: an in vitro study. *Ultrasound Med Biol*, 24(4), 575-585.

Ramsey, I.S., Delling, M., & Clapham, D.E. (2006). An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol*, 68, 619-647.

Rasenick, M.M., Stein, P.J., & Bitensky, M.W. (1981). The regulatory subunit of adenylate cyclase interacts with cytoskeletal components. *Nature*, 294(5841), 560-562.

Raven, P.H., Johnson, G.B., Losos, J.B., & Singer, S.S. (2007). *Biologie*

Raz, D., Zaretsky, U., Einav, S., & Elad, D. (2005). Cellular alterations in cultured endothelial cells exposed to therapeutic ultrasound irradiation. *Endothelium*, 12(4), 201-213.

Rees, M., Elmslie, F., Whitehouse, W., Sundqvist, A., & Gardiner, M. (1995). Analysis of a human brain voltage-gated potassium channel gene, KCNA6 (HBK2), in patients with juvenile myoclonic epilepsy. *Neuropediatrics*, 26(6), 333-334.

Rees, S.A., & Curtis, M.J. (1995). Further investigations into the mechanism of antifibrillatory action of the specific IK1 blocker, RP58866, assessed using the rat dual coronary perfusion model. *J Mol Cell Cardiol*, 27(12), 2595-2606.

Rees, S.A., & Curtis, M.J. (1995). Pharmacological analysis in rat of the role of the ATP-sensitive potassium channel as a potential target for antifibrillatory intervention in acute myocardial ischaemia. *J Cardiovasc Pharmacol*, 26(2), 280-288.

Rees, S.A., Vandenberg, J.I., Wright, A.R., Yoshida, A., & Powell, T. (1995). Cell swelling has differential effects on the rapid and slow components of delayed rectifier potassium current in guinea pig cardiac myocytes. *J Gen Physiol*, 106(6), 1151-1170.

Riesz, P., & Kondo, T. (1992). Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications. *Free Radic Biol Med*, 13(3), 247-270.

Ringer, S. (1883). A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart. *J Physiol*, 4(1), 29-42 23.

Robertson, B.E., Schubert, R., Hescheler, J., & Nelson, M.T. (1993). cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol*, 265(1 Pt 1), C299-303.

Rosenschein, U., Rozenszajn, L.A., Kraus, L., Marboe, C.C., Watkins, J.F., Rose, E.A., David, D., Cannon, P.J., & Weinstein, J.S. (1991). Ultrasonic angioplasty in totally occluded peripheral arteries. Initial clinical, histological, and angiographic results. *Circulation*, 83(6), 1976-1986.

Rosenschein, U., Frimerman, A., Laniado, S., & Miller, H.I. (1994). Study of the mechanism of ultrasound angioplasty from human thrombi and bovine aorta. *Am J Cardiol*, 74(12), 1263-1266.

Rosenschein, U., & Budde-Schwartzman, B. (1997). [Ultrasound coronary angioplasty: state of the art and new clinical aspects]. *Herz*, 22(6), 308-317.

Rosenschein, U., Roth, A., Rassin, T., Basan, S., Laniado, S., & Miller, H.I. (1997). Analysis of coronary ultrasound thrombolysis endpoints in acute myocardial infarction (ACUTE trial). Results of the feasibility phase. *Circulation*, 95(6), 1411-1416.

Rosenschein, U., Furman, V., Kerner, E., Fabian, I., Bernheim, J., & Eshel, Y. (2000). Ultrasound imaging-guided noninvasive ultrasound thrombolysis: preclinical results. *Circulation*, 102(2), 238-245.

Rota, C., Raeman, C.H., Child, S.Z., & Dalecki, D. (2006). Detection of acoustic cavitation in the heart with microbubble contrast agents in vivo: a mechanism for ultrasound-induced arrhythmias. *J Acoust Soc Am*, 120(5 Pt 1), 2958-2964.

Sasaki, T., & Gallacher, D.V. (1992). The ATP-induced inward current in mouse lacrimal acinar cells is potentiated by isoprenaline and GTP. *J Physiol*, 447, 103-118.

Satya-Prakash, K.L., Pathak, S., Hsu, T.C., Olive, M., & Cailleau, R. (1981). Cytogenetic analysis on eight human breast tumor cell lines: high frequencies of 1q, 11q and HeLa-like marker chromosomes. *Cancer Genet Cytogenet*, 3(1), 61-73.

Sboros, V. (2008). Response of contrast agents to ultrasound. *Adv Drug Deliv Rev*.

Schaff, U.Y., Yamayoshi, I., Tse, T., Griffin, D., Kibathi, L., & Simon, S.I. (2008). Calcium flux in neutrophils synchronizes beta2 integrin adhesive and signaling events that guide inflammatory recruitment. *Ann Biomed Eng*, 36(4), 632-646.

Schneider, K.T., Dumler, E.A., & Lippert, A. (1993). [Survey of the availability and utilization of Doppler ultrasound in German-speaking areas]. *Geburtshilfe Frauenheilkd*, 53(1), 56-60.

Schreiber, M., & Salkoff, L. (1997). A novel calcium-sensing domain in the BK channel. *Biophys J*, 73(3), 1355-1363.

Schreiber, M., Wei, A., Yuan, A., Gaut, J., Saito, M., & Salkoff, L. (1998). Slo3, a novel pH-sensitive K+ channel from mammalian spermatocytes. *J Biol Chem*, 273(6), 3509-3516.

Schreiber, M., Yuan, A., & Salkoff, L. (1999). Transplantable sites confer calcium sensitivity to BK channels. *Nat Neurosci*, 2(5), 416-421.

Schubert, R., & Nelson, M.T. (2001). Protein kinases: tuners of the BKCa channel in smooth muscle. *Trends Pharmacol Sci*, 22(10), 505-512.

Schumann, P.A., Christiansen, J.P., Quigley, R.M., McCreery, T.P., Sweitzer, R.H., Unger, E.C., Lindner, J.R., & Matsunaga, T.O. (2002). Targeted-microbubble binding selectively to GPIIb IIIa receptors of platelet thrombi. *Invest Radiol*, 37(11), 587-593.

Shaw, A., & Xu, Q. (2003). Biomechanical stress-induced signaling in smooth muscle cells: an update. *Curr Vasc Pharmacol*, 1(1), 41-58.

Shen, K.Z., Lagrutta, A., Davies, N.W., Standen, N.B., Adelman, J.P., & North, R.A. (1994). Tetraethylammonium block of Slowpoke calcium-activated potassium channels expressed in Xenopus oocytes: evidence for tetrameric channel formation. *Pflugers Arch*, 426(5), 440-445.

Shepard, T.H., & Spiers, P.S. (1991). Comments on "Effects of pulsed ultrasound and temperature on the development of rat embryos in culture". *Teratology*, 43(6), 547, 549.

Shi, J., & Cui, J. (2001). Intracellular Mg(2+) enhances the function of BK-type Ca(2+)-activated K(+) channels. *J Gen Physiol*, 118(5), 589-606.

Shi, J., & Cui, J. (2001). Intracellular Mg(2+) enhances the function of BK-type Ca(2+)-activated K(+) channels. *J Gen Physiol*, 118(5), 589-606.

Shimomura, O., Johnson, F.H., & Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea. *J Cell Comp Physiol*, 59, 223-239.

Shimomura, O., Johnson, F.H., & Saiga, Y. (1963). Microdetermination of calcium by aequorin luminescence. *Sciences*, 140, 1339-1340.

Shimomura, O., & Johnson, F.H. (1972). Structure of the light-emitting moiety of aequorin. *Biochemistry*, 11(9), 1602-1608.

Shimomura, O., & Johnson, F.H. (1975). Chemical nature of bioluminescence systems in coelenterates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72(4), 1546-1549.

Shimomura, O., & Johnson, F.H. (1975). Regeneration of the photoprotein aequorin. *Nature*, 256(5514), 236-238.

Shimomura, O. (1979). Structure of the chromophore of Aequorea green fluorescent protein. *FEBS Lett.*, 104, 220-222.

Shimomura, O. (1986). Isolation and properties of various molecular forms of aequorin. *Biochem. J.*, 234, 271-277.

Shimomura, O., Musicki, B., & Kishi, Y. (1988). Semi-synthetic aequorin. An improved tool for the measurement of calcium ion concentration. *Biochem J*, 251(2), 405-410.

Shimomura, O., Inouye, S., Musicki, B., & Kishi, Y. (1990). Recombinant aequorin and recombinant semi-synthetic aequorins. Cellular Ca2+ ion indicators. *Biochem J*, 270(2), 309-312.

Shimomura, O., Kishi, Y., & Inouye, S. (1993). The relative rate of aequorin regeneration from apoaequorin and coelenterazine analogues. *Biochem J*, 296 (Pt 3), 549-551.

Shimomura, O., Musicki, B., Kishi, Y., & Inouye, S. (1993). Light-emitting properties of recombinant semi-synthetic aequorins and recombinant fluorescein-conjugated aequorin for measuring cellular calcium. *Cell Calcium*, 14(5), 373-378.

Shimomura, O., & Teranishi, K. (2000). Light-emitters involved in the luminescence of coelenterazine. *Luminescence*, 15(1), 51-58.

Shipston, M.J., & Armstrong, D.L. (1996). Activation of protein kinase C inhibits calcium-activated potassium channels in rat pituitary tumour cells. *J Physiol*, 493 (Pt 3), 665-672.

Shipston, M.J., Kelly, J.S., & Antoni, F.A. (1996). Glucocorticoids block protein kinase A inhibition of calcium-activated potassium channels. *J Biol Chem*, 271(16), 9197-9200.

Shipston, M.J., Duncan, R.R., Clark, A.G., Antoni, F.A., & Tian, L. (1999). Molecular components of large conductance calcium-activated potassium (BK) channels in mouse pituitary corticotropes. *Mol Endocrinol*, 13(10), 1728-1737.

Shohet, R.V., Chen, S., Zhou, Y.T., Wang, Z., Meidell, R.S., Unger, R.H., & Grayburn, P.A. (2000). Echocardiographic destruction of albumin microbubbles directs gene delivery to the myocardium. *Circulation*, 101(22), 2554-2556.

Shu, M.C., Gross, J.M., & Johnson, K.M. (1995). Can cavitation bubbles generated by mechanical heart valves be detected by transcranial Doppler? *J Heart Valve Dis*, 4(5), 542-552; discussion 552.

Siegel, R.J., Gunn, J., De Scheerder, I., & Ahsan, A. (1994). Use of therapeutic ultrasound in percutaneous coronary angioplasty. Experimental in vitro study and initial clinical experience. *Circulation*, 1587-92.

Sigurdson, W.J., & Morris, C.E. (1989). Stretch-activated ion channels in growth cones of snail neurons. *J Neurosci*, 9(8), 2801-2808.

Sigurdson, W., Ruknudin, A., & Sachs, F. (1992). Calcium imaging of mechanically induced fluxes in tissue-cultured chick heart: role of stretch-activated ion channels. *Am J Physiol*, 262(4 Pt 2), H1110-1115.

Silacci, P., Desgeorges, A., Mazzolai, L., Chambaz, C., & Hayoz, D. (2001). Flow pulsatility is a critical determinant of oxidative stress in endothelial cells. *Hypertension*, 38(5), 1162-1166.

Singh, D., Loven, D.P., & Stevens, R.H. (1982). Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate dependent and independent protein kinase activities in 1,2-dimethylhydrazine induced rat colon cancer. *Chem Biol Interact*, 40(2), 169-175.

Singh, J. (1982). Stretch stimulates cyclic nucleotide metabolism in the isolated frog ventricle. *Pflugers Arch*, 395(2), 162-164.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., & Schneider, E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, 175(1), 184-191.

Siu, T., Rohling, R., & Chiao, M. (2007). Microdevice-based delivery of gene products using sonoporation. *Biomed Microdevices*, 9(3), 295-300.

Sokabe, M., Naruse, K., & Qiong-Yao, T. (2004). [A new mechanosensitive channel SAKCA and a new MS channel blocker GsTMx-4]. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, 124(5), 301-310.

Song, J., Tata, D., Li, L., Taylor, J., Bao, S., & Miller, D.L. (2002). Combined shock-wave and immunogene therapy of mouse melanoma and renal carcinoma tumors. *Ultrasound Med Biol*, 28(7), 957-964.

Sorata, Y., Inoue, H., Kinoshita, T., Uchino, K., Kimura, M., & Ishii, K. (1984). [A case of Cornelia de Lange syndrome]. *Shoni Shikagaku Zasshi*, 22(4), 889-897.

Sorata, Y., Takahama, U., & Kimura, M. (1984). Protective effect of quercetin and rutin on photosensitized lysis of human erythrocytes in the presence of hematoporphyrin. *Biochim Biophys Acta*, 799(3), 313-317.

Sorata, Y., Uchikanobir, M., Oritaka, H., & Kimura, M. (1985). [Antioxidative functions of flavonols--protective effects on the photosensitized hemolysis of human erythrocytes]. *Shoni Shikagaku Zasshi*, 23(1), 26-32.

Sorata, Y., Takahama, U., & Kimura, M. (1988). Cooperation of quercetin with ascorbate in the protection of photosensitized lysis of human erythrocytes in the presence of hematoporphyrin. *Photochem Photobiol*, 48(2), 195-199.

Sorota, S. (1995). Tyrosine protein kinase inhibitors prevent activation of cardiac swelling-induced chloride current. *Pflugers Arch*, 431(2), 178-185.

Spassova, M.A., Hewavitharana, T., Xu, W., Soboloff, J., & Gill, D.L. (2006). A common mechanism underlies stretch activation and receptor activation of TRPC6 channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(44), 16586-16591.

Spassova, M.A., Hewavitharana, T., Xu, W., Soboloff, J., & Gill, D.L. (2006). A common mechanism underlies stretch activation and receptor activation of TRPC6 channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(44), 16586-16591.

Steffen, W., & Siegel, R.J. (1993). Ultrasound angioplasty--a review. *J Interv Cardiol*, 6(1), 77-88.

Strobaek, D., Christophersen, P., Dissing, S., & Olesen, S.P. (1996). ATP activates K and Cl channels via purinoceptor-mediated release of Ca2+ in human coronary artery smooth muscle. *Am J Physiol*, 271(5 Pt 1), C1463-1471.

Strobaek, D., Christophersen, P., Holm, N.R., Moldt, P., Ahring, P.K., Johansen, T.E., & Olesen, S.P. (1996). Modulation of the Ca(2+)-dependent K+ channel, hslo, by the substituted diphenylurea NS 1608, paxilline and internal Ca2+. *Neuropharmacology*, 35(7), 903-914.

Stumpff, U., Pohlman, R., & Trubestein, G. (1975). A new method to cure thrombi by ultrasonic cavitation. *PC Science And Technology Press Ltd.*, 273-275.

Sun, Z., Martinez-Lemus, L.A., Hill, M.A., & Meininger, G. (2008). Extracellular Matrix Specific Focal Adhesions in Vascular Smooth Muscle Produce Mechanically Active Adhesion Sites. *Am J Physiol Cell Physiol*.

Sundaram, J., Mellein, B.R., & Mitragotri, S. (2003). An experimental and theoretical analysis of ultrasound-induced permeabilization of cell membranes. *Biophys J*, 84(5), 3087-3101.

Suzuki, R., Takizawa, T., Negishi, Y., Hagisawa, K., Tanaka, K., Sawamura, K., Utoguchi, N., Nishioka, T., & Maruyama, K. (2007). Gene delivery by combination of novel liposomal bubbles with perfluoropropane and ultrasound. *J Control Release*, 117(1), 130-136.

Suzuki, R., Takizawa, T., Negishi, Y., Utoguchi, N., & Maruyama, K. (2007). Effective gene delivery with liposomal bubbles and ultrasound as novel non-viral system. *J Drug Target*, 15(7-8), 531-537.

Suzuki, R., Takizawa, T., Negishi, Y., Utoguchi, N., & Maruyama, K. (2008). Effective gene delivery with novel liposomal bubbles and ultrasonic destruction technology. *Int J Pharm*, 354(1-2), 49-55.

Tachibana, K., & Tachibana, S. (1995). Albumin microbubble echo-contrast material as an enhancer for ultrasound accelerated thrombolysis. *Circulation*, 92(5), 1148-1150.

Tachibana, K., & Tachibana, S. (1995). Albumin microbubble echo-contrast material as an enhancer for ultrasound accelerated thrombolysis. *Circulation*, 92(5), 1148-1150.

Tanabe, Y., Saito, M., Ueno, A., Nakamura, M., Takeishi, K., & Nakayama, K. (2000). Mechanical stretch augments PDGF receptor beta expression and protein tyrosine phosphorylation in pulmonary artery tissue and smooth muscle cells. *Mol Cell Biochem*, 215(1-2), 103-113.

Tanaka, Y., Meera, P., Song, M., Knaus, H.G., & Toro, L. (1997). Molecular constituents of maxi KCa channels in human coronary smooth muscle: predominant alpha + beta subunit complexes. *J Physiol*, 502 (Pt 3), 545-557.

Taniyama, Y., Tachibana, K., Hiraoka, K., Aoki, M., Yamamoto, S., Matsumoto, K., Nakamura, T., Ogihara, T., Kaneda, Y., & Morishita, R. (2002). Development of safe and efficient novel nonviral gene transfer using ultrasound: enhancement of transfection efficiency of naked plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Ther*, 9(6), 372-380.

Taniyama, Y., Tachibana, K., Hiraoka, K., Namba, T., Yamasaki, K., Hashiya, N., Aoki, M., Ogihara, T., Yasufumi, K., & Morishita, R. (2002). Local delivery of plasmid DNA into rat carotid artery using ultrasound. *Circulation*, 105(10), 1233-1239.

Tata, D.B., Dunn, F., & Tindall, D.J. (1997). Selective clinical ultrasound signals mediate differential gene transfer and expression in two human prostate cancer cell lines: LnCap and PC-3. *Biochem Biophys Res Commun*, 234(1), 64-67.

ter Haar, G. (1996). Commentary: safety of diagnostic ultrasound. *Br J Radiol*, 69(828), 1083-1085.

ter Haar, G. (2007). Therapeutic applications of ultrasound. *Prog Biophys Mol Biol*, 93(1-3), 111-129.

Terzic, A., & Kurachi, Y. (1996). Actin microfilament disrupters enhance K(ATP) channel opening in patches from guinea-pig cardiomyocytes. *J Physiol*, 492 (Pt 2), 395-404.

Teupe, C., Richter, S., Fisslthaler, B., Randriamboavonjy, V., Ihling, C., Fleming, I., Busse, R., Zeiher, A.M., & Dimmeler, S. (2002). Vascular gene transfer of phosphomimetic endothelial nitric oxide synthase (S1177D) using ultrasound-enhanced destruction of plasmid-loaded microbubbles improves vasoreactivity. *Circulation*, 105(9), 1104-1109.

Thompson, E.W., Paik, S., Brunner, N., Sommers, C.L., Zugmaier, G., Clarke, R., Shima, T.B., Torri, J., Donahue, S., Lippman, M.E., & et al. (1992). Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines. *J Cell Physiol*, 150(3), 534-544.

Tian, L., Knaus, H.G., & Shipston, M.J. (1998). Glucocorticoid regulation of calcium-activated potassium channels mediated by serine/threonine protein phosphatase. *J Biol Chem*, 273(22), 13531-13536.

Toro, L., Wallner, M., Meera, P., & Tanaka, Y. (1998). Maxi-K(Ca), a Unique Member of the Voltage-Gated K Channel Superfamily. *News Physiol Sci*, 13, 112-117.

Tranquart, F., Correas, J.M., & Bouakaz, A. (2007). *Echographie de contraste : méthodologie et applications cliniques.* Paris

Tronc, F., Wassef, M., Esposito, B., Henrion, D., Glagov, S., & Tedgui, A. (1996). Role of NO in flow-induced remodeling of the rabbit common carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 16(10), 1256-1262.

Tronc, F., Wassef, M., Esposito, B., Henrion, D., Glagov, S., & Tedgui, A. (1996). Role of NO in flow-induced remodeling of the rabbit common carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 16(10), 1256-1262.

Tseng, G.N. (1992). Cell swelling increases membrane conductance of canine cardiac cells: evidence for a volume-sensitive Cl channel. *Am J Physiol*, 262(4 Pt 1), C1056-1068.

Tseng-Crank, J., Yao, J.A., Berman, M.F., & Tseng, G.N. (1993). Functional role of the NH2-terminal cytoplasmic domain of a mammalian A-type K channel. *J Gen Physiol*, 102(6), 1057-1083.

Tsien, R.Y. (1980). New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry*, 19(11), 2396-2404.

Tsien, R.Y. (1981). A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature*, 290, 527-528.

Tsien, R.Y., & Pozzan, T. (1989). Measurement of cytoslic free Ca2+ with Quin-2. *Methods in Enzymol.*, 172, 230-262.

Tsien, R.Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.*, 67, 509-544.

Tsutsui, J.M., Xie, F., & Porter, R.T. (2004). The use of microbubbles to target drug delivery. *Cardiovasc Ultrasound*, 2, 23.

Turner, C.E. (2000). Paxillin and focal adhesion signalling. *Nat Cell Biol*, 2(12), E231-236.

Turner, C.E. (2000). Paxillin interactions. *J Cell Sci*, 113 Pt 23, 4139-4140.

Ueda, D., Kishimoto, T., Dekio, S., & Tada, M. (1997). Inhibitory effect of lead on tube formation by cultured human vascular endothelial cells. *Hum Cell*, 10(4), 283-291.

Unger, E., Metzger, P., 3rd, Krupinski, E., Baker, M., Hulett, R., Gabaeff, D., Mills, J., Ihnat, D., & McCreery, T. (2000). The use of a thrombus-specific ultrasound contrast agent to detect thrombus in arteriovenous fistulae. *Invest Radiol*, 35(1), 86-89.

Unger, E.C., Hersh, E., Vannan, M., Matsunaga, T.O., & McCreery, T. (2001). Local drug and gene delivery through microbubbles. *Prog Cardiovasc Dis*, 44(1), 45-54.

Unger, E.C., Hersh, E., Vannan, M., & McCreery, T. (2001). Gene delivery using ultrasound contrast agents. *Echocardiography*, 18(4), 355-361.

Unger, E.C., Matsunaga, T.O., McCreery, T., Schumann, P., Sweitzer, R., & Quigley, R. (2002). Therapeutic applications of microbubbles. *Eur J Radiol*, 42(2), 160-168.

Ussing, H.H., & Zerahn, K. (1951). Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand*, 23(2-3), 110-127.

Van Liew, H.D., & Burkard, M.E. (1995). Bubbles in circulating blood: stabilization and simulations of cyclic changes of size and content. *J Appl Physiol*, 79(4), 1379-1385.

Van Wagoner, D.R. (1993). Mechanosensitive gating of atrial ATP-sensitive potassium channels. *Circ Res*, 72(5), 973-983.

van Wamel, A., Bouakaz, A., Versluis, M., & de Jong, N. (2004). Micromanipulation of endothelial cells: ultrasound-microbubble-cell interaction. *Ultrasound Med Biol*, 30(9), 1255-1258.

van Wamel, A., Kooiman, K., Emmer, M., ten Cate, F.J., Versluis, M., & de Jong, N. (2006). Ultrasound microbubble induced endothelial cell permeability. *J Control Release*, 116(2), e100-102.

van Wamel, A., Kooiman, K., Harteveld, M., Emmer, M., ten Cate, F.J., Versluis, M., & de Jong, N. (2006). Vibrating microbubbles poking individual cells: drug transfer into cells via sonoporation. *J Control Release*, 112(2), 149-155.

Vannan, M., McCreery, T., Li, P., Han, Z., Unger, E., Kuersten, B., Nabel, E., & Rajagopalan, S. (2002). Ultrasound-mediated transfection of canine myocardium by intravenous administration of cationic microbubble-linked plasmid DNA. *J Am Soc Echocardiogr*, 15(3), 214-218.

Vijayalaxmi, Tice, R.R., & Strauss, G.H. (1992). Assessment of radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single-cell gel electrophoresis technique. *Mutat Res*, 271(3), 243-252.

Voets, T., & Nilius, B. (2003). TRPs make sense. *J Membr Biol*, 192(1), 1-8.

Wallner, M., Meera, P., & Toro, L. (1999). Molecular basis of fast inactivation in voltage and Ca2+-activated K+ channels: a transmembrane beta-subunit homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(7), 4137-4142.

Walsh, K.B., & Zhang, J. (2005). Regulation of cardiac volume-sensitive chloride channel by focal adhesion kinase and Src kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289(6), H2566-2574.

Wang, S.X., Ikeda, M., & Guggino, W.B. (2003). The cytoplasmic tail of large conductance, voltage- and Ca2+-activated K+ (MaxiK) channel is necessary for its cell surface expression. *J Biol Chem*, 278(4), 2713-2722.

Wang, X., Liang, H.D., Dong, B., Lu, Q.L., & Blomley, M.J. (2005). Gene transfer with microbubble ultrasound and plasmid DNA into skeletal muscle of mice: comparison between commercially available microbubble contrast agents. *Radiology*, 237(1), 224-229.

Wanner, S.G., Koch, R.O., Koschak, A., Trieb, M., Garcia, M.L., Kaczorowski, G.J., & Knaus, H.G. (1999). High-conductance calcium-activated potassium channels in rat brain: pharmacology, distribution, and subunit composition. *Biochemistry*, 38(17), 5392-5400.

Ward, M.L., Williams, I.A., Chu, Y., Cooper, P.J., Ju, Y.K., & Allen, D.G. (2008). Stretch-activated channels in the heart: Contributions to length-dependence and to cardiomyopathy. *Prog Biophys Mol Biol*.

Watanabe, M., Oike, M., Ohta, Y., & Ito, Y. (2007). Long-term treatment with TGFbeta1 impairs mechanotransduction in bovine aortic endothelial cells. *Br J Pharmacol*, 150(4), 424-433.

Watson, P.A. (1989). Accumulation of cAMP and calcium in S49 mouse lymphoma cells following hyposmotic swelling. *J Biol Chem*, 264(25), 14735-14740.

Watson, P.A. (1989). Accumulation of cAMP and calcium in S49 mouse lymphoma cells following hyposmotic swelling. *J Biol Chem*, 264(25), 14735-14740.

Watson, P.A., Haneda, T., & Morgan, H.E. (1989). Effect of higher aortic pressure on ribosome formation and cAMP content in rat heart. *Am J Physiol*, 256(6 Pt 1), C1257-1261.

Weaver, A.K., Olsen, M.L., McFerrin, M.B., & Sontheimer, H. (2007). BK channels are linked to inositol 1,4,5-triphosphate receptors via lipid rafts: a novel mechanism for coupling [Ca(2+)](i) to ion channel activation. *J Biol Chem*, 282(43), 31558-31568.

Weaver, A.K., Olsen, M.L., McFerrin, M.B., & Sontheimer, H. (2007). BK channels are linked to inositol 1,4,5-triphosphate receptors via lipid rafts: a novel mechanism for coupling [Ca(2+)](i) to ion channel activation. *J Biol Chem*, 282(43), 31558-31568.

Weller, G.E., Lu, E., Csikari, M.M., Klibanov, A.L., Fischer, D., Wagner, W.R., & Villanueva, F.S. (2003). Ultrasound imaging of acute cardiac transplant rejection with microbubbles targeted to intercellular adhesion molecule-1. *Circulation*, 108(2), 218-224.

Wellner, M.C., & Isenberg, G. (1993). Properties of stretch-activated channels in myocytes from the guinea-pig urinary bladder. *J Physiol*, 466, 213-227.

Wellner, M.C., & Isenberg, G. (1993). Stretch-activated nonselective cation channels in urinary bladder myocytes: importance for pacemaker potentials and myogenic response. *Exs*, 66, 93-99.

Welsh, D.G., Morielli, A.D., Nelson, M.T., & Brayden, J.E. (2002). Transient receptor potential channels regulate myogenic tone of resistance arteries. *Circ Res*, 90(3), 248-250.

White, C.J., Ramee, S.R., Collins, T.J., Mesa, J.E., & Murgo, J.P. (1993). Holmium: YAG laser-assisted coronary angioplasty with multifiber delivery catheters. *Cathet Cardiovasc Diagn*, 30(3), 205-210.

White, J.A., Alonso, A., & Kay, A.R. (1993). A heart-like Na+ current in the medial entorhinal cortex. *Neuron*, 11(6), 1037-1047.

White, J.A., Baxter, D.A., & Byrne, J.H. (1994). Analysis of the modulation by serotonin of a voltage-dependent potassium current in sensory neurons of Aplysia. *Biophys J*, 66(3 Pt 1), 710-718.

White, J.G., Krumwiede, M., Cocking-Johnson, D., & Escolar, G. (1994). Influence of combined thrombin stimulation, surface activation, and receptor occupancy on organization of GPIb/IX receptors on human platelets. *Br J Haematol*, 88(1), 137-148.

White, T.W., Bruzzone, R., Wolfram, S., Paul, D.L., & Goodenough, D.A. (1994). Selective interactions among the multiple connexin proteins expressed in the vertebrate lens: the second extracellular domain is a determinant of compatibility between connexins. *J Cell Biol*, 125(4), 879-892.

Whitehead, N.P., Streamer, M., Lusambili, L.I., Sachs, F., & Allen, D.G. (2006). Streptomycin reduces stretch-induced membrane permeability in muscles from mdx mice. *Neuromuscul Disord*, 16(12), 845-854.

Williams, A.R. (1985). Effects of ultrasound on blood and the circulation. *eds. Biological effects of ultrasound.*, 16, 49-65.

Wilson, W.L., Wiercinski, F.J., Nyborg, W.L., Schnitzler, R.M., & Sichel, F.J. (1966). Deformation and motion produced in isolated living cells by localized ultrasonic vibration. *J Acoust Soc Am*, 40(6), 1363-1370.

Woltmann, D., Fatica, R.A., Rubin, J.M., & Weitzel, W. (2000). Ultrasound detection of microembolic signals in hemodialysis accesses. *Am J Kidney Dis*, 35(3), 526-528.

Woo, K., Dutta, A.K., Patel, V., Kresge, C., & Feranchak, A.P. (2008). Fluid-flow induces mechanosensitive ATP release, calcium signalling, and Cl- transport in biliary epithelial cells through a PKC{zeta}-dependent pathway. *J Physiol*.

Wu, D., & Mori, N. (1999). Extracellular ATP-induced inward current in isolated epithelial cells of the endolymphatic sac. *Biochim Biophys Acta*, 1419(1), 33-42.

Wu, D., & Zhu, P.H. (1999). Caffeine-sensitive Ca2+ stores in carp retinal bipolar cells. *Neuroreport*, 10(18), 3897-3901.

Wu, S.N., Jan, C.R., & Li, H.F. (1999). Ruthenium red-mediated inhibition of large-conductance Ca2+-activated K+ channels in rat pituitary GH3 cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 290(3), 998-1005.

Wu, S.N., Jan, C.R., Li, H.F., & Chen, S.A. (1999). Stimulation of large-conductance Ca2+-activated K+ channels by Evans blue in cultured endothelial cells of human umbilical veins. *Biochem Biophys Res Commun*, 254(3), 666-674.

Wu, S.N., Li, H.F., Jan, C.R., & Shen, A.Y. (1999). Inhibition of Ca2+-activated K+ current by clotrimazole in rat anterior pituitary GH3 cells. *Neuropharmacology*, 38(7), 979-989.

Wu, Z., Wong, K., Glogauer, M., Ellen, R.P., & McCulloch, C.A. (1999). Regulation of stretch-activated intracellular calcium transients by actin filaments. *Biochem Biophys Res Commun*, 261(2), 419-425.

Wu, J., Chen, D., Pepe, J., Himberg, B.E., & Ricn, M. (2006). Application of liposomes to sonoporation. *Ultrasound Med Biol*, 32(3), 429-437.

Xia, S., Lampe, P.A., Deshmukh, M., Yang, A., Brown, B.S., Rothman, S.M., Johnson, E.M., Jr., & Yu, S.P. (2002). Multiple channel interactions explain the protection of sympathetic neurons from apoptosis induced by nerve growth factor deprivation. *J Neurosci*, 22(1), 114-122.

Xia, X.M., Zeng, X., & Lingle, C.J. (2002). Multiple regulatory sites in large-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature*, 418(6900), 880-884.

Xu, B., & Lu, L. (1994). Protein kinase A-regulated Cl- channel in ML-1 human hematopoietic myeloblasts. *J Membr Biol*, 142(1), 65-75.

Xu, X., & Lee, K.S. (1994). Characterization of the ATP-inhibited K+ current in canine coronary smooth muscle cells. *Pflugers Arch*, 427(1-2), 110-120.

Xu, X., Tsai, T.D., Wang, J., Lee, E.W., & Lee, K.S. (1994). Modulation of three types of K+ currents in canine coronary artery smooth muscle cells by NS-004, or 1-(2'-hydroxy-5'-chlorophenyl)-5-trifluoromethyl-2(3H) benzimidazolone. *J Pharmacol Exp Ther*, 271(1), 362-369.

Xu, Z.C., Yang, Y., & Hebert, S.C. (1996). Phosphorylation of the ATP-sensitive, inwardly rectifying K+ channel, ROMK, by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 271(16), 9313-9319.

Yang, R.S., Lin, W.L., Chen, Y.Z., Tang, C.H., Huang, T.H., Lu, B.Y., & Fu, W.M. (2005). Regulation by ultrasound treatment on the integrin expression and differentiation of osteoblasts. *Bone*, 36(2), 276-283.

Yoho, R.M., Wilson, P.K., Gerres, J.A., & Freschi, S. (2008). Chopart's amputation: a 10-year case study. *J Foot Ankle Surg*, 47(4), 326-331.

Yokoshiki, H., Sunagawa, M., Seki, T., & Sperelakis, N. (1999). Antisense oligodeoxynucleotides of sulfonylurea receptors inhibit ATP-sensitive K+ channels in cultured neonatal rat ventricular cells. *Pflugers Arch*, 437(3), 400-408.

Yoro Sy, G., Urosevic, D., Fellmann, L., Greney, H., Bousquet, P., & Feldman, J. (2008). G-protein inwardly rectifying potassium channels are involved in the hypotensive effect of I1-imidazoline receptor selective ligands. *J Hypertens*, 26(5), 1025-1032.

Young, F.R. (1989). Cavitation. *New York : McGraw Hill*.

Yuan, X.J., Wang, J., Juhaszova, M., Golovina, V.A., & Rubin, L.J. (1998). Molecular basis and function of voltage-gated K+ channels in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol*, 274(4 Pt 1), L621-635.

Yuan, A., Dourado, M., Butler, A., Walton, N., Wei, A., & Salkoff, L. (2000). SLO-2, a K+ channel with an unusual Cl- dependence. *Nat Neurosci*, 3(8), 771-779.

Zhang, R.D., Fidler, I.J., & Price, J.E. (1991). Relative malignant potential of human breast carcinoma cell lines established from pleural effusions and a brain metastasis. *Invasion Metastasis*, 11(4), 204-215.

Zhang, Y.H., & Hancox, J.C. (2000). Gadolinium inhibits Na(+)-Ca(2+) exchanger current in guinea-pig isolated ventricular myocytes. *Br J Pharmacol*, 130(3), 485-488.

Zhang, X., Solaro, C.R., & Lingle, C.J. (2001). Allosteric regulation of BK channel gating by Ca(2+) and Mg(2+) through a nonselective, low affinity divalent cation site. *J Gen Physiol*, 118(5), 607-636.

Zhang, B.T., Yeung, S.S., Allen, D.G., Qin, L., & Yeung, E.W. (2008). The role of the calcium-calpain pathway in cytoskeletal damage after eccentric contractions. *J Appl Physiol*.

Zhang, B.T., Yeung, S.S., Allen, D.G., Qin, L., & Yeung, E.W. (2008). The role of the calcium-calpain pathway in cytoskeletal damage after eccentric contractions. *J Appl Physiol*.

Zhang, J., Xie, Z., Dong, Y., Wang, S., Liu, C., & Zou, M.H. (2008). Identification of nitric oxide as an endogenous activator of the AMP-activated protein kinase in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*.

Zhou, X.B., Wang, G.X., Ruth, P., Huneke, B., & Korth, M. (2000). BK(Ca) channel activation by membrane-associated cGMP kinase may contribute to uterine quiescence in pregnancy. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279(6), C1751-1759.

Zhou, X.B., Arntz, C., Kamm, S., Motejlek, K., Sausbier, U., Wang, G.X., Ruth, P., & Korth, M. (2001). A molecular switch for specific stimulation of the BKCa channel by cGMP and cAMP kinase. *J Biol Chem*, 276(46), 43239-43245.

Zhou, S., Bachem, M.G., Seufferlein, T., Li, Y., Gross, H.J., & Schmelz, A. (2008). Low intensity pulsed ultrasound accelerates macrophage phagocytosis by a pathway that requires actin polymerization, Rho, and Src/MAPKs activity. *Cell Signal*, 20(4), 695-704.

Zhou, Y., Cui, J., & Deng, C.X. (2008). Dynamics of sonoporation correlated with acoustic cavitation activities. *Biophys J*, 94(7), L51-53.

Autres travaux : « Sonoporation et transfert de drogues et de gènes par microbulles et ultrasons ».

Abréviations

A

2-APB : 2-Aminoethoxydiphenyl borate

Ach : acétyle choline

ACU : agent(s) de contraste ultrasonore

ADP : adénosine di-phosphate

ADN : acide désoxyribonucléique

AMP : adénosine mono-phosphate

AMPc : adénosine mono-phosphate cyclique

AT-1 : Atrial myocyte

ATP : adénosine tri-phosphate

B

BAD : Bcl-2-antagonist of cell death

BAPTA : Ethylene dioxy-bis-(o-phenylene nitrilo)-tetra-acetic acid

Bcl-2 : B cell lymphoma 2

Bcl-XL : Bcl-2-like 1

BMK-1 : big mitogen-activated protein kinase 1

BK_{Ca}: canal potassique de grande conductance activé par le potentiel et le calcium

C

Ca^{2+} : ions calcium

CHO (cellules) : Chinese Hamster Ovary

ChTx : charybdotoxine

CICR : calcium induced calcium release

CNG : cyclic nucleotid gated channel

D

DAG : di-acyl-glycerol

DHS-I : déshydrosoyasaponine

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO : di-méthyle sulfoxyde

DO : Densité optique

E

E : potentiel

ECG : électrocardiogramme

EGF : epidermal growth factor

EGTA : ethylene glycol tetra-acetic acid

Ek : potentiel d'équilibre du potassium

Em : Potentiel de membrane

EnaC : epithelial sodium channels

ENOS : nitric oxyde synthase

EPAC : Exchange protein directly activated by cAMP

ERK ½ : Extracellular signal-regulated protein kinase ½

F

F : constante de Faraday

FAK : Focal Adhesion Kinase

Flk-1 : FMS-like tyrosine kinase-1

G

GABA : acide γ-amino butyrique

Gc : guanylate cyclase

GDP : Guanosine di-phosphate

GFP : Green Fluorescent Protein

GHK : Goldman-Hodgkin-Katz

Gi : Inhibitory G-protein

GIRK : famille de récepteur potassique couplé à une protéine G

GMP : Guanosine mono-phosphate

GPCR : G protein coupled with a receptor

Grb2 : Growth factor receptor-bound protein 2

Gs : Stimulatory G-protein

GsMTx4 : *Grammastola spatulata* toxine 4

GTP : Guanosine Tri-phosphate

I

I : intensité

Ix : courant générée par les mouvements de l'ion X

IbTx : Iberiotoxine

ICa : courant sodique

ICAM-1 ou 2 : inter-cellular adhesion molecule-1 ou 2

Icl : courant chlorure

IK : courant potassique

INa : courant sodique

IP_3 : Inositol tri-phosphate

IRM : Imagerie par résonance magnétique

J

JNK : C-jun N-terminal Kinase

K

K^+ : ion potassium

L

λ : longueur d'onde

LbTx : limbatotoxine

M

MAP-Kinases : Mitogen activated protein kinases

Mg2+ : ions magnésium

MI : Mechanical index

MIP : milieu intra-pipette

MMP : matricial metalo-protease

MTT : bromure de 3-(4-5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5diphényltétrazolium

N

Na^{2+} : ions sodiques

NAD^+ ou NAD : nicotinamide adenine dinucleotide

$NADH_2$ ou $NADH^+$: reduced nicotinamide adenine dinucleotide

NO : nitric oxyde

P

P° : pression

PA : potentiel d'action

PBS : phosphate buffered saline

pCa : potentiel calcique

PDI : phosphodiesterase

PDGFα ou β : plateled derived growth factor α ou β

PEG : poly-éthylène glycol

pH : potentiel hydrogène

PI : phospho-inositides

PI3K : phosphatidylinositol-3-kinase

PIP2 : phosphatidyl inositol bi-phosphate

PKA : protéine kinase C

PKC : protéine kinase A

PKG : protéine kinase G

PKi : protéine kinase inhibiteur

PLC : phospholipase C

Pm : Potentiel de membrane

PSS : physiological saline solution

PVC : premature ventricular contraction

Px : perméabilité de l'ion X

R

R : résistance

RE : Réticulum endoplasmique

ROCK : Rho-associated coiled-coil forming protein kinase

RS : réticulum sarcoplasmique

S

SAC : Canaux ioniques actives par l'étirement (Stretch Activated Channel)

SOC : store operated channel

Sos : Son of sevenless

Src kinsase : sarcoma kinase

SVF : Sérum de veau fœtal

T

T : temperature

TEER : Trans-endothelial resistance

TRP : transcient receptor protein

U

U : tension

US: Ultrason

V

VDC : voltage dependant channels

VEGF : vascular endothelial growth factor

VOC : voltage operated channels

Z

Z : Impédance acoustique du milieu
Zx : Valence de l'ion X

Truong-An TRAN

« Mécanismes d'interaction cellules-microbulles et ultrasons »

Résumé en français

L'objectif est d'étudier une nouvelle voie de thérapie basée sur l'échographie de contraste. Les agents de contraste (UCA) utilisés sont capables de vectoriser des molécules chimiques et de les libérer via les ultrasons. Cette méthode permet un traitement ciblé et contrôlé et, de ce fait, de réduire la quantité de principe actif (donc des effets de secondaires). De plus, les UCA augmentent la perméabilité cellulaire ou tissulaire améliorant leur incorporation cellulaire. Cependant le mécanisme n'est pas connu.

In vitro, nous avons utilisé un ensemble de techniques dont le patch clamp pour visualiser les échanges trans-membranaires et la TEER pour les modifications de la perméabilité trans-endothéliales. *In vivo*, nous avons effectué des ECG pour étudier les effets secondaires afin de mieux les prévenir.

Le but de la thèse est d'aboutir à la connaissance du phénomène d'augmentation de la perméabilité induite par les ultrasons et les UCA afin de pouvoir l'optimiser.

Mots clés : sonoporation, agent de contraste, thérapie ciblée, ultrason, SAC

Résumé en anglais

The aim of this work is to study a new way of therapy based on the contrast ultrasonography. The used contrast agents are able of transport different chemical molecules and to liberate them when they are destroyed by means of ultrasounds. This method allows a controlled and targeted treatment therefore what has as advantages to reduce drugs quantity (therefore side effects). Moreover, microbubbles augment cell or tissue permeability therefore ameliorates their cell uptake. However, the mechanism is not known.

In vitro, we used the whole technology of which the patch clamp to show exchanges through the cell membrane and TEER for modification of trans-endothelial permeability. *In vivo*, we have performed ECG to notice and understand side effects to their apparition.

The purpose of PhD work is to succeed to the knowledge of the phenomenon of increase of the permeability led by ultrasounds and microbubbles to be able to optimise it.

Keywords: sonoporation, cell permeability, targeted microbubbles, SAC, ultrasound