UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE : SSBCV

UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, Tours, France.

THÈSE présentée par :

Fabien ESPITALIER

Soutenue le : **18 décembre 2019**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Tours**

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

Étude *in vivo* de l'impact des ultrasons et des microbulles sur la diffusion des antibiotiques dans le parenchyme pulmonaire condensé et dans le tissu musculaire chez le lapin.

THÈSE dirigée par :

M. REMERAND Francis	Professeur, Université de Tours
M. BOUAKAZ Ayache	Directeur de recherche Inserm, Université de Tours

RAPPORTEURS :

M. BOUHEMAD Bélaïd	Professeur, Université de Bourgogne, Dijon
M. CONSTANTIN Jean-Michel	Professeur, Sorbonne Université, Paris

---

JURY :

M. BOUAKAZ Ayache	Directeur de recherche Inserm, Université de Tours
M. BOUHEMAD Bélaïd	Professeur, Université de Bourgogne, Dijon
M. CONSTANTIN Jean-Michel	Professeur, Sorbonne Université, Paris
M. LAFFON Marc (Président)	Professeur, Université de Tours
M. REMERAND Francis	Professeur, Université de Tours
M. SAMAIN Emmanuel	Professeur, Université de Franche-Comté, Besançon

REMERCIEMENTS

A mon directeur de thèse, M. Francis Remérand : Merci de m'avoir proposé de travailler avec toi sur ce sujet innovant et prometteur, merci pour ton travail initial de défrichement, merci pour ton encadrement tout au long de cette aventure. Le temps passé ensemble autour de nos patients à poils blancs aura permis d'apprendre à mieux nous connaître et d'établir une relation de confiance et d'amitié.

A mon co-directeur de thèse, M. Ayache Bouakaz : Merci de m'avoir accueilli au sein de ton unité de recherche de l'UMR 1253, merci d'avoir misé sur ce projet, merci pour ton aide et tes conseils.

Aux membres du jury, M. Bélaïd Bouhémad, M. Jean-Michel Constantin, M. Emmanuel Samain : Merci de consacrer de votre précieux temps à rapporter et juger ce travail.

A M. Marc Laffon : Merci pour tes travaux sur le modèle de lapin qui ont permis d'établir le protocole de ce travail. Merci aussi pour ton aide et ton écoute tout au long de mon parcours. Enfin, merci de juger ce travail.

A M. François Darrouzain et M. David Ternant : Merci pour votre accueil au laboratoire de pharmaco-toxicologie. François, merci pour tout le travail effectué. Sans ton aide indispensable, ce travail n'existerait pas. David, merci pour ton aide dans la modélisation de la pharmacocinétique de l'amikacine.

A M. Jean-Michel Escoffre : Merci pour ton accueil, ton aide, tes conseils et ta disponibilité.

A M. Éric Piver : Merci pour ton accueil au laboratoire de biochimie et ta disponibilité.

A Mme Valérie Schubnel, M. Jérôme Montharu et M. Georges Roseau : Merci pour votre aide dans la logistique et la manipulation des lapins. Merci pour le soin que vous prenez des animaux.

A Mme Sylvie Axelroud, M. Éric Lemoine, M. Marc-Antoine May : Merci pour votre soutien au quotidien au sein de l'équipe d'anesthésie de chirurgie cardiaque. Tout ce temps que vous m'avez offert n'a pas été gaspillé. Merci infiniment.

A mes parents Françoise et Joseph : Merci pour votre soutien indéfectible et pour les belles valeurs que vous m'avez données. J'essaye de les transmettre.

A mon frère Florent, à son épouse Marion et ses enfants Lila, Lucien et Léonard : Florent, si « l'expérience est une lumière qu'on porte sur le dos et qui n'éclaire jamais que le chemin parcouru », c'est parfait, je te suis ! Merci pour ton aide et ton soutien. Merci pour la si jolie famille que vous formez.

A ma belle-famille, dans son ensemble et sa diversité : merci à tous pour votre accueil et votre soutien. La rédaction estivale de ce document vous doit la sérénité.

A mon épouse Isabelle, mes fils Léandre et Martin : avec vous à mes côtés, rien d'impossible ! Je vous aime.

RESUME

Les pneumonies acquises à l'hôpital et en réanimation (pneumopathies acquises sous ventilation mécanique, PAVM) sont les infections nosocomiales les plus fréquentes en réanimation. Elles sont fréquemment provoquées par des bactéries ayant une sensibilité diminuée aux antibiotiques. Les antibiotiques administrés par voie intraveineuse diffusent faiblement dans le poumon. Ceci rend les pneumonies difficiles à traiter. La combinaison des ultrasons et des microbulles de contraste (appelée ici sonoporation) est une méthode innovante, non-invasive, permettant une augmentation ciblée de la concentration de divers médicaments dans de nombreux organes. Une augmentation significative de la concentration d'antibiotiques dans le tissu pulmonaire grâce à la sonoporation pourrait permettre d'améliorer le traitement des PAVM sans augmenter le risque de toxicité systémique dose-dépendant des antibiotiques. Les objectifs de ce travail étaient le développement d'un modèle de poumon droit condensé chez le lapin ventilé mécaniquement, la détermination de la pharmacocinétique de l'amikacine chez le lapin et l'évaluation de l'impact de la sonoporation sur la diffusion des principales classes d'antibiotiques utilisées pour traiter les PAVM (amikacine, vancomycine, ceftazidime) dans le tissu du poumon condensé de cet animal. A titre de contrôle, la sonoporation a également été appliquée sur le tissu musculaire des lapins, plus facilement accessible aux ultrasons. Les tissus pulmonaire et musculaire non exposés à la sonoporation permettaient d'évaluer l'impact de la sonoporation, chaque lapin étant son propre témoin. L'étude pharmacocinétique a identifié le pic d'amikacinémie à 48 minutes du début de l'injection. Deux expérimentations ont alors été menées : l'une consistait en la sonoporation des tissus pulmonaire et musculaire au pic de concentration sanguine; l'autre consistait en la sonoporation du tissu pulmonaire au tiers de la concentration de pic. Pour ces 2 expérimentations, les médianes de concentration d'amikacine dans le tissu pulmonaire augmentaient de 33 à 55%. Dans le tissu musculaire, la concentration d'amikacine augmentait de 152%. Une autre expérimentation, menée dans les mêmes conditions, n'a pas montré d'impact de la sonoporation sur la concentration tissulaire en vancomycine. Ainsi, la sonoporation augmente significativement la concentration d'amikacine dans le tissu pulmonaire et pourrait permettre d'améliorer le traitement des pneumopathies acquises sous ventilation mécanique. Cependant cette technique ne semble pas être efficace pour tous les antibiotiques. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives en thérapeutique humaine, d'autant que cette approche semble facile à mettre en œuvre en pratique clinique au lit du patient.

Mots clés : Poumon condensé, antibiotiques, microbulles, ultrasons, traitement médicamenteux

ABSTRACT

Hospital and Intensive Care Unit (ICU)-acquired pneumonias (ventilation-acquired pneumonia, VAP) are the most frequent nosocomial infections in ICU. VAP are often caused by bacteria with impaired susceptibility to antibiotics. The poor diffusion of intravenous antibiotics in lung tissue makes these pneumonias challenging to treat. The combination of ultrasound and microbubbles (USMB) is an emerging method for non-invasive and targeted enhancement of uptake of various drugs in several organs. The impact of UMSB in enhancement of antibiotics uptake in condensed lung tissue has never been explored. A significant enhancement of antibiotics uptake due to USMB in lung tissue could increase the efficacy of the treatment of VAP without any increase of dose-dependent systematic toxicity. This work aimed to develop a model of condensed right lung in rabbit under mechanical ventilation, to determine the amikacin's pharmacokinetics in rabbit, and to assess the impact of USMB on the diffusion in rabbit condensed lung of the main classes of antibiotics (amikacin, vancomycin, ceftazidime) usually used to treat the PAV. The impact of USMB was also assessed on rabbit skeletal muscle, a tissue easier to sonoporate. Lung and muscle tissues no submitted to USMB were used to assess the USMB impact, each rabbit being his own control. Pharmacokinetics assessment showed the amikacin blood concentration peak at 48 minutes after the start of infusion. This led to 2 experimentations, USMB being applied on lung and muscle at the blood concentration peak or on lung at one third the blood concentration peak. In these experimentations, a 33 to 55% increase in median lung amikacin concentration was shown. In muscle tissue, the increase was 152%. Another experimentation handled with the same conditions was not showing any impact of USMB on vancomycin concentration in tissues. USMB significantly enhances amikacin concentration in lung tissue and could improve ventilator associated pneumonias treatment efficacy. However, USMB seems not to enhance diffusion in tissue for all the antibiotics. These results are opening new therapeutic fields against lung, especially since USMB seems easy to enforce at bed-side.

Keywords: condensed lung, antibiotics, microbubbles, ultrasound, drug therapy

PUBLICATIONS ET PRESENTATIONS EN CONGRES

Publications

- **Espitalier F**, Darrouzain F, Escoffre JM, Ternant D, Piver E, Bouakaz A, Remérand F. Enhanced amikacin diffusion with ultrasound and microbubbles in a mechanically ventilated condensed lung rabbit model. Frontiers in Pharmacology. 2020 Jan 16;10:1562.

Communications orales en congrès

- **Espitalier F**, Remérand F, Escoffre JM, Bouakaz A (**2016**). Action of ultrasound and contrast microbubbles on amikacin diffusion in the pulmonary tissue in a rabbit model. Sonoporation consortium meeting, June 27th-July 1st, 2016, Tours, France.

- **Espitalier F**, Darrouzain F, Escoffre JM, Novell A, Piver E, Bouakaz A, Remérand F (**2016**). Action des ultrasons associés aux microbulles de contraste sur la pénétration de l'amikacine dans le parenchyme pulmonaire de lapin. Congrès de la SFAR 2016, September 22-24th, 2016, Paris, France.

- **Espitalier F**, Remérand F, Darrouzain F, Escoffre JM, Novell A, Piver E, Bouakaz A (**2016**). Action of ultrasound and contrast microbubbles on amikacin diffusion in the pulmonary tissue in a rabbit model. IEEE International Ultrasonics Symposium (IUS), September 18th-21st, 2016, Tours, France.

Posters

- Remérand F, **Espitalier F**, Darrouzain F, Novell A, Piver E, Bouakaz A (**2017**). Effect of ultrasound and contrast microbubbles on amikacin diffusion in lung and muscle tissues in a rabbit model. Euroanaesthesia 2017, June 3rd-5th, 2017, Genève, Switzerland.

- **Espitalier F**, Darrouzain F, Escoffre JM, Novell A, Piver E, Bouakaz A, Remérand F (**2016**). Action des ultrasons associés aux microbulles de contraste sur la pénétration de l'amikacine dans le parenchyme pulmonaire de lapin. Congrès de la SFAR 2016, September 22-24th, 2016, Paris, France.

TABLE DES MATIERES

Remerciements……3
Résumé……4
Abstract ……5
Publication et présentation en congrès ……6
Tables des matières ……7
Liste des tableaux ……10
Liste des figures ……11
Chapitre I – Introduction ……13
I.1 Pneumopathies acquises sous ventilation mécanique et résistance aux antibiotiques 13
I.2 Principes et intérêt de la sonoporation ……14
I.2.1 Description et principes physiques des ultrasons ……14
I.2.2 Description et utilisation des agents de contraste échographique ……16
I.2.2.1 Description ……16
I.2.2.2 Utilisation ……18
I.2.3 Effets physiques des ultrasons sur les agents de contraste échographique ……19
I.2.4 Effets biologiques des interactions entre les ultrasons et les agents de contraste échographique sur les membranes cellulaires et les jonctions intercellulaires ……20
I.2.4.1 Sonoporation et thérapie cellulaire ……20
I.2.4.2 Sonoporation et thérapie extravasculaire ……20
I.2.5 Phénomènes actuellement avancés pour expliquer la capacité de la sonoporation à augmenter la diffusion de médicaments dans les cellules et les tissus ……21
I.2.5.1 Création de micropores dans la membrane cellulaire ……21
I.2.5.2 Stimulation de l'endocytose locale ……21
I.2.5.3 Action des micro-courants acoustiques sur les jonctions cellulaires ……21
I.2.5.4 Autres phénomènes pouvant être impliqués ……21
I.3 La sonoporation comme vecteur de l'antibiothérapie ciblée ……23
I.4 Objectifs de la thèse ……24
I.4.1 Développement du modèle animal ……24
I.4.2 Validation du concept ……24
Chapitre II - Développement du modèle animal ……25
II.1 Choix et développement du modèle animal ……25

II.1.1 Choix de l'animal 25

II.1.2 Développement du modèle de poumon inondé 25

II.1.3 Sacrifice de l'animal, techniques de prélèvements tissulaires et préparation des broyats 29

II.1.4 **Expérimentation 1** : Effet du décubitus latéral sur la concentration parenchymateuse pulmonaire d'antibiotique (Amikacine) 29

II.1.5 Choix des antibiotiques et **Expérimentation 2** : Étude pharmacocinétique de l'amikacine chez le lapin femelle adulte New Zealand 34

II.1.6 Techniques de dosage des antibiotiques sur broyat tissulaire 37

II.1.6.1 Préparation des échantillons 37

II.1.6.2 Dosage de l'amikacine 37

II.1.6.3 Dosage de la vancomycine 38

II.1.6.4 Dosage de la ceftazidime 38

II.1.7 Inondation pulmonaire : impact sur la mesure de la concentration d'amikacine dans le broyat pulmonaire et correction 38

II.1.8 **Expérimentation 3** : Détermination du ratio poids du poumon droit / poids du poumon gauche 39

II.1.9 La sonoporation musculaire comme contrôle positif 41

II.2 Ultrasons : paramètres acoustiques, matériel, réglages 41

II.2.1 Paramètres acoustiques 41

II.2.2 Matériel et réglages utilisés dans nos expérimentations pour générer les ultrasons nécessaires à la sonoporation 43

II.3 Protocole expérimental retenu 43

II.3.1 Anesthésie et conditionnement des lapins 43

II.3.2 Administration des antibiotiques 44

II.3.3 Inondation pulmonaire 44

II.3.4 Injection des microbulles 44

II.3.5 Sonification 45

II.3.6 Constitution du groupe contrôle 45

II.3.7 Sacrifice des animaux 45

II.3.8 Prélèvement des tissus et préparation des broyats 46

II.4 Éthique animale et hébergement des animaux 46

II.4.1 Éthique animale 46

II.4.2 Hébergement des animaux 47

Chapitre III - Validation du concept…… 48

III.1 **Expérimentation 4** : Actions des ultrasons et des microbulles de contraste sur la diffusion d'une haute concentration sanguine amikacine au sein des parenchymes pulmonaire et musculaire de lapin …… 48

III.2 **Expérimentation 5** : Actions des ultrasons et des microbulles de contraste sur la diffusion d'une faible concentration sanguine d'amikacine au sein du parenchyme pulmonaire de lapin …… 57

III.3 **Expérimentation 6** : Actions des ultrasons et des microbulles de contraste sur la diffusion de la vancomycine au sein des parenchymes pulmonaire et musculaire de lapin …… 60

Chapitre IV – Discussion …… 67

IV.1 Rappels des résultats principaux…… 67

IV.2 Limitations …… 68

IV.2.1 Limitations liées au modèle animal …… 68

IV.2.2 Limitations liées au modèle pulmonaire …… 68

IV.2.3 Limitations liées au matériel …… 69

IV.2.4 Limitations liées à la technique ultrasonore …… 70

IV.2.5 Limitations liées au mode de dosage des antibiotiques …… 70

IV.3 Axes d'amélioration et perspectives …… 70

IV.3.1 Évolution du modèle : vers le grand animal infecté …… 71

IV.3.2 Adaptation du matériel …… 72

IV.3.3 Tester d'autres antibiotiques …… 72

IV.3.4 Tester des microbulles chargées d'antibiotiques …… 73

Conclusion …… 74

Bibliographie …… 75

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.1 - Caractéristiques techniques de différents agents de contraste échographique (usage commercial ou recherche exclusive) 18

Tableau I.2 - Résultats de l'étude de Y. Shang et al. : Concentration de céfuroxime dans le tissu prostatique sec (exprimé en $\mu g.mg^{-1}$) 23

LISTES DES FIGURES

Figure I.1 - Représentation graphique des principales caractéristiques des ultrasons ……16

Figure I.2 - Illustration schématique d'une microbulle et de ses différents composants ……17

Figure I.3 - Dynamique des microbulles sous un champ ultrasonore ……19

Figure I.4 - Cinq mécanismes de formation de pores provoquée par l'oscillation de microbulles activées par les ultrasons ……22

Figure II.1 - Effet du décubitus latéral sur la concentration pulmonaire parenchymateuse en amikacine ……32

Figure II.2 - Pharmacocinétique de l'amikacinémie chez le lapin New Zealand adulte anesthésié sous ventilation mécanique ……36

Figure III.1 - Concentration d'amikacine dans le parenchyme pulmonaire à T160 ……60

Chapitre I - Introduction

I.1 Pneumopathies acquises sous ventilation mécanique et résistance aux antibiotiques

Les pneumopathies acquises sous ventilation mécaniques (PAVM) sont une des infections nosocomiales les plus fréquentes chez les patients de soins intensifs. L'incidence des pneumopathies acquises à l'hôpital est estimée entre 5 et 20 cas pour 1000 hospitalisations, dont 1/3 sont acquises en unités de soins intensifs, majoritairement sous ventilation mécanique (1). Les PAVM sont pourvoyeuses d'une importante morbidité, augmentant la durée de ventilation mécanique, la durée de prise en charge en soins intensifs, la durée d'hospitalisation globale et les couts de prise en charge médicale (2–4). Le surcout généré par la survenue d'une PAVM chez un patient de soins intensifs aux USA est estimé entre 10000 et 40000 $ (soit entre 8550 € et 34200 €) (3–5). Au Royaume Uni, le surcoût est estimé à 10000 £ (soit 11250 €) (6). Les PAVM sont aussi la cause d'une mortalité élevée, puisqu'on estime que l'incidence des décès directement lié aux PAVM en soins intensifs est de 10% (7,8).

Le recours à la ventilation mécanique est nécessaire lorsque qu'un patient ne peut plus assurer un équilibre entre les apports et la consommation en oxygène. Le support mécanique à la ventilation pulmonaire est effectué par une machine improprement appelée « respirateur ». Le flux gazeux est administré dans le poumon, soit par une interface non invasive, comme un masque facial, soit le plus souvent par une interface invasive, comme une sonde d'intubation endotrachéale. Afin d'éliminer les fuites respiratoires, cette sonde est munie d'un ballonnet, gonflé dans la trachée. Il est souvent nécessaire de sédater ces patients du fait de leur pathologie, afin de diminuer leur consommation globale en oxygène, et/ou de permettre une bonne synchronisation entre le patient et sa machine de ventilation mécanique. Du fait de cette sédation, les patients sont souvent dans l'impossibilité de déglutir ou de tousser efficacement. Des sécrétions salivaires et/ou nasales peuvent alors s'accumuler dans le pharynx et dans l'espace compris entre la glotte et le ballonnet trachéal. Des micro-fuites de ces sécrétions non stériles peuvent alors survenir de façon répétée au cours du séjour. Ceci entraine une colonisation bactérienne de la trachée puis de l'arbre bronchique, alors qu'il est normalement stérile. Les bactéries en cause peuvent être les bactéries hôtes de la cavité oropharyngée, mais aussi des bactéries habituellement non présentes dans cette cavité, apportées par les soins et/ou sélectionnées par tout traitement antibiotique. Ce sont alors par définition des germes résistants à plusieurs antibiotiques.

Le traitement des PAVM est assuré initialement par une antibiothérapie intra-veineuse probabiliste à large spectre d'action, secondairement ciblée sur les bactéries identifiées lors des prélèvements bactériologiques. Quand l'infection est grave ou quand on suspecte

une infection à germe nosocomial (généralement à partir de 5 jours d'hospitalisation), une antibiothérapie intra-veineuse de seconde ligne est nécessaire. Elle associe des molécules ayant souvent une toxicité systémique plus grande que les antibiothérapies de première ligne. De plus, ces antibiothérapies de seconde ligne ont souvent une mauvaise pénétration dans le parenchyme pulmonaire, ce qui nécessite d'en augmenter les doses et de s'approcher encore plus des doses toxiques, comme c'est le cas pour les aminosides. De ce fait, les PAVM sont des infections difficiles à traiter efficacement.

Devant ces difficultés de traitement des PAVM, la nébulisation d'antibiotique directement au sein du parenchyme pulmonaire a été proposée en solution complémentaire au traitement intraveineux. Les études réalisées rapportent des résultats encourageants, mais au prix de contraintes techniques importantes comme la nécessité d'une ventilation mécanique et parfois également celle de l'usage de curares. D'autres alternatives restent donc à développer.

La sonoporation est un phénomène qui résulte de l'action de microbulles de contraste, activées par des ondes ultrasonores, sur les parois tissulaires et cellulaires. La sonoporation permet d'augmenter la diffusion de différentes molécules au sein des cellules et des tissus grâce à l'apparition transitoire de micropores dans les parois tissulaires et cellulaires (9). Ce mécanisme pourrait augmenter la diffusion des antibiotiques au sein du parenchyme pulmonaire sans en augmenter la concentration plasmatique. Ainsi, il pourrait améliorer l'effet thérapeutique des antibiotiques dans les PAVM, sans en augmenter la toxicité systémique.

I.2 Principes et intérêt de la sonoporation

I.2.1 Description et principes physiques des ultrasons (Figure I.1) (10)

Les ultrasons sont des ondes mécaniques longitudinales se propageant dans un milieu par changement de pression. La propagation des ultrasons se fait à des fréquences supérieures à 20 kHz, non audibles par les êtres humains. On peut faire varier plusieurs paramètres des ultrasons :

- la fréquence d'émission, ce qui permet de moduler la profondeur de pénétration des ultrasons et la cavitation potentielle. On considère que les basses fréquences ultrasonores sont comprises entre 20 et 200 kHz, les fréquences moyennes entre 0,7 et 3,0 MHz, et que les hautes fréquences sont supérieures à 3,0 MHz. La profondeur de pénétration des ultrasons dans un milieu est inversement proportionnelle à leur fréquence d'émission. Ainsi, à 1 MHz la pénétration est de 10 cm alors qu'à 10 MHz la pénétration est de 1 cm.
  En imagerie, plus la fréquence d'émission des ultrasons est élevée et meilleure est la résolution spatiale des images.

- la pression acoustique et intensité ultrasonore, ce qui permet de moduler la quantité d'énergie délivrée à l'endroit choisi. Le déplacement d'une onde ultrasonore dans un milieu entraîne une succession de pressions/décompressions dans ce milieu. La quantité d'énergie reçue par un tissu cible est directement en lien avec la pression acoustique appliquée par le transducteur. Deux valeurs permettent de mesurer la pression acoustique appliquée sur le tissu : la pression acoustique de crête positive et la pression acoustique de crête négative. Ce sont les valeurs minimales et maximales de pression à un endroit donné pendant la totalité de la durée de la pulsation. Ces pressions sont mesurées en pascals (Pa).
  L'intensité ultrasonore est la puissance transportée par l'onde ultrasonore divisée par la surface sur laquelle elle est appliquée. L'intensité I est exprimée en W/cm^2 et peut être reliée directement à la pression acoustique (P), la densité du milieu (ρ) et la vitesse de propagation au sein du milieu (c) par la formule suivante :

$$I = \frac{P^2}{\rho c}$$

  L'application des ultrasons est souvent discontinue en cas d'exposition humaine. Cette application discontinue permet d'éviter une destruction tissulaire liée à une surchauffe en lien avec la dissipation de l'énergie ultrasonore accumulée. L'application discontinue laisse le temps à l'énergie ultrasonore de se dissiper sans surchauffe. Ainsi, la durée d'émission de l'onde ultrasonore peut varier de quelques µs à quelques ms. Les émissions d'ondes ultrasonores sont ensuite répétées périodiquement à une fréquence donnée qui est habituellement exprimée en Hz (répétitions par seconde). Cette fréquence correspond à la fréquence de répétition des ondes ultrasonores et détermine le cycle d'utilisation des ultrasons. Le cycle d'utilisation donne la proportion de temps alloué à l'exposition ultrasonore effective.
  Les ultrasons de faible intensité sont compris entre 0,125 et 3 $W.cm^{-2}$. Les ultrasons de haute intensité ultrasonore sont compris entre 3 et plusieurs centaines de de $W.cm^{-2}$. Les ultrasons de haute intensité induisent des effets biologiques irréversibles dans les tissus. Les ultrasons de faible intensité induisent des changements réversibles qui n'entrainent pas de dommage tissulaire. Les ultrasons de faible intensité ultrasonore sont largement utilisés dans le domaine médical, notamment dans le domaine de l'imagerie. Leur intérêt diagnostic est largement reconnu dans les services de soins intensifs. Dans cette situation particulière, l'imagerie par ultrasons est employée en routine pour sa facilité d'emploi, son applicabilité au lit du malade, son large champ d'investigation (des explorations des appareils cardiologique, neurologique, abdominal et pleuropulmonaire sont possibles), son faible coût, son innocuité et ses performances. Ainsi l'échographie cardiaque est l'examen d'imagerie de référence pour explorer l'anatomie et le fonctionnement du cœur, et l'échographie

pleuropulmonaire est aussi performante que le TDM pour analyser les épanchements pleuraux (11).

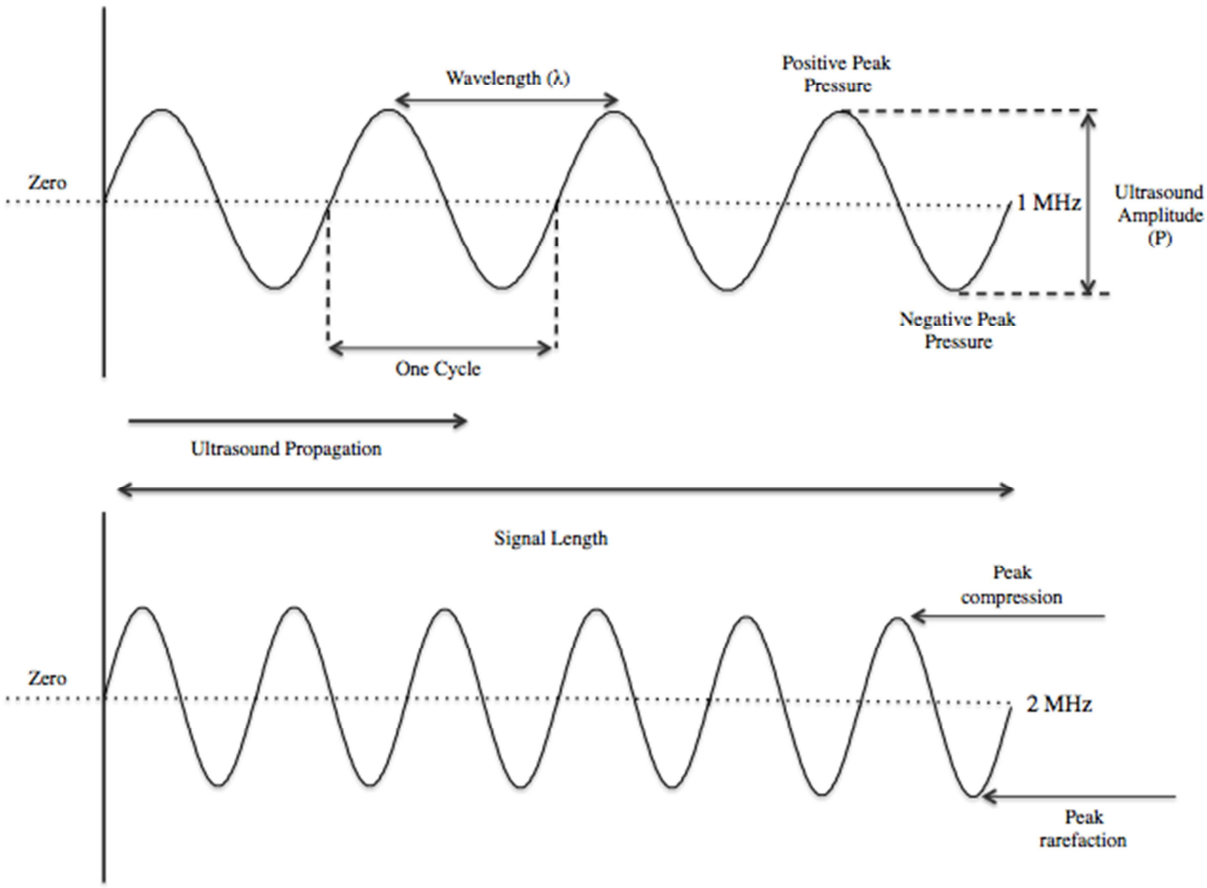


Figure I.1 - Représentation graphique des principales caractéristiques des ultrasons. La propagation des ultrasons peut être représentée sous forme d'onde sinusoïdale avec une pression (P), une longueur d'onde (λ), une fréquence (f), une période (T) et une vitesse de propagation (vitesse (c) + direction).

I.2.2 Description et utilisation des agents de contraste échographique

I.2.2.1 Description

Les agents de contraste échographique sont composés de bulles de gaz micrométriques encapsulées dans un manteau de matériaux biodégradables. Les gaz habituellement utilisés sont soit le nitrogène, soit le perfluorocarbone, car ce sont des gaz inertes, de haut poids moléculaire, et faiblement diffusibles. La capsule qui entoure ces gaz peut être composée de protéines, de phospholipides, de polymères, ou de sucres (Figure I.2) (12). Les phospholipides sont les plus utilisés car plus faciles à produire et plus échogènes (13).

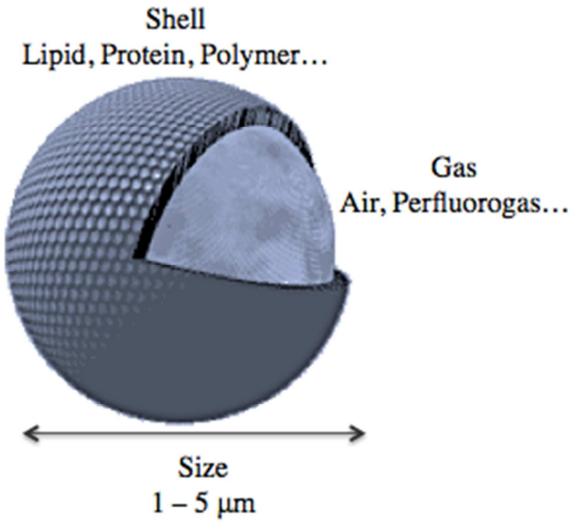


Figure I.2 - Illustration schématique d'une microbulle et de ses différents composants

Les agents de contraste échographique sont administrés par voie intraveineuse et circulent dans le secteur intravasculaire. Il n'y a pas, en situation normale, d'extravasation des agents de contraste échographique qui restent localisés dans le compartiment vasculaire (14,15). Du fait de leur relative petite taille (1 à 10 µm de diamètre), les agents de contraste échographique ne sont pas séquestrés dans les capillaires vasculaires qui mesurent de 8 à 10 µm de diamètre. Ainsi les microbulles ne sont donc pas trappées dans les capillaires pulmonaires (16) ou périphériques et peuvent donc avoir plusieurs cycles de circulation intravasculaire. La dégradation des agents de contraste échographique dépend du type de microbulles. Selon le fabriquant, les microbulles Vevo MicroMarker ont un temps de clairance de 10 à 20 minutes chez la souris. Pour les microbulles SonoVue, leur contenu gazeux est exhalé par le poumon environ 10 à 15 minutes après leur injection. Les composants de la coque de la microbulles sont métabolisés ou filtrés par le rein et éliminés par le foie (17). La durée de vie des microbulles, utile à la réalisation d'images, varie quant à elle de 2 à 10 minutes, en fonction des fabricants. Le Tableau I.1 (d'après (16)), présente les principales caractéristiques de différents agents de contraste échographique.

Nom	Fabricant	Matériau du manteau	gaz	Taille moyenne (µm)	% < 10 µm	Concentration (bulles/mL)	Temps d'imagerie
Optison	GE Healthcare	Albumine	C_3F_8	2,0-4,5	95%	5,0-8,0x10^8	2,5-4,5
Definity / Luminity	Lantheus Medical Imaging	Phospholipides	C_3F_8	1,1-3,3	98%	1,2x10^{10}	2,0-10,0
BR14	Bracco Diagnostics Inc.	Polyéthylène Glycol Phospholipides Acide Palmitique	C_4F_{10}	2 - 6	—	—	—
SonoVue (BR1)	Bracco Diagnostics Inc.	Phospholipides	SF_6	2,0-8,0	99% (<11mcm)	0,9-6,0x10^9	3,0-6,0
Vevo MicroMarker (MM1)	Bracco Diagnostics Inc.	Polyéthylène Glycol Phospholipides Acides gras	C_4F_{10} / N_2	2,3-2,9	—	2x10^9	—

Tableau I.1 - Caractéristiques techniques de différents agents de contraste échographique (usage commercial ou recherche exclusive) (d'après (16)).

I.2.2.2 Utilisation

Les microbulles sont utilisées en échographie pour leurs propriétés échogènes depuis de nombreuses années. La 1ère description de simples bulles d'air injectées par voie intraveineuse pour créer du contraste échographique a été faite en 1968 (18). Les microbulles présentent une haute échogénicité *in vivo* du fait d'une différence importante d'impédance acoustique entre leur noyau gazeux et le milieu liquide (sang) les environnant. La compressibilité élevée des microbulles par rapport au sang et aux tissus génère cette haute échogénicité. Ainsi les microbulles peuvent augmenter les ultrasons réfléchis de 20 à 30 dB (19). Cette réflexion augmentée des ultrasons offre une visualisation améliorée des vaisseaux, des zones hyper vascularisées et des cavités cardiaques. Ces propriétés permettent un usage clinique diagnostic : en échocardiographie, les agents de contraste échographique améliorent les images de contours des cavités cardiaques (20). En cancérologie, les agents de contraste échographique améliorent la détection des tumeurs hyper vascularisées, notamment hépatiques (21).

Par ailleurs, la destruction des microbulles par les ultrasons (à basse fréquence acoustique, ou à haute pression acoustique) est utilisée en pratique clinique pour réaliser des images destruction/reperfusion qui permettent d'évaluer le flux micro-vasculaire d'une région anatomique précise (13).

I.2.3 Effets physiques des ultrasons sur les agents de contraste échographique (Figure I.3)

Les microbulles sont très compressibles et sont capables d'osciller, c'est-à-dire de se contracter et de se dilater de manière répétée, en réponse aux changements de pression dus à une onde ultrasonore (contraction au moment du pic de pression positive, expansion au moment du pic de pression négative) (22). A de faibles pressions acoustiques (quelques dizaines de kPa), les oscillations sont linéaires et la fréquence des ultrasons émis par les microbulles est la même que la fréquence des ultrasons transmis (23). Ce phénomène est appelé « cavitation stable ». Pour des pressions acoustiques plus élevées, de l'ordre de centaines de kPa, l'oscillation des microbulles n'est plus sinusoïdale. Ceci crée des harmoniques différentes de celles générées par les tissus environnants. Ces harmoniques sont la signature des microbulles (23). Lorsque l'oscillation des microbulles n'est plus linéaire, le liquide environnant les microbulles est mis en mouvement générant ainsi des micro-courants acoustiques. Une augmentation plus importante de la pression acoustique entraine des contractions et des expansions instables des microbulles et aboutit au collapsus et à la destruction de ces microbulles (10). La destruction des microbulles entraine des ondes de choc lorsque les bulles sont dans un champ libre, c'est à dire libre de contact (24). Au contact d'une paroi cellulaire ou vasculaire, le collapsus des microbulles est asymétrique et conduit à l'apparition de jets de liquides frappant la paroi de contact (25). Ces phénomènes définissent la « cavitation inertielle ». Finalement ces phénomènes aboutissent à des modifications transitoires de la paroi cellulaire et des jonctions cellulaires, augmentant la perméabilité de ces dernières.

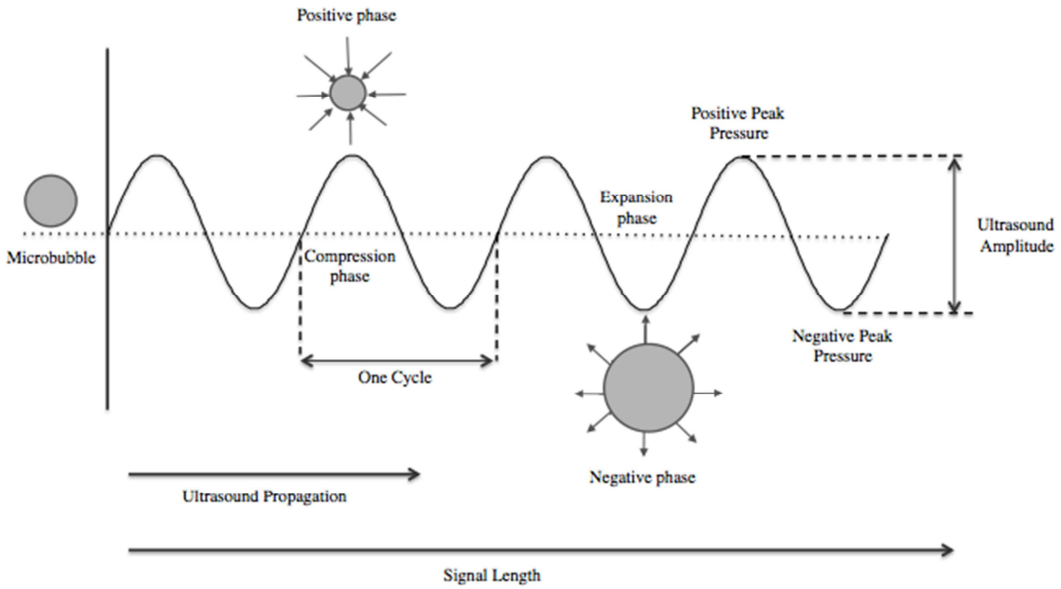


Figure I.3 - Dynamique des microbulles sous un champ ultrasonore. La microbulle oscille durant la phase positive (compression) et négative (expansion), conduisant à l'implosion de la microbulle et générant localement une élévation de température, ondes de choc, microstreamings et les microjets au voisinage de la membrane cellulaire.

I.2.4 Effets biologiques des interactions entre les ultrasons et les agents de contraste échographique sur les membranes cellulaires et les jonctions intercellulaires

I.2.4.1 Sonoporation et thérapie cellulaire

L'efficacité de la sonoporation a initialement été évaluée *in vitro* sur des cultures cellulaires, c'est à dire sans interface avec un endothélium. Les inclusions intracellulaires de gènes ont été parmi les premières expérimentations effectuées. La technique de sonoporation a démontré son efficacité pour augmenter l'inclusion de plasmides contenant un gène marqueur dans divers types cellulaires (26).

Des expérimentations ont été menées avec des molécules anticancéreuses. L'efficacité de la stratégie a également été démontrée puisqu'il a été constaté plus de morts cellulaires *in vitro* pour des cellules cancéreuses soumises à une chimiothérapie (doxorubicine) + microbulles + ultrasons que dans le groupe chimiothérapie seule. De manière intéressante dans cette expérimentation, le groupe microbulles + ultrasons ne comptait pas plus de morts cellulaires que le groupe contrôle (cellules cancéreuses seules), soulignant ainsi l'innocuité du traitement microbulles + ultrasons (27).

I.2.4.2 Sonoporation et thérapie extravasculaire

L'effet de la sonoporation a été évalué sur plusieurs tissus animaux *in vivo*, notamment sur la barrière hémato-encéphalique (28–32), le tissu prostatique(33), le foie , le rein (34) et le muscle (35). Au niveau cérébral, les microbulles activées par les ultrasons augmentent la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique par action sur les jonctions serrées (tight junctions) des cellules(28–30). Ceci permet d'augmenter la diffusion de chimiothérapie et réduit, chez le rat, la prolifération de cellule de glioblastome et augmente la survie des animaux (29) . Cette perméabilité accrue est transitoire et il n'est pas démontré d'atteinte des cellules neurale (31,32). Dans le tissu prostatique(33), les microbulles activées par les ultrasons permettent d'ouvrir les jonctions cellulaires. Dans le muscle squelettique, les microbulles activées par les ultrasons permettent d'augmenter la perméabilité des capillaires sanguins, laissant diffuser des microsphères de polymères de 100 nm de diamètre à travers l'endothélium (35).
Ainsi l'efficacité *in vivo* de la stratégie de sonoporation pour augmenter la diffusion de molécules thérapeutiques dans l'interstitium tissulaire animal, après avoir passé la barrière endothéliale a été démontrée (36). Chez l'Homme, un essai thérapeutique a utilisé la sonoporation pour augmenter de manière ciblée et efficace la diffusion de la gemcitabine au sein de tumeurs pancréatiques inopérables, offrant un allongement de la survie et surtout une meilleure tolérance de la chimiothérapie aux patients inclus (37).

I.2.5 Phénomènes actuellement avancés pour expliquer la capacité de la sonoporation à augmenter la diffusion de médicaments dans les cellules et les tissus (38) (Figure I.4)

I.2.5.1 Création de micropores dans la membrane cellulaire

Les micropores apparaissent dans la zone d'interaction entre les microbulles et la paroi cellulaire (39,40). La création de ces micropores dans la paroi cellulaire pourrait être liée aux phénomènes de cavitation stable, aux phénomènes de cavitation inertielle, à l'apparition de micro jets et la pénétration des microbulles dans la membrane cellulaire (16). La taille des micropores varie, selon les publications, de 1 nm à plus de 100 μm^2 (41,42). La taille des micropores semble liée aux mécanismes les ayant créés. Ainsi, la cavitation stable induirait les micropores les plus petits, tandis que les autres mécanismes, plus violents, seraient responsables de l'apparition des micropores les plus gros. La durée d'existence des micropores est variable, de quelques millisecondes à quelques secondes. Ainsi l'apparition de micropores est phénomène transitoire tant que leur taille n'excède pas 100 μm^2 (39,43,44). Il est démontré que les micropores permettent un passage direct de drogue au travers la membrane cellulaire (45).

I.2.5.2 Stimulation de l'endocytose locale

La vibration des microbulles à proximité des parois cellulaires augmente l'endocytose cellulaire, d'une part par une activation de canaux calciques mécano-sensibles par la vibration des microbulles aboutissant à une augmentation de la concentration de Ca^{2+} et donc à une hyperpolarisation membranaire, et d'autres part par des changements dans le cytosquelette (46). Le phénomène de stimulation de l'endocytose pourrait expliquer à la fois la perméabilité de la membrane cellulaire et des jonctions intercellulaires.

I.2.5.3 Action des micro-courants acoustiques sur les jonctions cellulaires

Les micro-courants acoustiques induits par l'oscillation des microbulles créent un effet de cisaillement sur les parois endothéliales vasculaires. Ce phénomène serait en cause dans l'augmentation de la perméabilité des jonctions cellulaires (47,48).

I.2.5.4 Autres phénomènes pouvant être impliqués

- Une augmentation transitoire de la température, due aux micro-courants acoustiques et aux jets de liquides survenant après le collapsus de la microbulle, pourrait altérer la fluidité de la membrane cellulaire et favoriser le passage de molécules (49).

- La production de radicaux libres induits par les microbulle soumises aux ultrasons pourrait être responsable de dommages cellulaires augmentant la perméabilité endothéliale (50).
- Enfin, l'association de ces différents mécanismes permettrait le passage de molécule au travers de la membrane cellulaire ou de la barrière endothéliale (16).

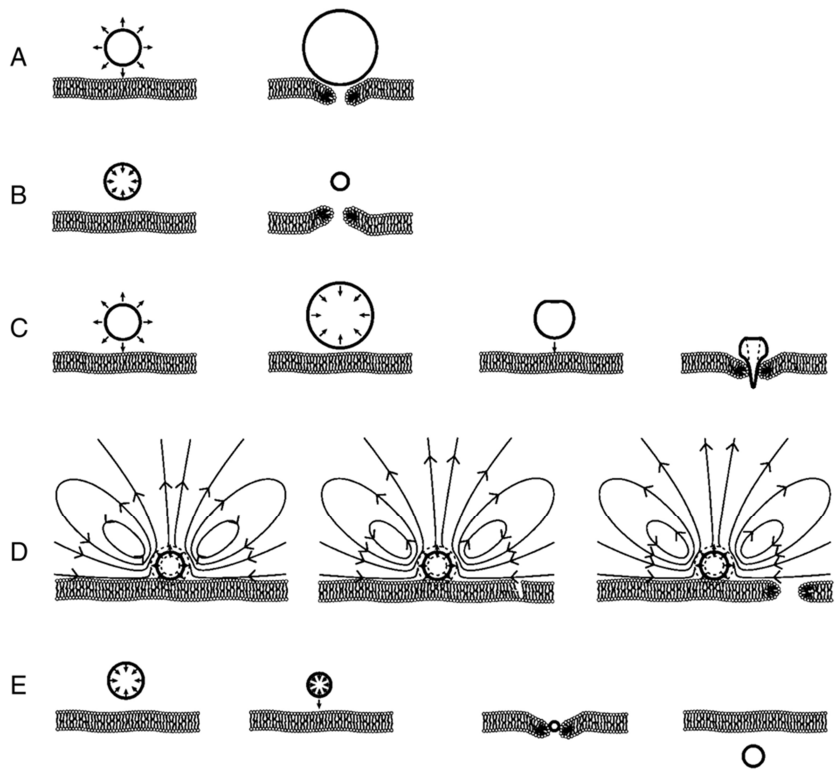


Figure I.4 - Cinq mécanismes de formation de pores provoquée par l'oscillation de microbulles activées par les ultrasons.
(A) Enfoncement: Pendant sa phase d'expansion, la microbulle pourrait toucher la membrane cellulaire, la repousser au point de l'ouvrir.
(B) Étirement: Pendant la phase de contraction d'une microbulle oscillante, le plasma qui viendrait remplir le vide laissé par la bulle contractée pourrait entrainer la membrane cellulaire vers la microbulle et éventuellement rompre la membrane plasmatique.
(C) Jaillissement: Le jaillissement est l'effondrement asymétrique de la bulle, créant une excroissance pointue en forme d'entonnoir de la bulle passant à travers la membrane cellulaire.
(D) Streaming: Si une microbulle est attachée à une membrane cellulaire, le courant de liquide autour de la bulle oscillante pourrait créer suffisamment de forces de cisaillement pour entrainer une rupture de la paroi cellulaire.
(E) Translation: En raison des forces de radiations, les microbulles encapsulées dans des parois lipidiques pourrait se translater à travers la membrane cellulaire. La microbulle pourrait perdre une partie de sa capsule en passant à travers la membrane.

I.3 La sonoporation comme vecteur de l'antibiothérapie ciblée

Sur le modèle des chimiothérapies, la sonoporation, en ciblant le tissu siège de l'infection, pourrait permettre d'augmenter la diffusion de l'antibiotique au sein du tissu infecté, et ainsi en renforcer l'action. Une autre application potentielle de la sonoporation pourrait être de diminuer la dose d'antibiotique administrée par voie systémique tout en maintenant l'efficacité du médicament. En autorisant une diminution de la dose systémique d'antibiotique, la sonoporation permettrait de diminuer la toxicité systémique des antibiotiques, principalement pour ceux ayant un index thérapeutique étroit. Quelques modèles *in vitro* ont documenté que la sonoporation augmentait l'efficacité des antibiotiques sur un film bactérien (51)(52). *In vivo*, sur un modèle de rats sains, Y. Shang et al. ont démontré que la pénétration d'antibiotique (céfuroxime) était améliorée dans le tissu prostatique par la sonoporation. Dans cette expérimentation, 4 groupes de rats étaient constitués de manière aléatoire. Le premier groupe (Groupe BC) recevait une injection intraveineuse de chlorure de sodium (0,1 $mL.kg^{-1}$) et un simulacre d'administration d'ultrasons sur la prostate. Le deuxième groupe (Groupe MB) recevait des microbulles par voie intraveineuse (0,1 $mL.kg^{-1}$) et un simulacre d'administration d'ultrasons sur la prostate. Le troisième groupe (Groupe US) recevait une injection intraveineuse de chlorure de sodium (0,1 $mL.kg^{-1}$) et une sonification de la prostate. Le quatrième groupe (Groupe MMUS) recevait des microbulles par voie intraveineuse (0,1 $mL.kg^{-1}$) et une sonification de la prostate. Ensuite, tous les rats recevaient une injection intraveineuse de céfuroxime en bolus (60 $mg.kg^{-1}$). Quinze minutes après l'injection, les rats étaient sacrifiés, les prostates prélevées, séchées puis préparées en un homogénat de tissu et conservées à -80°C. La concentration de céfuroxime dans le tissu prostatique était ensuite mesurée en chromatographie liquide. Les résultats sont présentés dans le Tableau I.2. Il n'y avait pas de différence statistiquement significative entre les Groupes BC, MB et US. Il y avait une différence statistiquement significative entre le Groupe MMUS et les Groupes BC, MB et US (36).

Sur ces arguments, la diffusion des antibiotiques devrait pouvoir aussi être augmentée dans le tissu pulmonaire grâce à la sonoporation.

	Groupe BC	Groupe MB	Groupe US	Groupe MMUS
Concentration en céfuroxime	5,48 ± 4,19	5,95 ± 3,74	8,94 ± 11,26	16,58 ± 7,75

Tableau I.2 - Résultats de l'étude de Y. Shang et al.(36) **: Concentration de céfuroxime dans le tissu prostatique sec (exprimé en $\mu g.mg^{-1}$).**

I.4 Objectifs de la thèse

I.4.1 Développement du modèle animal

Le premier objectif de ce travail de thèse a été de développer un modèle animal permettant l'étude de l'impact de la sonoporation sur la diffusion d'antibiotiques dans le parenchyme pulmonaire condensé ventilé mécaniquement.

I.4.2 Validation du concept

Les objectifs suivants ont été d'évaluer l'impact de la sonoporation sur la diffusion des principaux antibiotiques utilisés dans le traitement des PAVM (aminosides, aminoglycoside, bétalactamine) dans le parenchyme pulmonaire condensé ventilé mécaniquement.

Chapitre II - Développement du modèle animal

II.1 Choix et développement du modèle animal

II.1.1 Choix de l'animal

Les modèles animaux fréquemment utilisés dans les études sur les antibiotiques et sur le poumon sont soit de petits animaux comme la souris, le rat, le lapin, soit de grands animaux comme le porc, le mouton, ou les primates. Les grands animaux présentent l'avantage, du fait de leur taille, d'avoir des poumons facilement accessibles aux ultrasons par voie externe (trans-pariétale), idéal pour ce type d'étude. Mais ils sont coûteux, et nécessitent une structure spécifique d'hébergement. Par ailleurs, notre laboratoire avait déjà développé et validé une petite sonde adaptée à la sonoporation de tumeurs cutanées ou du cerveau de petits animaux, avec un faisceau ultrasonore étroit et une focale peu profonde. Cette sonde n'était pas adaptée pour de grands animaux. Le développement d'une nouvelle sonde pour de gros animaux aurait été coûteux en temps et en moyens financiers. Notre choix s'est donc porté sur le petit animal. La souris, le rat et le lapin répondaient en partie au cahier des charges car leur hébergement est simple à mettre en œuvre, leur coût d'achat et d'hébergement est peu élevé. Chez la souris et le rat, la ventilation mécanique et la pose de cathéters vasculaires permettant des prélèvements sanguins répétés est techniquement difficile. De plus, leur faible masse sanguine limite beaucoup le nombre et le volume de prélèvements sanguins. Le lapin était un modèle animal déjà utilisé par notre équipe pour des expérimentations antérieures sous anesthésie générale avec ventilation mécanique. La ventilation mécanique du lapin peut être assurée par les machines de ventilation mécanique utilisées en anesthésie pédiatrique humaine. Le contrôle des voies aériennes supérieures du lapin est réputé difficile. La filière oro-laryngée, longue et fine, et les incisives proéminentes empêchent une intubation orotrachéale par les techniques classiques en laryngoscopie directe. Le contrôle des voies aériennes supérieures du lapin a donc été réalisé par une trachéotomie.

II.1.2 Développement du modèle de poumon inondé

Les aspects échographiques des pneumopathies sont décrits de longue date (53). Le poumon sain est un organe pneumatisé. Les multiples interfaces air/tissus désorganisent et ralentissent la majeure partie des ultrasons. L'image ultrasonore

obtenue est alors essentiellement artéfactuelle. L'analyse de ces artefacts permet de différentier le poumon sain (artefacts avec des lignes A exclusives) du poumon œdématié (artefacts avec des lignes B exclusives). En cas de pneumopathie, le comblement des alvéoles pulmonaires par du liquide (sécrétions bronchiques, réaction inflammatoire du tissu pulmonaire engendrant un œdème localisé, apparition de pus suite à l'infection bactérienne) rend le parenchyme pulmonaire échogène dans la zone infectée. Cette zone est généralement localisée à un des lobes inférieurs en réanimation, voire aux deux lobes inférieurs. Il est impossible que de tels signes de condensation soient observés bilatéralement sur toute l'aire pulmonaire, car une telle atteinte serait non viable (absence d'oxygénation possible). La zone de poumon infecté prend alors l'aspect échographique d'un organe plein, tel que le foie. Son aspect est néanmoins plus hétérogène, car ponctué de petites zones hyperéchogènes variant en taille et intensité au cours du cycle respiratoire. Ces petites zones hyperéchogènes sont générées par des divisions bronchiques en coupe axiale, remplies de sécrétions bronchiques mêlées de bulles d'air. Cette « émulsion » se comporte alors comme des microbulles de contraste, et apparait donc comme hyperéchogène. Une étude chez des patients sous anesthésie générale (et donc sous ventilation mécanique) a décrit ces différents stades échographiques lors de lavages broncho-alvéolaires (54). Un lavage broncho-alvéolaire était réalisé sur un seul poumon à la fois, le patient en décubitus latéral (le poumon à inonder étant vers le bas). Il consistait en l'injection sous fibroscopie de sérum physiologique stérile dans la bronche souche déclive, jusqu'à l'inonder (ce qui nécessitait quelques centaines de mL), suivie de la réaspiration de ce liquide par le fibroscope. Les images étaient tout à fait similaires à celles visibles en pratique lors de pneumopathies.

Pour étudier les PAVM, trois options s'offraient à nous : créer un modèle de PAVM chez le lapin, générer une situation ayant le même aspect échographique que le poumon infecté, avec deux possibilités : atélectasie ou inondation pulmonaire unilatérales.

Créer une infection uni-pulmonaire bactérienne dans notre modèle de lapin est complexe car il faut maintenir le lapin en vie, sous ventilation mécanique et anesthésie générale pendant plusieurs jours. Ceci nécessite une surveillance rapprochée de jour comme de nuit, durant toute la durée des expériences. Un tel modèle de réanimation longue de lapins ne pouvait pas être mis en œuvre localement sur un plan matériel et humain.

La deuxième option consistait à générer une situation ayant un aspect échographique proche du poumon infecté. Une atélectasie consiste à vider d'air un poumon. Elle survient lorsque le parenchyme pulmonaire n'est plus ventilé. Son aspect échographique est proche de la pneumopathie. Il en diffère par le caractère beaucoup plus homogène de la condensation, et la quasi absence de point hyperéchogène. Au

bloc opératoire en chirurgie humaine, il est parfois nécessaire de ne pas ventiler un poumon, par exemple en cas de chirurgie pulmonaire. Pour obtenir l'arrêt de la ventilation d'un poumon, il est nécessaire d'utiliser du matériel dédié comme des sondes de ventilation uni-pulmonaire ou des bloqueurs bronchiques. Les sondes de ventilation uni-pulmonaire possèdent deux canaux de ventilation indépendants. Il est possible de ne pas ventiler le poumon opéré tout en maintenant la ventilation du poumon sain, ce qui permet une oxygénation suffisante du sang du malade. Les bloqueurs bronchiques sont des ballonnets qui sont installés dans la bronche souche du poumon à affaisser (sous contrôle fibroscopique) et gonflés lorsque nécessaire afin d'interrompre la ventilation. Ces deux types de dispositifs sont adaptés à l'anatomie humaine adulte, mais pas au nouveau-né, et donc pas au lapin. De plus, contrairement à l'homme, l'anatomie du lapin ne permet pas aisément une intubation sélective. La trachée du lapin est longue, les bronches souches droites et gauches sont courtes à angle ouvert, avec une division lobaire très proximale. Ceci ne laisse pas la place pour des ballonnets permettant la ventilation uni-pulmonaire. La possibilité d'utiliser un bloqueur bronchique a été testée avec des sondes de swan ganz pédiatriques. Elles sont munies d'un petit ballonnet et ont un diamètre adapté à la taille de la trachée et des bronches souches du lapin. Elles ont été testées ici sans succès du fait de l'anatomie trachéo-bronchique du lapin : la bronche souche étant trop courte, le ballonnet du bloqueur faisait saillie dans la trachée et obstruait tout l'arbre bronchique.

La troisième option consistait à mimer l'aspect du poumon infecté en inondant un poumon. L'inondation d'un poumon entraine un comblement des alvéoles pulmonaires, et finalement le poumon inondé présente un aspect d'imagerie échographique proche de celui des PAVM (54). L'inondation permet la diffusion des ultrasons dans le parenchyme pulmonaire, et l'obtention d'images échographiques de très bonne qualité (55). L'inondation pulmonaire semble simple à réaliser techniquement. Un cathéter de petit calibre, type cathéter de péridurale, est inséré dans la trachée, entre la sonde endotrachéale et la trachée. Son extrémité est positionnée juste au-dessus de la carène (où la trachée se divise en 2 bronches souches). Ce cathéter permet l'injection du liquide d'inondation pulmonaire. La position du lapin en décubitus latéral avant l'administration du liquide permet d'inonder sélectivement le poumon déclive. C'est cette troisième option qui a été retenue pour la réalisation de nos expérimentions. Il était possible d'inonder sélectivement soit le poumon droit, soit le poumon gauche. Le poumon droit a été choisi car il a un contact moins étroit avec le cœur que le poumon gauche, ce qui limite théoriquement le risque de soumettre le cœur aux ultrasons. La sonification du cœur n'était pas souhaitée : elle risquait de détruire les microbulles dans le ventricule droit, avant leur passage trans pulmonaire. Cependant, même en privilégiant le poumon droit pour les expérimentations, il est apparu qu'il existait un risque important, du fait de l'anatomie du lapin, de soniquer le cœur par l'administration trans-pariétale des ultrasons. En effet, le cœur du lapin, bien qu'ayant une position légèrement déviée sur

la gauche, est beaucoup plus médial que le cœur humain. De plus, le cœur est volumineux, puisqu'il occupe 74% de la hauteur et 88% de la largeur du thorax (56). Pour sonifier seulement du poumon, il faudrait orienter le faisceau ultrasonore d'avant en arrière. Le thorax du lapin est très profilé (avec un grand axe antéro-postérieur bien supérieur). La forme du thorax du lapin ne permet donc pas une sonification antéropostérieure. Il était donc nécessaire d'avoir un accès direct au poumon droit pour le soniquer en évitant le cœur. La seule alternative a été d'appliquer les ultrasons par voie interne, via une laparophrénotomie. Le choix de travailler sur le poumon droit en a été renforcé car l'accès au poumon gauche par laparophrénotomie est plus risqué et plus complexe, du fait de la présence du cœur. L'application directe au poumon droit des ultrasons, plutôt que par voie trans-pariétale, a été également guidée par un travail réalisé par notre équipe INSERM 1253. Dans ce travail, qui consistait à évaluer l'absorption ultrasonore de la paroi thoracique de lapin, l'atténuation de l'amplitude négative à 1 MHz des ondes ultrasonores était de 51 % [32-60] en moyenne et de 64 % [43-70] au maximum pour les côtes, et de 28 % [18-39] en moyenne et de 40 % [32-51] au maximum pour les espaces intercostaux (57). Ces résultats, qui montrent une absorption non négligeable des ondes ultrasonores par la paroi thoracique du lapin, viennent renforcer la nécessité d'une application par voie interne des ultrasons afin de délivrer à tous les lapins la même quantité d'ultrasons et à chaque lapin une dose maximale d'ultrasons.

Le choix du soluté d'inondation s'est porté sur le chlorure de sodium dans notre modèle. L'albumine et le chlorure de sodium ont été initialement testés comme produits d'inondation. L'avantage théorique de l'albumine est qu'il n'y a pas de passage au travers de la membrane alvéolo-capillaire si elle est intacte, ce qui permet une persistance du produit dans le poumon, donc une durée accrue de l'inondation. Mais l'albumine est plus coûteuse et surtout est un produit dérivé du sang, ce qui la rend plus compliquée à se procurer que le chlorure de sodium, et expose à plus de réactions inflammatoires pouvant perturber notre modèle. Par ailleurs les comparaisons initiales effectuées dans notre expérimentation ne montraient pas de prolongation nette de l'effet de l'albumine par rapport au chlorure de sodium. Enfin, le chlorure de sodium a été utilisé *in vivo* pour inonder des poumons de porc dans deux études avec de très bon résultats (en imagerie et en thérapeutique utilisant les ultrasons) et avec une bonne tolérance clinique (55,58). Le volume de chlorure de sodium nécessaire à l'inondation pulmonaire a été initialement défini en fonction du poids. Dans un travail précédent (59), le volume administré pour inonder le poumon était de 3 millilitres par kilogramme de poids. A partir de ces données, le volume nécessaire à l'inondation pulmonaire a été titré par contrôle échographique de l'inondation. Le contrôle échographique a permis de confirmer la bonne inondation du poumon droit. Il a également permis de confirmer l'absence d'inondation involontaire du poumon gauche. La titration a enfin permis d'arrêter que le volume de liquide d'inondation idéal était de 9 mL. Un volume plus

important entrainait des désaturations importantes pouvant conduire à la mort de l'animal par bradycardie hypoxique. Un volume plus faible ne permettait pas d'avoir une inondation pulmonaire totalement satisfaisante. Enfin, la vitesse d'injection du liquide d'inondation est apparue comme un paramètre important. En effet, un bolus rapide entrainait une inondation brutale pouvant conduire à une désaturation profonde et à la mort de l'animal par bradycardie hypoxique. Le liquide d'inondation devait être injecté sur une durée de 30 secondes environ pour limiter les désaturations profondes, et leurs conséquences.

II.1.3 Sacrifice de l'animal, techniques de prélèvement tissulaires et préparation des broyats

Le sacrifice de l'animal était nécessaire à la fin de l'expérimentation, sous anesthésie générale, par exsanguination via la canule artérielle. Une fois la mort de l'animal constatée, définie comme l'absence de battements cardiaque pendant plus d'une minute, la machine de ventilation mécanique était arrêtée.

Pour le prélèvement pulmonaire, une incision cervico-thoracique était réalisée. Les deux poumons, la trachée, les bronches souches étaient disséqués et prélevés en bloc. Les faces ventrale et dorsale étaient photographiées. Puis les bronches étaient séparées du reste du parenchyme pulmonaire.

Pour les prélèvements musculaires, une incision de la peau a permis le prélèvement d'échantillons de muscle de 5 à 10 mm de diamètre, sans séreuse. Un premier prélèvement de tissu musculaire était effectué sur une patte antérieure de l'animal, dans le centre de l'aire soumise aux ultrasons préalablement repérée par 4 aiguilles. Un deuxième prélèvement était effectué sur l'autre patte antérieure, dans une zone similaire au premier prélèvement. La patte soumise aux ultrasons était tirée au sort.

Tous les prélèvements tissulaires étaient ensuite pesés à l'aide d'une balance micrométrique avant d'être broyés mécaniquement dans 5 mL de chlorure de sodium par l'ultra-Turrax T10 (IKA-Werke, GMBsH & Co., Staufen, Germany) afin d'obtenir un broyat homogène.

II.1.4 **Expérimentation 1** : Effet du décubitus latéral sur la concentration parenchymateuse pulmonaire d'antibiotiques (Amikacine)

Expérimentation 1 : Effet du décubitus latéral sur la concentration parenchymateuse pulmonaire d'antibiotiques (Amikacine)

L'effet du décubitus latéral sur la diffusion pulmonaire d'un antibiotique intraveineux n'est pas connu. En décubitus latéral, le poumon déclive est mieux perfusé et moins bien ventilé

que le poumon non déclive. Dans le poumon non déclive, la proportion de zones de West de type 1 augmente. Ce sont des zones pulmonaires dans lesquelles les alvéoles sont ventilées mais non perfusées durant tout le cycle respiratoire. Les antibiotiques administrés par voie intraveineuse ne pourront donc pas aller diffuser dans le parenchyme pulmonaire de ces zones de type 1. A l'inverse, l'hyper-vascularisation relative observée dans le poumon déclive pourrait favoriser la diffusion des antibiotiques intraveineux au sein du parenchyme pulmonaire, en maintenant en permanence une forte concentration intravasculaire en antibiotique. Sous ventilation mécanique, ces phénomènes sont accrus. Ainsi le décubitus latéral durant l'administration intraveineuse de l'antibiotique pourrait favoriser une augmentation de la concentration de ce dernier dans le parenchyme pulmonaire déclive. L'objectif de la présente expérimentation était d'évaluer, dans un modèle animal de lapin sous ventilation mécanique, l'influence du décubitus latéral sur la concentration d'amikacine dans le parenchyme des poumons déclive et non déclive.

Matériels et méthodes

Douze lapines adultes blanches, de race New Zealand, en bonne santé, de poids médian 3125 g (de 2400 à 3662 g) ont été anesthésiées. L'anesthésie de chaque lapin a été induite par inhalation dans un masque d'Isoflurane à 3% (Isoflurane Belamont, Paris, France). Une fois anesthésiée, la lapine était installée en décubitus dorsal sur une table radiante. La température corporelle était monitorée en continu par une sonde thermique rectale. La fréquence cardiaque et l'oxymétrie de pouls étaient monitorées en continu par un oxymètre de pouls portatif PC-66V (Shenzhen creative industry, Shenzhen, China). Un cathéter veineux était inséré dans une veine marginale d'une oreille, un bolus intraveineux d'atropine était injecté (100 µg) et une perfusion intraveineuse continue de sufentanil (3 $\mu g.h^{-1}$) et de propofol (15 $mg.h^{-1}$) était débutée. Après réalisation d'une trachéotomie, une sonde d'intubation (2,5 mm de diamètre interne, sans ballonnet) était positionnée dans la trachée. Le lapin était ventilé mécaniquement (Servo 300A, Siemens Elema, Solna Sweden) en mode volume contrôlé (fraction inspirée en oxygène : 1,0 ; volume courant : 8 $mL.kg^{-1}$; zéro pression positive télé expiratoire ; fréquence respiratoire : 50 à 65 cycles par minute). Une relaxation musculaire était obtenue par des bolus intraveineux itératifs d'atracurium (10 mg). Ensuite l'injection intraveineuse à la seringue électrique d'amikacine (Mylan SAS, Saint Priest, France, 15 $mg.kg^{-1}$ dans 5 mL de chlorure de sodium pendant 30 minutes), en accord avec l'étude de Gérard et al. (60), était débutée. Le début de l'administration de l'amikacine était noté comme T0. Le lapin était positionné en décubitus latéral droit ou gauche de façon aléatoire (liste de randomisation préalablement générée par ordinateur)

dès T0. Quatre-vingt-dix minutes après le début de l'injection d'amikacine (T90), le lapin était exsanguiné par un cathéter inséré dans une artère carotidienne, via l'incision de la trachéotomie. Après réalisation d'une incision cervico-thoracique, les 2 poumons et l'arbre trachéobronchique étaient disséqués et extraits en bloc. Les faces dorsales et ventrales étaient photographiées avant que les bronches ne soient retirées. Les lobes de chaque poumon étaient séparés avec précaution. Le lobe caudal + le lobe azygos droit, le lobe caudal gauche, le lobe crânial gauche, le lobe crânial + le lobe moyen droit formaient les 4 échantillons tissulaires prélevés. Tous les échantillons étaient pesés sur une balance micrométrique. Les échantillons tissulaires étaient ensuite broyés après l'ajout de 5 mL de chlorure de sodium (T10 ultra-Turrax), congelés et stockés à -20°C avant les analyses pharmacologiques.

Après décongélation, les prélèvements de tissu pulmonaire étaient homogénéisés à l'aide d'un disperseur puis soumis à 10 minutes d'ultrasonification. Après centrifugation (2000 tours.min^{-1} pendant 10 min), la concentration d'amikacine était déterminée dans le surnageant par immunopolarisation (Amikacin fluorescence polarisation immunoassay, Cobas Integra 400+, Roche Diagnostics, Basel Switzerland).

Statistiques

Le critère principal de jugement était la concentration d'amikacine dans le surnageant pulmonaire. Les concentrations d'amikacine ont été comparées entre les surnageants des Poumons Non Déclives et ceux des Poumons Déclives grâce à un test de Wilcoxon, chaque lapin étant son propre contrôle. Les concentrations d'amikacine ont ensuite été comparées entre les lobes inférieurs déclives et non déclives, et les lobes supérieurs déclives et non déclives avec le même test. Les résultats sont exprimés en médiane [1er quartile – 3ème quartile] ou en valeurs absolues. Un $p < 0,05$ était considéré comme statistiquement significatif. Les tests statistiques ont été réalisés grâce à SPSS 25 (IBM France statistics, Bois Colombes, France).

Résultats

Pour des raisons logistiques, les 3 dernières expérimentations (2 en décubitus latéral droit et 1 en décubitus latéral gauche) n'ont pas pu être dosées lors de l'écriture de ce document. Les résultats portent donc sur 9 lapines, 4 en décubitus latéral droit et 5 en décubitus latéral gauche. Les résultats sont présentés dans la Figure II.1. La concentration médiane en

amikacine dans le surnageant était de 8,21 [7,91 – 9,02] mg.L^{-1} pour les Poumons Déclives, et de 8,48 [8,02 – 8,89] mg.L^{-1} pour les Poumons Non Déclives (p=0,343).

La concentration médiane en amikacine dans le surnageant était de 8,58 [8,14 – 9,84] mg.L^{-1} dans les lobes inférieurs Déclives, et de 8,80 [7,95– 9,23] mg.L^{-1} dans les lobes inférieurs Non Déclives (p=0,173).

La concentration médiane en amikacine dans le surnageant était de 8,41 [6,97 – 10,78] mg.L^{-1} dans les lobes inférieurs Déclives, et de 8,35 [7,50 -8,44] mg.L^{-1} dans les lobes inférieurs Non Déclives (p=0,374).

Aucune modification macroscopique des poumons, comme la survenue d'œdème ou d'atélectasie, n'était visible sur les Poumons Déclives ou sur les Poumons Non Déclives.

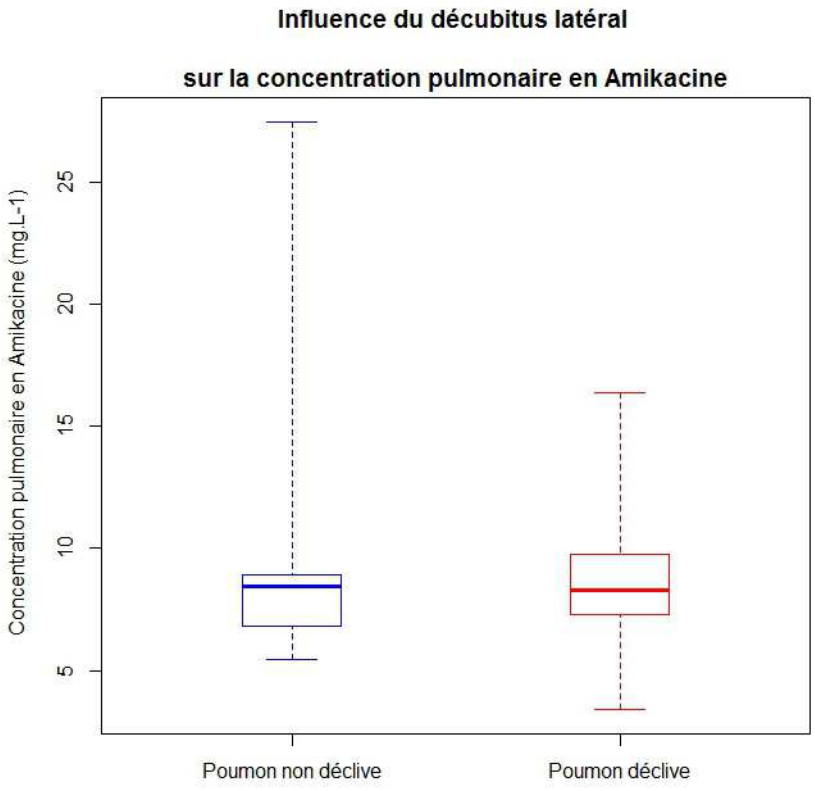


Figure II.1 - Effet du décubitus latéral sur la concentration pulmonaire parenchymateuse en amikacine (p=0,87).

Discussion

Les concentrations d'amikacine dans le surnageant des broyats des Poumons Non Déclives et des Poumons Déclives ne sont pas statistiquement différentes, tout comme au sein des lobes pulmonaires.

Ces résultats invalident l'hypothèse selon laquelle la position en décubitus latéral aurait pu permettre une meilleure diffusion d'un aminoside du secteur intraveineux vers le parenchyme pulmonaire déclive en pratique clinique. Pourtant, de nombreuses conditions ont cherché à favoriser ce phénomène. La position des lapins était un vrai décubitus latéral, et pas une simple inclinaison latérale du plan du support, comme cela est souvent fait en clinique pour des raisons pratiques. La ventilation mécanique favorise la création de zones de West de type 1 dans le poumon non déclive. Ceci diminue donc théoriquement le débit sanguin dans les branches de l'artère pulmonaire non déclive. Mécaniquement, cela devrait réorienter une partie du débit cardiaque vers l'artère pulmonaire déclive. L'étude séparée des lobes supérieurs et inférieurs aurait pu montrer un effet prédominant ou exclusif pour les lobes supérieurs. En effet, la survenue de zones de West de type 1 est plus attendue dans les lobes supérieurs, qui sont moins contraints que les lobes inférieurs par la gravité, et moins impactés par les compressions potentielles des organes abdominaux et/ou du cœur. Enfin, cette expérience a été menée en maintenant le décubitus latéral durant 90 minutes, ce qui est très long en pratique clinique. Cette durée a aussi été choisie pour couvrir toute la perfusion de l'antibiotique, et ce jusqu'à 30 minutes après la survenue du pic de concentration sanguine de l'amikacine (cf. Figure II.2).

Les limites de ce travail sont que le dosage a été réalisé sur le surnageant de broyat de poumon. Un dosage dans un lavage broncho alvéolaire (LBA) aurait eu plus de relevance clinique. Néanmoins, il est peu probable qu'une différence importante existe dans le LBA sans différence dans le broyat de poumon total. L'autre limite est que cette conclusion est valide seulement pour les aminosides. On ne peut pas exclure que d'autres classes d'antibiotiques donnent des résultats différents.

Ainsi, un décubitus latéral d'une durée de 90 minutes n'entraîne pas de hausse significative de la concentration d'amikacine dans le poumon en position déclive d'un modèle de lapin.

Sur un plan méthodologique, ces données viennent renforcer la validité de notre modèle pour les expérimentations suivantes. En effet, la position en décubitus latéral droit sera utilisée dans la suite de nos expérimentations, le poumon déclive étant toujours le poumon traité par les ultrasons. Ces résultats permettent d'écarter la critique qui attribuerait une potentielle augmentation de la concentration d'antibiotiques dans le parenchyme pulmonaire insonifié par le fait qu'il soit en position déclive.

II.1.5 Choix des antibiotiques et **Expérimentation 2** : Étude pharmacocinétique de l'amikacine chez le lapin femelle adulte New Zealand

Le choix des antibiotiques s'est porté sur des antibiotiques ayant un risque important de toxicité systémique du fait de leur index thérapeutique étroit (amikacine, vancomycine), ayant une mauvaise diffusion dans le parenchyme pulmonaire (amikacine, vancomycine), et ayant un intérêt clinique dans le traitement des PAVM, notamment pour les PAVM causées par des germes résistants aux antibiothérapies conventionnelles (amikacine, vancomycine, ceftazidime).
L'amikacine a été l'antibiotique étudié en premier lieu. Son efficacité est dépendante de sa concentration au pic plasmatique (efficacité concentration-dépendante). Sa pénétration dans le tissu pulmonaire est médiocre (38% du taux sérique) (60). Dans l'optique d'augmenter la concentration maximum d'amikacine dans le tissu pulmonaire, il fallait appliquer la sonoporation au moment du pic plasmatique d'amikacine. Il fallait pour cela décrire la pharmacocinétique de l'amikacine chez le lapin New Zealand. Bien que l'étude de Gérard et al. faisait état d'une étude de pharmacocinétique antérieure (60), aucune donnée utilisable pour notre étude n'était disponible dans la littérature à ce sujet. Nous avons donc été amenés à étudier la pharmacocinétique de l'amikacine chez le lapin femelle adulte de race New Zealand anesthésié. La méthodologie et les résultats de cette étude pharmacocinétique sont présentés ci-après.
La vancomycine et la ceftazidime ont été étudiées dans un second temps. L'efficacité de ces antibiotiques est dépendante du temps. L'objectif était donc d'appliquer les ultrasons au plateau de concentration de l'antibiotique. Après discussion avec les pharmacologues, il a été convenu qu'il n'était pas nécessaire de réaliser d'étude pharmacocinétique avant d'envisager l'administration d'une sonoporation pour ces antibiotiques.

Expérimentation 2 : Étude pharmacocinétique de l'amikacine chez le lapin femelle adulte New Zealand

Matériels et méthodes

Onze lapines adultes blanches, de race New Zealand, en bonne santé, pesant entre 3150 et 3750 g ont été anesthésiées. L'anesthésie de chaque lapine a été induite par inhalation dans un masque d'Isoflurane à 3% (Isoflurane Belamont, Paris, France). Une fois anesthésiée, la lapine était installée en décubitus dorsal sur une table radiante. La température corporelle était monitorée en continu par une sonde thermique rectale. La fréquence cardiaque et l'oxymétrie de pouls ont été monitorées en continu (oxymètre de pouls portatif PC-66V,

Shenzhen creative industry, Shenzhen, China). Un cathéter veineux était positionné dans une veine marginale d'une oreille, un bolus intraveineux d'atropine était injecté (100 µg) et une perfusion intraveineuse continue de sufentanil (3 $\mu g.h^{-1}$) et de propofol (15 $mg.h^{-1}$) était débutée. Après réalisation d'une trachéotomie, une sonde d'intubation (2,5 mm de diamètre interne, sans ballonnet) était positionnée dans la trachée. Le lapin était ventilé mécaniquement (Servo 300A, Siemens Elema, Solna Sweden) en mode volume contrôlé (fraction inspirée en oxygène : 1,0 ; volume courant : 8 $mL.kg^{-1}$; aucune pression positive n'était appliquée en fin d'expiration ; fréquence respiratoire : 50 à 65 cycles par minute avec pour objectif de maintenir la pression artérielle en CO2 dans les limites de la normale).
Une relaxation musculaire était obtenue par des bolus intraveineux itératifs d'atracurium (10 mg). Un cathéter artériel était positionné dans l'artère fémorale droite du lapin afin d'obtenir un monitorage continu de la pression artérielle et de pouvoir effectuer des prélèvements sanguins (GE Datex-Ohmeda S/5, GE Datex Ohmeda, Helsinki, Finland). Ensuite l'injection intraveineuse à la seringue électrique d'amikacine (Mylan SAS, Saint Priest, France, 15 $mg.kg^{-1}$ dans 5 mL de chlorure de sodium pendant 30 minutes, en accord avec l'étude de Gérard et al. (60), était débutée. Le début de l'administration de l'amikacine était noté comme T0. Des prélèvements sanguins étaient effectués à T30 (arrêt de l'administration d'amikacine), T60, T90, T150, T210 et T510 minutes. Les lapins étaient ensuite sacrifiés par exsanguination par le cathéter artériel.
Les prélèvements sanguins étaient conservés au frigo à 4° C pendant une à deux heures, laissant ainsi un caillot se former. Les tubes contenant le sang total étaient ensuite centrifugés à 2000 tours par minute pendant 10 minutes, et le sérum ainsi obtenu était prélevé. Un dosage par immunopolarisation de fluorescence de l'amikacine (Cobas Integra 400+, Roche Diagnostics, Basel Switzerland) était effectué sur le sérum.
La pharmacocinétique de l'amikacine a ensuite été évaluée à l'aide d'un modèle pharmacocinétique de population (MonolixSuite 2018, Lixoft®, Orsay, France). Des modèles à un et deux compartiments avec des constantes de taux d'absorption et d'élimination de premier ordre ont été testés. La variabilité interindividuelle et la variabilité résiduelle ont été décrites à l'aide de modèles exponentiel et mixte additif-proportionnel, respectivement.

Résultats

Sept des 66 échantillons prévus manquaient (un prélèvement à T30, et 6 prélèvements à T510). Le pic d'amikacinémie survenait à T60 (40,2 +/- 5,3 $mg.L^{-1}$). Un modèle pharmacocinétique à compartiment unique décrivait de façon satisfaisante les données sur les concentrations d'amikacine. Les estimations moyennes de la constante de vitesse

d'absorption, du volume de distribution, de la clairance et de la demi-vie d'élimination étaient, respectivement, 0,072 min^{-1}, 0,81 L, 0,01 $L.min^{-1}$ et 56 minutes. La variabilité des paramètres pharmacocinétiques entre les sujets était inférieure à 9 %. Le pic de concentration ajusté par le modèle survenait 48 minutes après le début de l'administration de l'amikacine. Aucun des paramètres pharmacocinétiques n'était lié au poids. Les données sont présentées dans la Figure II.2.

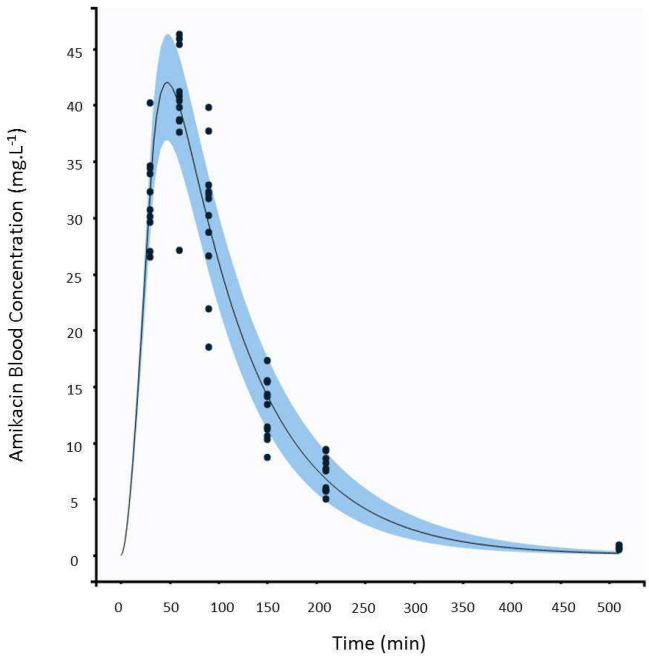


Figure II.2 - Pharmacocinétique de l'amikacinémie chez le lapin New Zealand adulte anesthésié sous ventilation mécanique. T0 était défini comme le début de l'injection intra-veineuse d'amikacine (15 $mg.kg^{-1}$ en 30 minutes).

Discussion

Cette étude est la première à évaluer la pharmacocinétique de l'amikacine chez le lapin femelle New Zealand adulte. Les résultats montrent une très faible variabilité interindividuelle, ce qui permet de déterminer de manière très précise le pic de concentration plasmatique de l'amikacine (T60 selon les données brutes, et T48 après modélisation).

II.1.6 Techniques de dosage de l'antibiotique sur broyat tissulaire

II.1.6.1 Préparation des échantillons

Une fois décongelés à température ambiante, les échantillons de broyat tissulaire (pulmonaire ou musculaire) étaient soumis à une sonication dans un bain d'eau pendant 10 minutes. Une surveillance rapprochée de la température du bain était effectuée afin que cette température ne dépasse pas 37°C.
Les échantillons étaient ensuite homogénéisés sur un agitateur électrique puis soumis à centrifugation (2000 tours/min pendant 10 minutes). Le surnageant était ensuite prélevé et les dosages en concentration d'amikacine étaient effectués dans le surnageant.

II.1.6.2 Dosage de l'amikacine

Le dosage de l'amikacine a été effectué par la technique d'immunopolarisation de fluorescence, dans le surnageant de tissu pulmonaire et dans le surnageant de tissu musculaire, à l'aide de l'automate Cobas Integra 400+ (Cobas Integra 400+, Roche Diagnostics, Basel Switzerland), et avec les réactifs de la même firme.

- Poumon

  Avant d'effectuer les dosages d'amikacine dans le surnageant de tissu pulmonaire, la faisabilité du dosage d'amikacine dans un milieu biologique différent du sérum sanguin a été évaluée. En effet, la technique d'immunopolarisation de fluorescence peut être faussée par la présence d'une quantité importante de protéines. Du surnageant de broyat pulmonaire ne comportant pas d'amikacine a servi de base à la validation de la méthode de dosage. Le surnageant de broyat pulmonaire a été divisé en 10 échantillons. Dans chaque échantillon une dose connue d'amikacine a été ajoutée. Cette dose d'amikacine était croissante du premier au dixième échantillon. Ensuite, dans chaque échantillon, la quantité d'amikacine présente dans le surnageant a été mesurée par la technique d'immunopolarisation de fluorescence. La même méthode a été appliquée en parallèle sur du sérum sanguin vierge d'amikacine. Les résultats obtenus pour chaque milieu (sérum sanguin ou surnageant pulmonaire) ont été comparés entre eux pour chaque dose d'amikacine ajoutée. Les résultats des dosages dans le surnageant de poumon et dans le sérum sanguin étaient commutatifs, ce qui signifie que le dosage d'amikacine par la méthode d'immunopolarisation de fluorescence dans le surnageant de poumon amenait exactement au même résultat que dans le sérum sanguin, milieu de référence de cette technique.

- Muscle

  La même procédure a été appliquée pour le dosage de l'amikacine dans le surnageant de broyat musculaire. Là encore les résultats étaient commutatifs.

II.1.6.3 Dosage de la vancomycine

Le dosage de la vancomycine a été effectué par la technique d'immunopolarisation de fluorescence, dans le surnageant de poumon et dans le surnageant de muscle, à l'aide de l'automate Cobas Integra 400+ (Cobas Integra 400+, Roche Diagnostics, Basel Switzerland), et avec les réactifs de la même firme.
La procédure décrite précédemment pour valider la méthode de dosage de l'amikacine a été appliquée à l'identique pour valider le dosage de la vancomycine dans les surnageants de poumon et de muscle.

II.1.6.4 Dosage de la ceftazidime

Le dosage de la ceftazidime n'a à ce jour pas été effectué. La technique envisagée est l'usage de la chromatographie en phase liquide. La mise au point complexe du protocole de dosage par l'équipe de pharmacotoxicologie est en cours. Sa mise en production dans le service sur des échantillons plasmatiques humains a débuté en septembre 2019. L'analyse des échantillons sur broyat pulmonaire de lapin est prévue début 2020.

II.1.7 Inondation pulmonaire : impact sur la mesure de la concentration d'amikacine dans le broyat pulmonaire et correction

La technique d'inondation pulmonaire a permis de mimer l'aspect échographique d'une PAVM, mais elle a amené du chlorure de sodium dans le parenchyme pulmonaire du poumon droit inondé, celui-là qui recevait également les ultrasons. Le chlorure de sodium n'a pas été résorbé avant le sacrifice de l'animal et la constatation macroscopique de l'œdème pulmonaire résiduel sur le poumon droit inondé a été faite, alors que le poumon controlatéral gauche avait un aspect macroscopique normal. Cet œdème pulmonaire a été directement causé par le chlorure de sodium instillé pour l'expérimentation. La conséquence de l'inondation pulmonaire droite a été que le volume liquidien trappé dans le poumon droit diluait la quantité d'amikacine contenue dans le tissu pulmonaire. Ceci entrainait une sous-estimation de la concentration réelle d'amikacine au sein du tissu pulmonaire soumis à la sonoporation. Il a été nécessaire de mettre au point une méthode de correction pour approcher la valeur de la concentration d'amikacine au sein du tissu pulmonaire soumis à la sonoporation.

La première méthode de correction envisagée a été de doser les protéines dans le surnageant. L'idée était de mesurer la quantité de protéines des poumons inondés et non inondés et de corriger la dilution en appliquant ensuite un facteur correctif. Cette méthode n'a finalement pas été retenue car il y avait une grande variabilité des résultats.

La deuxième méthode de correction envisagée a été de déterminer le poids du poumon droit avant inondation en fonction du poids du poumon gauche. L'hypothèse était que le ratio $\frac{Poids\ du\ poumon\ Dt}{Poids\ du\ poumon\ G}$ était assez constant. Cette hypothèse provient de données issues d'une étude scanographique des thorax de 10 lapins (56). En effet, le poumon droit du lapin est plus volumineux que le poumon gauche. Ce constat est fait chez tous les lapins, et une mesure du poids de chaque poumon pourrait permettre d'objectiver cette différence et de calculer le ratio $\frac{Poids\ du\ poumon\ Dt}{Poids\ du\ poumon\ G}$, mais il n'existe aucune donnée dans la littérature ayant fait cette mesure. Pour les besoins de nos travaux, une Expérimentation 3 a été réalisée afin de déterminer le ratio : $\frac{Poids\ du\ poumon\ Dt}{Poids\ du\ poumon\ G}$

II.1.8 **Expérimentation 3 : Détermination du ratio poids du poumon droit / poids du poumon gauche**

Matériels et méthodes

Les données recueillies au cours de l' « Expérimentation 1 **:** Effet du décubitus latéral sur la concentration parenchymateuse d'antibiotiques (Amikacine) » portant sur l'influence du décubitus latéral, décrite précédemment et portant sur 12 lapins femelles adultes blancs, de race New Zealand, en bonne santé, pesant entre 2400 et 3662 g, anesthésiés, ainsi que les données de 2 autres lapins utilisés pour une autre expérimentation avec le même protocole d'anesthésie et de ventilation mécanique, ont été utilisées pour déterminer le ratio poids du poumon droit / poids du poumon gauche. Dans l'expérimentation portant sur l'influence du décubitus latéral, les 12 lapins étaient positionnés en décubitus latéral droit ou gauche, de manière aléatoire, afin de mesurer l'influence du décubitus sur la concentration en amikacine dans le parenchyme pulmonaire. Aucune influence du décubitus n'avait été retrouvée concernant la concentration en amikacine du parenchyme pulmonaire, et aucun œdème macroscopique n'avait été observé. Pour les 2 autres lapins, aucune inondation pulmonaire n'avait été effectuée et les animaux étaient installés en décubitus dorsal strict pour toute la durée de l'expérimentation. Les lapins étaient exsanguinés par le cathéter artériel. Après réalisation d'une incision cervico-thoracique, les 2 poumons étaient

disséqués et extraits précautionneusement. Les faces dorsales et ventrales étaient photographiées avant que les bronches ne soient retirées. Les lobes de chaque poumon étaient séparés avec précaution. Pour tous les lapins, les poids des poumons droits et gauches étaient mesurés grâce à une balance micrométrique. Ce sont ces données qui ont été utilisées pour calculer le ratio poids du poumon droit / poids du poumon gauche.

Résultats

La moyenne (écart type) du ratio entre les poids du poumon droit et les poids du poumon gauche était 1,458 (0,123).

Grace à cette donnée, la concentration en amikacine du poumon droit a ensuite été corrigée de la façon suivante : la quantité d'amikacine dans le poumon droit (c'est à dire le poids du poumon droit x la concentration mesurée d'amikacine) a été divisée par le poids corrigé du poumon droit (c'est à dire le poids du poumon gauche x 1,458).

$$[Amk\ corr]_{Poumon\ Dt} = \frac{Pds_{Poumon\ Dt} \times [Amk\ mes]_{Poumon\ Dt}}{Pds_{Poumon\ G} \times 1{,}458}$$

Où Amk = Amikacine ; corr = corrigé ; Pds = Poids ; mes = mesuré.

Discussion

Une étude tomodensitométrique publiée en 2017, réalisée sur 10 lapins femelles adultes blancs de race New Zealand en bonne santé, pesant entre 4400 et 6000 g, a évalué les volumes pulmonaires des animaux. Le volume médian du poumon droit était significativement plus important que celui du poumon gauche (30,2 vs 20,7 cm^3 respectivement, p=0,005). Le rapport entre le volume médian du poumon droit et le volume médian du poumon gauche était 1,458 (56). Ces données viennent renforcer nos résultats.

II.1.9 La sonoporation musculaire comme contrôle positif

Le muscle est un organe facilement accessible pour les ultrasons par voie externe car il est constitué d'un tissu non pneumatisé, richement vascularisé, superficiel et protégé uniquement par la peau qui a une absorption quasi nulle des ultrasons. Ces caractéristiques font que le muscle est plus facile à étudier que le tissu pulmonaire dans le cadre nos expérimentations. De plus le muscle a déjà étudié dans le cadre de la sonoporation avec des résultats positifs (61).

Des expérimentations sur le muscle ont été introduites dans nos expérimentations comme contrôle positif. Ainsi, en cas de résultats négatifs de nos expérimentations sur le poumon (c'est à dire l'absence d'augmentation de la concentration d'antibiotique dans le tissu pulmonaire soumis à la sonoporation), des résultats positifs de nos expérimentations sur le muscle (c'est à dire l'augmentation de la concentration d'antibiotique dans le tissu musculaire soumis à la sonoporation) pour les même lapins permettrait de remettre en cause le modèle pulmonaire de sonoporation, mais également de valider le concept d'augmentation de la concentration tissulaire des antibiotiques par la sonoporation.

II.2 Ultrasons : paramètres acoustiques, matériel, réglages (62)

II.2.1 Paramètres acoustiques

La sonoporation a été largement explorée dans le but d'améliorer la transfection de gènes. Des paramètres de réglage ultrasonore et des configurations matérielles expérimentales variés ont été évalués dans le but d'optimiser la transfection des gênes avec les meilleures conditions de sécurité. Les résultats de ces expérimentations et l'expertise de l'équipe INSERM URM 1253 a permis de définir les configurations matérielles et les réglages ultrasonores optimaux que nous avons appliqué dans nos expérimentations.

Des appareils d'échographie de pratique clinique ont été utilisées dans un but de sonoporation (comme l'Acuson Sequoia C256 system avec une sonde 15L8 linéaire). L'avantage est que ces appareils peuvent, à la fois, fournir une image et sonoporer l'organe cible. L'inconvénient est que ces appareils, pour des raisons de sécurité, ont une intensité de délivrance des ultrasons limitée, parfois insuffisante pour une sonoporation optimale.

Des dispositifs commerciaux (comme le Dynatron 125, Sonic 15 Physiomed) et des dispositifs mis au point dans les laboratoires se sont développés et sont optimisés pour la

sonoporation. Les sondes de ces dispositifs sont le plus souvent des sondes non focussées, avec un transducteur à un seul élément.

Les paramètres utiles de réglages sont : la fréquence centrale de transmission (transmission center frequency, f_0), la pression acoustique (acoustic pressure, *AP*), la longueur d'onde (pulse length, *PL*), l'intervalle de pulsation (pulsing interval, *PI*) et la durée totale de sonification (total insonation time, *TIT*).

Le choix de la fréquence centrale de transmission f_0 dépend du type de microbulles et de leur fréquence de résonnance : la fréquence de résonnance décroit avec l'augmentation du diamètre des microbulles. La fréquence centrale de transmission f_0 optimale est habituellement 1 MHz.

La pression acoustique *AP* appliquée durant la sonification peut être exprimée en différentes unités : l'index mécanique (Mechanical Index, MI, utilisé pour les machines du commerce) qui est le pic de pression négative (exprimé en MPa) divisé par la racine carrée de la fréquence (exprimée en MHz) ; l'amplitude acoustique (exprimée en kPa) ; ou l'intensité (exprimée en $W.cm^{-2}$). La délivrance de molécules nécessite une pression acoustique minimum, appelée seuil de perméabilisation, habituellement inférieure à 1 MPa. Ce seuil varie en fonction de la fréquence centrale de transmission f_0 (il diminue avec la fréquence centrale de transmission f_0). Pour une fréquence centrale de transmission f_0 donnée, le taux d'extravasation augmente parallèlement avec la pression acoustique *AP*. Une augmentation plus importante de la pression acoustique *AP* augmente la quantité de délivrée de molécule, mais est associée avec des hémorragies, des dommages tissulaires et des infiltrats inflammatoires.

La longueur d'onde *PL* joue un rôle sur l'efficacité et la sécurité d'usage de la sonoporation. Des longueurs d'onde *PL* de l'ordre de la milliseconde induisaient une répartition hétérogène de des molécules au sein d'un volume tissulaire cérébral insonifié, avec une accumulation des molécules proche des vaisseaux les plus gros. Des longueurs d'ondes de l'ordre de la milliseconde diminuent le seuil de perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique. Des longueurs d'onde plus courtes *PL*, de l'ordre de la microseconde, diminuaient la possibilité d'extravasation des molécules ainsi que la dose délivrée. Par contre elles permettaient une distribution homogène des molécules.

Lorsque les microbulles sont détruites dans les vaisseaux, l'intervalle de pulsation *PI* doit être suffisamment long pour permettre à de nouvelles microbulles d'entrer dans les vaisseaux et de rafraîchir la zone cible. Un intervalle de pulsation *PI* d'une durée de 5 secondes semble être optimale. Une durée plus courte ne permet pas la restauration de la concentration en microbulles ; une durée plus longue nécessite une durée d'exposition plus longue pour obtenir le même effet sur la diffusion d'une molécule.

La durée de sonification *TIT* augmente le degré de transfection d'un gène. Mais, au-delà d'une certaine durée, des dommages tissulaires apparaissent. La majorité des études *in vivo* publiées utilisaient des durées de sonification inférieures à 10 minutes avec un arrêt de quelques secondes.

II.2.2 Matériel et réglages utilisés dans nos expérimentations pour générer les ultrasons nécessaires à la sonoporation

Les ondes ultrasonores ont été générées grâce à une sonde constituée d'un transducteur en un seul élément (Sofranel, Sartrouville, France), d'un diamètre de 14 mm avec un focus naturel à 25 mm. La fréquence centrale de transmission était de 1 MHz.
Un signal électrique, généré par un générateur d'onde arbitraire (Agilent, Santa Clara, CA), puis amplifié par un amplificateur de puissance (ADECE, Artannes sur Indre, France), était appliqué à la sonde. Le pic de pression négative de l'onde ultrasonore était mesurée dans un autre dispositif utilisant une aiguille hydrophone en PVDF calibrée (diamètre 0,2 mm ; Precision Acoustics Ltd., Dorchester, UK) à la distance naturelle de focalisation du transducteur (63).
Les réglages suivants ont été utilisés pour la sonification du poumon et du muscle dans la suite de nos expérimentations : Fréquence centrale de transmission : 1 MHz; période répétition des impulsions de 100 µs; 40 cycles par pulsation; pression acoustique : 600 kPa; durée de sonification : 3 minutes.

II.3 Protocole expérimental retenu

II.3.1 Anesthésie et conditionnement des lapins

L'anesthésie de chaque lapin (femelle adulte blanche, de race New Zealand) a été induite par inhalation dans un masque du gaz anesthésique Isoflurane à 3% (Isoflurane Belamont, Paris, France). Une fois anesthésié, le lapin était installé en décubitus dorsal sur une table radiante. La température corporelle était monitorée en continu par une sonde thermique rectale. La fréquence cardiaque et l'oxymétrie de pouls étaient monitorées en continu par un oxymètre de pouls portatif (PC-66V, Shenzhen creative industry, Shenzhen, China). Un cathéter veineux était positionné dans une veine marginale d'une oreille, un bolus intraveineux d'atropine était injecté (100 µg) et une perfusion intraveineuse continue de sufentanil (3 $\mu g.h^{-1}$) et de propofol (15 $mg.h^{-1}$) était débutée. Après réalisation d'une trachéotomie, une sonde d'intubation (2,5 mm de diamètre interne, sans ballonnet) était positionnée dans la trachée. Le lapin était ventilé mécaniquement (Servo 300A, Siemens Elema, Solna Sweden) en mode volume contrôlé (fraction inspirée en oxygène : 1,0 ; volume courant : 8 $mL.kg^{-1}$; aucune pression positive n'était appliquée en fin d'expiration ; fréquence respiratoire : 50 à 65 cycles par minute avec pour objectif de maintenir la pression artérielle en CO2 dans les limites de la normale). Une relaxation musculaire était obtenue par des bolus intraveineux itératifs

d'atracurium (10 mg). Un cathéter artériel était positionné dans l'artère fémorale droite du lapin afin d'obtenir un monitorage continu de la pression artérielle et de pouvoir effectuer des prélèvements sanguins (GE Datex-Ohmeda S/5, GE Datex Ohmeda, Helsinki, Finland). Une laparophrénotomie était ensuite réalisée afin de pouvoir administrer les ultrasons directement en contact avec le poumon droit.

II.3.2 Administration des antibiotiques

Trois antibiotiques ont été utilisés dans nos expérimentation : l'amikacine, la vancomycine et la ceftazidime. Après reconstitution, les antibiotiques étaient administrés par voie intra-veineuse à l'aide d'une seringue électrique. Le début de l'administration des antibiotiques était noté comme T0.

L'amikacine (Mylan SAS, Saint Priest, France) était administrée à la dose de 15 $mg.kg^{-1}$ dans 5 mL de chlorure de sodium pendant 30 minutes, en accord avec l'étude de Gérard et al. (60).

La vancomycine était administrée en 30 minutes sous la forme d'un bolus intraveineux initial de 20 $mg.kg^{-1}$ dans 10 mL de chlorure de sodium, puis suivi par une perfusion intraveineuse continue à la dose de 1,25 $mg.kg^{-1}.h^{-1}$ (soit 30 $mg.kg^{-1}$ dans 48 mL de chlorure de sodium administré intraveineux en injection continue à 2 $ml.h^{-1}$).

La ceftazidime était administrée en intraveineux continu à la dose de 25 $mg.kg.h^{-1}$ (soit 1 g dans 50 mL de chlorure de sodium administré à 1,25 $mL.h^{-1}$ x poids).

II.3.3 Inondation pulmonaire

Un cathéter (cathéter de péridurale avec mandrin 19G Vygon, Ecouen, France) était inséré entre la trachée et la sonde d'intubation. Le lapin était ensuite positionné en décubitus latéral droit, et 9 mL de chlorure de sodium étaient instillés dans la trachée par l'intermédiaire du cathéter. L'inondation du poumon droit (et donc sa condensation) ainsi que l'absence d'inondation du poumon gauche étaient ensuite contrôlées par la réalisation d'une échographie pulmonaire. L'inondation pulmonaire était réalisée quelques minutes avant le début de la sonification.

II.3.4 Injection des microbulles

Les microbulles de contraste (Vevo MicroMarker, VisualSonics, Bracco Research, Geneva, Switzerland) ont été reconstituées dans 800 µL de chlorure de sodium à 0,9%. Les injections intraveineuses ont été réalisées sous forme de bolus de 400 µL par

l'intermédiaire du cathéter veineux auriculaire. Un bolus de 1 mL de chlorure de sodium était administré afin de rincer la voie veineuse après injection de chaque bolus.

II.3.5 Sonification

Une sonde constituée d'un transducteur en un seul élément (Sofranel, Sartrouville, France), d'un diamètre de 14 mm avec un focus naturel à 25 mm était utilisée. La fréquence centrale était de 1 MHz. Un signal électrique, généré par un générateur d'onde arbitraire (Agilent, Santa Clara, CA), puis amplifié par un amplificateur de puissance (ADECE, Artannes sur Indre, France), était appliqué à la sonde. Le pic de pression négative de l'onde ultrasonore était mesuré dans un autre dispositif utilisant une aiguille hydrophone en PVDF calibrée (diamètre 0,2 mm ; Precision Acoustics Ltd., Dorchester, UK) à la distance naturelle de focalisation du transducteur. Lors de la sonification, les tissus pulmonaire et musculaire étaient soumis à des ondes ultrasonores sinusoïdales de 1 MHz, avec une période de répétition d'impulsion de 100 µs, 40 cycles par impulsion. La pression acoustique appliquée, c'est-à-dire la pression de pic négatif, était sélectionnée à 400 kPa. La durée d'application était de 3 minutes. Après inondation du poumon droit, et une minute après injection intraveineuses des microbulles, le poumon droit était insonifié par voie interne (trans laparophrénotomie) pendant 3 minutes. Dix minutes après la première injection, une 2ème injection intraveineuse de microbulles était effectuée. Une minute après la 2ème injection de microbulles, le muscle d'une patte antérieure (droite ou gauche, par randomisation) était insonifié pendant 3 minutes par voie transcutanée après rasage. La zone musculaire insonifiée était délimitée par 4 aiguilles, ce qui permettait de réaliser le prélèvement musculaire dans la zone insonifiée.

II.3.6 Constitution du groupe contrôle

Seul le poumon droit et les muscles d'une patte antérieure de chaque lapin ont été soumis aux ultrasons. Le poumon gauche et les muscles de l'autre patte antérieure n'ayant pas été soumis aux ultrasons, ils ont été utilisés comme contrôle. Ainsi chaque lapin était son propre contrôle, ce qui, d'un point de vue statistique, renforce les résultats obtenus et les conclusions tirées au cours des expérimentations.

II.3.7 Sacrifice des animaux

Le sacrifice de l'animal était réalisé à la fin de l'expérimentation, sous anesthésie générale, par exsanguination via la canule artérielle. Ceci permettait de limiter la

contamination sanguine des tissus prélevés. Une fois la mort de l'animal constatée, définie comme l'absence de battements cardiaque pendant plus d'une minute, la machine de ventilation mécanique était arrêtée.

II.3.8 Prélèvement des tissus et préparation des broyats

Pour le prélèvement pulmonaire, une incision cervico-thoracique était ensuite réalisée par laquelle les deux poumons, la trachée, les bronches souches et les vaisseaux pulmonaires étaient disséqués et prélevés. Une fois prélevées, les faces ventrales et dorsales des poumons étaient photographiées avant que les gros vaisseaux et les bronches soient séparées du reste du parenchyme pulmonaire. Les lobes des poumons ont ensuite été séparés avec précaution.

Pour les prélèvements musculaires, une incision de la peau a permis le prélèvement d'échantillons de muscle de 5 à 10 mm de diamètre, sans séreuse. Un premier prélèvement de tissu musculaire était effectué sur une patte antérieure de l'animal, dans le centre de l'aire soumise aux ultrasons préalablement repérée par 4 aiguilles. Un deuxième prélèvement était effectué sur l'autre patte antérieure, dans une zone similaire au premier prélèvement. La patte soumise aux ultrasons était tirée au sort.

Tous les prélèvements tissulaires étaient ensuite pesés à l'aide d'une balance micrométrique avant d'être broyés mécaniquement dans 5 mL de chlorure de sodium par l'ultra-Turrax T10 (IKA-Werke, GMBsH & Co., Staufen, Germany) afin d'obtenir un broyat homogène.

II.4 Éthique animale et hébergement des animaux

II.4.1 Éthique animale

Le protocole expérimental a été approuvé le 26 juin 2015 par le Comité d'Éthique en Expérimentation Animale du Val de Loire sous le numéro 2015020312576994_v2 (AFAPIS#204). Le protocole expérimental a été rédigé selon les principes actuels de l'éthique en expérimentation animale visant à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés pour la recherche. Ainsi, une partie des animaux impliqués dans ce protocole de recherche avait été initialement acquis par l'Université de Tours à des fins de formation. Dans le même objectif de réduction du nombre d'animaux utilisés pour la recherche, deux molécules antibiotiques (vancomycine et ceftazidime) ont été injectées simultanément au cours d'une même expérimentation.

II.4.2 Hébergement des animaux

Les lapins étaient hébergés dans l'animalerie de la faculté de médecine de Tours pendant 7 jours au moins avant le début des expérimentations. Les lapins recevaient alimentation, boissons et soins courants de manière habituelle. Les cages étaient enrichies pour le bien-être des animaux.

Chapitre III - Validation du concept

III.1 **Expérimentation 4** : Actions des ultrasons et des microbulles de contraste sur la diffusion d'une haute concentration sanguine amikacine au sein des parenchymes pulmonaire et musculaire de lapin

Les résultats de cette Expérimentation 4, augmentés des résultats des Expérimentations 2, 3 et 5 ont été publiés dans la revue Frontiers in Pharmacology, 2020 Jan 16;10:1562 (Impact Factor = 3,845 ; SIGAPS B). L'article est présenté ci-dessous, en anglais. L'objectif était d'évaluer la capacité des ultrasons et des microbulles administrés par voie systémique veineuse à augmenter la concentration d'un antibiotique, l'amikacine (aminoside), lui aussi administré par voie veineuse, dans le tissu pulmonaire condensé et dans le tissu musculaire d'un modèle de lapin. Le résumé de l'article est traduit ci-dessous et donne les résultats principaux de cette expérimentation.

RESUME

La faible diffusion dans le tissu pulmonaire des antibiotiques administrés par voie intraveineuse rend les pneumonies difficiles à traiter. La combinaison d'ultrasons et de microbulles est une méthode non-invasive émergente qui permet une augmentation ciblée de la disponibilité de différentes drogues dans de nombreux organes. Le but de cette étude était d'évaluer l'efficacité de cette méthode pour augmenter la concentration d'amikacine dans du tissu pulmonaire condensé dans un modèle de lapin sous ventilation mécanique. Dans cette étude, les résultats in-vivo ont montré que l'association d'amikacine administrée par voie intraveineuse avec des microbulles et des ultrasons augmentait de façon significative la concentration d'amikacine dans le tissu du poumon condensé. De plus, et en tant que contrôle positif, l'exposition du tissu musculaire squelettique aux ultrasons et aux microbulles en présence d'amikacine augmentait significativement la diffusion des antibiotiques dans ce tissu. En conclusion, cette étude démontre que l'association d'ultrasons et de microbulles est une méthode prometteuse pour la délivrance ciblée d'amikacine au poumon condensé ventilé mécaniquement, ouvrant ainsi de nouveaux champs thérapeutiques dans la lutte contre les infections pulmonaires.

frontiers in Pharmacology

ORIGINAL RESEARCH
published: 16 January 2020
doi: 10.3389/fphar.2019.01562

Enhanced Amikacin Diffusion With Ultrasound and Microbubbles in a Mechanically Ventilated Condensed Lung Rabbit Model

Fabien Espitalier[1,2], *François Darrouzain*[3,4], *Jean-Michel Escoffre*[1], *David Ternant*[3,4], *Eric Piver*[5], *Ayache Bouakaz*[1†] *and Francis Remerand*[1,2*†]

[1] UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, Tours, France, [2] Pôle Anesthésie Réanimations, Hôpital Trousseau, CHRU de Tours, Tours, France, [3] Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie, Hôpital Bretonneau, CHRU de Tours, Tours, France, [4] Équipe PATCH, EA 7501 GICC, Tours, France, [5] Laboratoire de Biochimie, Hôpital Trousseau, CHRU de Tours, Tours, France

OPEN ACCESS

Edited by:
Marc Derieppe, Princess Maxima Center for Pediatric Oncology, Netherlands

Reviewed by:
Erzsébet Bartolák-Suki, Boston University, United States
Chin Moi Chow, University of Sydney, Australia

***Correspondence:**
Francis Remerand
francis.remerand@univ-tours.fr

†*These authors have contributed equally to this work*

Specialty section:
This article was submitted to Translational Pharmacology, a section of the journal Frontiers in Pharmacology

Received: *15 July 2019*
Accepted: *03 December 2019*
Published: *16 January 2020*

Citation:
Espitalier F, Darrouzain F, Escoffre J-M, Ternant D, Piver E, Bouakaz A and Remerand F (2020) Enhanced Amikacin Diffusion With Ultrasound and Microbubbles in a Mechanically Ventilated Condensed Lung Rabbit Model. Front. Pharmacol. 10:1562. doi: 10.3389/fphar.2019.01562

The poor diffusion of intravenous antibiotics in lung tissue makes nosocomial pneumonia challenging to treat, notably in critical patients under mechanical ventilation. The combination of ultrasound and microbubbles (USMB) is an emerging method for non-invasive and targeted enhancement of uptake of various drugs in several organs. This study aims to evaluate if USMB may increase amikacin concentration in condensed lung tissues in a mechanically ventilated rabbit model. When applied 60 or 160 min after the beginning of an intravenous amikacin infusion, USMB increased amikacin concentration in the condensed lung tissue by 1.33 ($p = 0.025$) or 1.56-fold ($p = 0.028$) respectively. When applied 70 min after the beginning of an intravenous amikacin infusion, USMB increased amikacin concentration in the muscle tissue by 2.52 ($p = 0.025$). In conclusion, this study demonstrates that USMB is a promising method for the targeted delivery of amikacin in mechanically ventilated condensed lung, thus opening new therapeutic fields against lung infections.

Keywords: sonoporation, ultrasound, microbubbles, antibiotic therapy, lung, amikacin

INTRODUCTION

Hospital-acquired and ventilator associated pneumonia (VAP) are among the most common infections in intensive care units (ICU) (Leone et al., 2018). They increase morbidity, and ICU and hospital length of stay (Rello et al., 2002; Koulenti et al., 2017). In ICU, most of pneumonia are VAP (American Thoracic Society et Infectious Diseases Society of America, 2005). They are frequently due to multidrug-resistant bacteria, which lead to poor therapeutic outcomes (Martin-Loeches et al., 2013). Aminoglycosides are recommended to treat these patients (Leone et al., 2018). Most intravenous (iv) antibiotics (*e.g.*, aminoglycosides) diffuse poorly in the lung tissue, making pneumonia challenging to treat. Moreover, the risk of systemic toxicity limits the use of high dose of iv antibiotics. To overcome these limitations, the development of innovative targeted delivery methods is required to increase the local concentration of antibiotics in infected lung tissues, while minimizing general side effects related to the systemic antibiotherapy.

Ultrasound contrast agents (UCAs) are microbubbles consisting of a gaseous core surrounded by a biocompatible shell. UCAs are currently used for diagnostic medical ultrasounds (Sennoga et al., 2017).

Beyond these diagnostic practices, new promising applications of UCAs have emerged for targeted drug delivery (Kooiman et al., 2014). When UCAs and the targeted drug are intravenously co-injected and both exposed to ultrasound, it provides unprecedented possibilities for a selective therapeutic action known as sonoporation (Geers et al., 2012). Sonoporation denotes a process in which ultrasonically-activated microbubbles (USMB) pulsations induce a transient permeabilization of nearby endothelial barriers (*e.g.*, blood-tumor barrier, blood-brain barrier) (Escoffre and Bouakaz, 2018). This increases vascular permeability and so extravasation of drugs from blood into surrounding tissues (Carpentier et al., 2016; Dimcevski et al., 2016). In comparison with other physical drug delivery methods, sonoporation is a non-invasive, easy to apply, and cost-effective method. Thus, it provides a high potential for the delivery of a wide range of drugs to superficial and deep organs under the guidance ultrasonic imaging (Escoffre et al., 2013; Zhang et al., 2015; Yu et al., 2016).

Few studies investigated the therapeutic benefit of antibiotic treatments combined with USMB for improving antibiotic activity against bacterial infections (He et al., 2011; Shih et al., 2013; Lin et al., 2015; Shang et al., 2015; Dong et al., 2018; Sugiyama et al., 2018). Thus, USMB enhanced the antibacterial effect of free vancomycin against *Staphylococcus epidermidis in-vivo* biofilms compared to antibiotic treatment alone (He et al., 2011; Dong et al., 2018). In addition, USMB stimulated the release of vancomycin from vancomycin-loaded polymethyl methacrylate (PMMA) cement, thus increasing the *in-vitro* and *in-vivo* antibacterial effects on *Staphylococcus aureus* (Lin et al., 2015). Two other preclinical investigations also demonstrated that USMB improved the concentration of cefuroxime in rat prostate tissue (Shang et al., 2015) and of gentamicin in the inner ear of guinea pig (Shih et al., 2013). Recently, Sugiyama *et al.* reported that USMB significantly increased the gentamicin concentration in lung tissue in a bilateral diffuse lung infection model in spontaneously breathing mice, thus decreasing bacterial growth (Sugiyama et al., 2018). However, in clinical practice, pneumonia can show a diffuse pattern or be localized (they usually are limited to a lower lung lobe). In addition, in ICU, 80% of nosocomial pneumonia are VAP (Koulenti et al., 2017). Both localized pneumonia and lung aeration due to mechanical ventilation may limit ultrasound penetration in the lung tissue, and so USMB efficacy. Whether USMB can increase antibiotic diffusion in these conditions is a crucial preliminary question to answer, before further *in vivo* or clinical studies. Our present *in vivo* study aimed to evaluate if USMB may increase aminoglycoside diffusion in condensed lung tissue of mechanically ventilated rabbits. To establish that USMB worked well under controlled conditions, the diffusion of aminoglycoside was also evaluated in skeletal muscles.

MATERIALS AND METHODS

Animal Preparation and Animal Model

All procedures were performed according to the ethical guidelines and were approved by the Animal Care and Regional Committee for Ethics in Animal Experiments, Val-de-Loire (2015020312576994). Forty healthy female adult New Zealand rabbits were purchased from Charles Rivers (Écully, France). Rabbits were maintained at constant room temperature with 12 h light cycle in isolation cages. At the start of the experiments, rabbits were 16–18 weeks old, weighing between 2.3 and 4.9 kg.

The rabbits were anesthetized by inhaling 3% isoflurane (Isoflurane Belamont, Paris, France) and oxygen *via* a facial oxygen mask. They were then positioned in supine position on a thermostatically controlled pad in order to maintain body temperature at about 37°C. During the whole procedure, the body temperature was monitored with a rectal temperature probe. Heart rate and pulse oximetry were continuously measured using a handheld pulse oximeter (PC-66V, Shenzhen Creative Industry, Shenzhen, China). The marginal vein of an ear was cannulated with a Jelco® 22 G catheter (length 25 mm, diameter 0.95 mm; Smiths Medical International Ltd, Lancashire, UK). This catheter was used to intravenously inject atropine (100 µg/ml in saline). Subsequently, through the catheter, continuous infusions of sufentanil (1 µg/ml in saline, 3 µg/h) and propofol (5 mg/ml saline, 15 mg/h) were performed independently of rabbit body weight. *Via* a tracheotomy, the trachea was intubated (Portex® tracheal tube with 2.5 mm internal diameter, without cuff; Smiths Medical International Ltd, Hythe, UK). The 40 rabbits were mechanically ventilated (Servo 300A, Siemens Elema, Solna Sweden) in a volume control support mode (inspired fraction of oxygen of 1.0, tidal volume of 8 ml/kg, no end-expiratory pressure, respiratory rate of 50 to 65 breaths per minute to maintain arterial CO_2 in a normal range). Neuromuscular blockade was achieved using iterative iv atracurium boli (10 mg) every 45 min. The right femoral artery was cannulated using Seldinger method with a Leadercath arterial catheter (20 G, 4 cm length; Vygon, Écouen, France) for continuous arterial pressure monitoring (GE Datex-Ohmeda S/5, GE Datex-Ohmeda, Helsinki, Finland) and blood sample collection.

Lung Condensation Model

Just before USMB, the right lung was flooded by saline. Briefly, a 19G epidural catheter (Vygon, Écouen, France) was inserted between the trachea and the intratracheal tube. The rabbit was positioned on its right side and 9 ml of saline were instilled into the trachea through the catheter. The flooding (and so the condensation) of the right lung but also the absence of flooding of the left lung were verified using lung echography (Logiq Book XP, General Electric Healthcare).

Ultrasound Setup

Ultrasound waves for sonoporation were generated using a single-element lab-made ultrasound transducer with a center frequency of 1 MHz. The transducer had a diameter of 14 mm and was naturally focused at 25 mm. It was driven by an electrical signal generated from an arbitrary waveform generator (Agilent, Santa Clara, CA), then amplified by a power amplifier (ADECE, Artannes-sur-Indre, France). As previously described (Escoffre et al., 2010), the peak negative pressure was measured in a separate setup using a calibrated polyvinylidene fluoride needle hydrophone (diameter 0.2 mm; Precision Acoustics Ltd., Dorchester, UK) at the natural focal distance of the transducer. The lung and muscle tissues (exact anatomical locations are described in *Study Design* section) were

sonicated at 1 MHz with a pulse repetition period of 100 µs, 40 cycles per pulse at peak-negative pressure of 600 kPa for a period of 3 min (Escoffre et al., 2013).

Pharmacokinetic Analysis of Amikacin

In a set of 11 mechanically ventilated anesthetized rabbits, the beginning of amikacin infusion (Mylan SAS, Saint Priest, France, 15 mg/kg in 5 ml saline during 30 min) set as time T0. The lung was not condensed and neither microbubbles nor ultrasound were used in this pharmacokinetics (PKs) experiment. Blood samples were collected at T30 (discontinuation of amikacin infusion), T60, T90, T150, T210, and T510 minutes. Total blood samples were centrifuged (2,000 $tr.min^{-1}$ during 10 min) after coagulation and amikacin concentrations were determined in the obtained serum by fluorescence polarization immunoassay using the chemistry analyzer Cobas Integra 400+ (Cobas Integra 400+, Roche Diagnostics, Basel Switzerland) (Domke et al, 2000). Amikacin PKs analysis allowed to set the timing of ultrasound application for the two following experiments: high serum amikacin concentration [AMK] experiment and low serum [AMK] experiment.

Study Design

High [AMK] Sonoporation Experiment (N = 8 Rabbits)

Once amikacin infusion was started, the thorax, the ventral side of the abdomen, and both anterior legs of the rabbits were shaved. A right laparophrenotomy was performed. At T55 minutes the right lung was flooded.

Sonoporation of the Lung

At T60 minutes, the ultrasound transducer was placed in close contact with the right pulmonary lower lobe through the laparophrenotomy. Two milliliters of saline in the pleural space allowed ultrasound transmission between probe and lung tissue. An iv bolus of 400 µl of gas microbubbles (Vevo MicroMarker, FUJIFILM-VisualSonics Inc., Amsterdam, NL) was injected followed by 1 ml saline flush. One minute after microbubbles injection, ultrasound was applied to the lung using the ultrasound parameters described above. Each rabbit was then positioned in supine position and lung reaeration was checked using echography.

Sonoporation of the Muscle

The transducer was placed in contact with a shaved anterior leg (right or left legs were randomly chosen using a computer-generated random list) covered with ultrasound transmission gel. To ensure an accurate position, four thin needles around the transducer were used to mark the sonoporation region. At T70 minutes, an iv bolus of 400 µl of microbubbles was injected. One minute later, ultrasound was applied to the skeletal muscle of the anterior leg. Exsanguination was performed at T90 minutes.

Low [AMK] Sonoporation Experiment (N = 7 Rabbits)

In a separate experiment and using the USMB protocol previously described, the right condensed lung was exposed to two USMB treatments at T150 and T160 minutes. At T150 and T160, the systemic amikacin concentration was about three-fold lower than the peak of systemic amikacin concentration (**Figure 2**). Microbubbles were renewed before the second application of ultrasound. Exsanguination was performed at T170 minutes. In this experiment, the muscle was not submitted to USMB, meaning that the low [AMK] experiment was not conducted in the muscle tissue.

The study design is presented in **Figure 1**.

Sacrifice and Post Mortem Analysis

Each rabbit was exsanguinated *via* the arterial cannula. Through a cervicothoracic incision, both lungs were carefully dissected and separated. Their ventral and dorsal sides were photographed before removing the main vessels and bronchus. Then, two muscle samples (5 to 10 mm diameter, without serosa) were excised, one in the center of the sonicated area of the anterior leg, and the other one in the similar area on the contralateral leg (as a control sample). All lung and muscle samples were weighed with a micrometric balance. Lung and muscle samples were mechanically grinded within 5 ml of saline using Ultra-Turrax T10 device (IKA-Werke, GmbH & Co., Staufen, Germany), frozen and stored at −20°C for further analysis.

Amikacin Concentration Assessment in Tissues

After they defrosted, grinded tissue samples were mechanically homogenized using a disperser, followed by 10 min ultrasonication. Then samples were centrifuged (2,000 $tr.min^{-1}$ during 10 min) and amikacin was quantified in the obtained supernatant, following dilution with Roche diluent to meet the measurement accuracy range if necessary. Amikacin concentrations in tissues were determined by fluorescence polarization immunoassay (one measurement done per sample) using the chemistry analyzer Cobas Integra 400+ (Cobas Integra 400+, Roche Diagnostics, Basel Switzerland) (Domke et al, 2000). Aiming to validate the assay technique, lung and muscle supernatants containing no amikacin were used. The supernatants were divided into 10 samples. In each sample, a known dose of amikacin was added. This dose of amikacin increased from the 1st to the 10th sample. Then, in each sample, the amount of amikacin present in the supernatant was measured by the fluorescence polarization immunoassay. The same method was applied in parallel to virgin amikacin blood serum. The results obtained for each medium (blood serum, lung, or muscle supernatant) were compared with each other for each dose of amikacin added. The results of the assays in the lung supernatant and in the blood serum were commutative, which means that the assay of amikacin by the fluorescence polarization immunoassay in the lung and muscle supernatants gave exactly the same result as in the blood serum, reference medium of this technique.

Statistics

Because of trapping of the sodium chloride used to flood the right lung, its weight was artificially increased, underestimating the amikacin concentration in this lung tissue. This "dilution effect" was corrected as follow: in a set of 14 female New Zealand rabbits without any lung flooding, right and left lungs were weighed in similar experimental conditions than previously

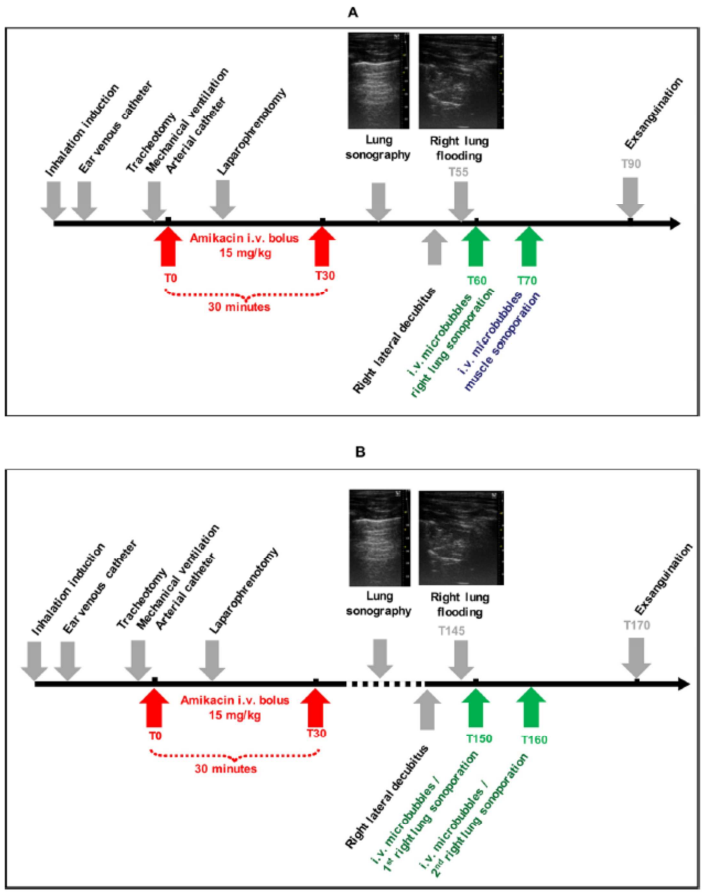


FIGURE 1 | Study design with high **(A)** and low **(B)** amikacin concentrations.

described. The mean (standard deviation) of the ratio between right lung weight (5.803 ± 0.605 g) and left lung weight (4.047 ± 0.558 g) was 1.458 (±0.123). Amikacin concentration in the right lung was therefore corrected as follows:

$$Corrected \quad [AMK]_{RL} = \frac{W_{RL} \times Measured \quad [AMK]_{RL}}{W_{LL} \times 1,458}$$

with $[AMK]_{RL}$, amikacin concentration in the right lung; W_{RL}, weight of the right lung; W_{LL}, weight of the left lung.

Finally, the following comparisons were made: 1) lung uptake of amikacin between sonicated and non-sonicated lung, in the presence of high [AMK] concentration, and in the presence of low [AMK] concentration, 2) muscle uptake of amikacin between sonicated and non-sonicated muscle in the presence of high [AMK] concentration. In each of these situations, the amikacin concentrations dosed in the supernatants of tissue samples were compared using a Wilcoxon test (each rabbit being its own control). A p value < 0.05 was considered as significant. Statistical tests were performed using SPSS 25 (IBM France statistics, Bois-Colombes, France). Neither statistical test was performed to compare amikacin lung concentration in low [AMK] concentration experiment with the one in high [AMK] concentration experiment, nor between amikacin concentration in lung and in muscle.

Because blood amikacin concentration was measured at T30, T60, T90, T150, T210, and T510, a PK modeling was needed to precisely determine the peak of blood amikacin concentration to optimize the administration of USMB in the experiments.

Amikacin PKs was assessed using population PK modeling (MonolixSuite 2018, Lixoft®, Orsay, France). One and two-compartment models with first order absorption and elimination rate constants were tested.

RESULTS

Amikacin Pharmacokinetics

The blood amikacin concentrations were measured over time by fluorescence polarization immunoassay after iv infusion of 15 mg/kg amikacin in mechanically ventilated anesthetized rabbits. Subsequently, amikacin PKs was assessed using population PKs modeling. As shown in **Figure 2**, a one-compartment PKs model described adequately amikacin PKs. Thus, the highest amikacin concentration (40.2 ± 5.3 mg/L) was measured at 60 min after the beginning of iv amikacin infusion. Model-fitted concentration peak occurred at 48 min. Average estimates of absorption rate constant, volume of distribution, clearance, and elimination half-life constants were 0.072 min^{-1}, 0.81 L, 0.01 $L.min^{-1}$, and 56 min, respectively. Inter-subject variability of PKs parameters was <9% and none of PKs parameters was related to the body weight.

In-Vivo Amikacin Delivery in Condensed Lung and Muscle Using Sonoporation

At T60 min (high [AMK] sonoporation experiment), the amikacin concentration in the right condensed lung tissue exposed to USMB was 1.33-fold higher (+33%) compared with the left non-sonicated lung (14.1 [10.3–15.4] *versus* 10.6 [8.5–14.0] µg/g; $p = 0.025$).

At T70 min, the amikacin concentration in muscle exposed to USMB was 2.52-fold higher (+152%) compared with non-sonicated muscle (6.3 [3.4–11.0] *versus* 2.5 [1.9–6.0] µg/g; $p = 0.025$).

At T160 min (low [AMK] sonoporation experiment), the amikacin concentration in the right condensed lung tissue exposed to USMB was 1.56-fold higher (+56%) compared with the left non-sonicated lung (6.1 [4.6–8.2] *versus* 3.9 [3.6–4.2] µg/g; $p = 0.028$).

The results are shown in **Figure 3**.

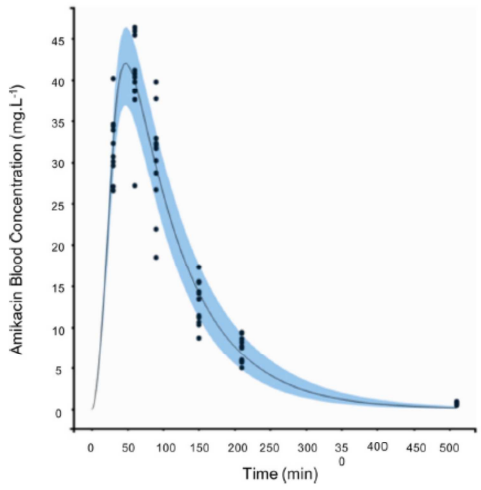


FIGURE 2 | Amikacin pharmacokinetics (PKs) in mechanically ventilated anesthetized rabbits (N = 11 rabbits). T0 was set as the beginning of intravenous (iv) amikacin infusion (15 mg/kg over 30 min).

DISCUSSION

The present study investigated the efficacy of USMB to improve amikacin diffusion in the mechanically ventilated condensed lung in a rabbit model. It demonstrated that focal USMB significantly increased amikacin concentration in the mechanically ventilated condensed lung but also in the muscle. However, the real effect of USMB was probably underestimated in lungs because of anatomical limitations of the rabbit model and instrumental limitations of our experimental setup.

The effect of an ultrasound-based treatment applied to pneumonia may appear as unpredictable. First, the multiple air/tissue interfaces in lungs may dramatically limit ultrasound propagation into the lung and so USMB efficiency. Second, in the opposite way, in case of pneumonia, inflammatory interstitial edema increases and many alveoli are progressively filled with exudate. These conditions may ease ultrasound propagation into the lung. Third, in clinical practice, the increase in hypoxemia requires mechanical ventilation to recruit alveoli, to decrease breathing work, and to increase fraction of inspired oxygen. During mechanical ventilation, positive pressure is continuously applied in the airways to insufflate gas into the lungs and to reaerate alveoli (during spontaneous breathing, this pressure is negative during inspiration, and very low during expiration). Mechanical ventilation may therefore decrease ultrasound propagation in the lung tissue. In the present study, a model of condensed lung under mechanical ventilation was specifically developed. In our laboratory, the rabbit was the smallest available animal allowing easy mechanical ventilation. By definition, inducing a clinically relevant VAP would have required several days of mechanical ventilation, with a possible important mortality rate. This would have been time and resources consuming. So we considered it was mandatory to document the pharmacologic step before such clinical step. Two main approaches can mimic quickly a lung condensation: lung atelectasis and lung flooding. From a pathological point of view, the lung flooding model is more appropriate. Moreover, this model gives very similar echographic aspect than pneumonia in human clinical practice (see **Figure 1**). Last but not least, each rabbit was its own control, limiting interindividual variability impact. In this model, a key methodological point was the timing of both USMB and amikacin infusion. To our knowledge, the amikacin PKs has not been described in a rabbit model before.

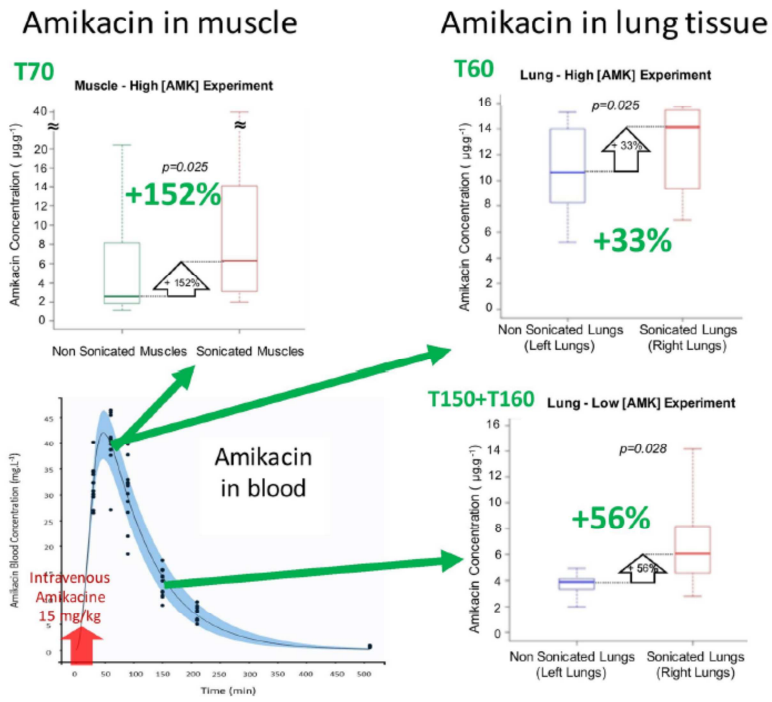


FIGURE 3 | Boxplots of amikacin concentration in lung and muscle tissues (N = 7–8 rabbits/condition; each rabbit was its own control). Green arrows indicate on the PKs curve the amikacin blood concentration at the time of sonoporation.

So, it had to be performed in ours. Amikacin PKs was very reproducible, since inter-individual variability was very low (< 9%), and did not depend on the rabbit weight. This PKs study allowed us to perform the USMB protocol at the highest plasmatic concentration of amikacin, in the high [AMK] experiment, when the effect should be maximal. It also allowed us to perform the USMB protocol when amikacin concentration decreased by 66%, in the so called "low [AMK] experiment." It aimed to test if the increased diffusion was potentially dependent from the amikacin concentration.

Our main findings are USMB increased amikacin lung concentration by 33% in the high [AMK] experiment ($p = 0.025$) and by 56% in the low [AMK] experiment ($p = 0.028$), and by 152% ($p = 0.025$) in the muscle tissue. Amikacin therapeutic effect on bacteria is mainly observed during the period of high amikacin concentration. So, in the aim to optimize amikacin efficacy, the more relevant timing to apply an USMB protocol is probably the one chosen in the high [AMK] experiment, or slightly before (in theory at T48). However, our findings revealed also that USMB was effective in increasing amikacin diffusion in lung, whatever the amikacin concentration.

In another approach, USMB could maintain the amikacin therapeutic effect on bacteria in the lungs while reducing its posology, in the aim to decrease its systemic toxicity.

The relative increase in amikacin concentration due to USMB was +152% in muscle tissue compared to +33 and +56% in the lung. The apparent higher efficiency of USMB in muscle than in lung tissue should be challenged: first, the spread of ultrasound is better in muscle because of the lack of tissue/gas interfaces in this tissue; second, the muscle is more superficial than lung, making it easier to sonicate; third, the accurate localization of the probe and of its beam in the muscle tissue allowed us to collect muscle tissue sample mainly in the sonicated area, leading to a better evaluation of the USMB effect on amikacin diffusion in muscle than in lung. Indeed, the real effect of USMB is probably underestimated in lungs because of anatomical limitations of the rabbit model and instrumental limitations of our experimental setup. Therefore, with appropriate ultrasonic probe for lung sonoporation, an increase of antibiotics diffusion in lung similar to the one observed in muscle should be reachable.

Due to the particular anatomy of the rabbits, with a narrow chest and a central heart, only a direct application of the probe

on the right lung allowed the lung sonication while avoiding heart sonication. We presumed that if lung and heart were sonicated simultaneously, the microbubbles would have been extensively disrupted in cardiac cavities, before reaching the lung. This is the main reason why a transthoracic approach was not performed in the present study. In this rabbit model, we chose a focal application of ultrasound. The size of the probe (14 mm external diameter and a natural focus at 25 mm) allowed only limited sweeping motion once in the right hemithorax of the rabbits. Therefore, the volume of lung sonicated in our protocol with this probe (5 mm diameter beam and about 15 mm lung depth) was far less than 1 ml. It has to be compared with the median right lung weight in similar healthy female rabbits in this study (5.8 g), or with the median volume of the right lung measured on computed tomography in ten 7 month old female rabbits (30 ml) (Müllhaup et al., 2017). In the present study, the measured amikacin concentration in the whole right lung is therefore the mean of less than 1 ml of treated lung and of 5 to 30 ml of untreated lung. An accurate localization of the sonicated area could have circumvented this pitfall. This was not possible due to the cumbersome footprint of the probe, and to the respiratory lung mobility during USMB. At bedside, human lower lobes can easily be explored using transthoracic ultrasound, without visualizing the heart. So, non-invasive lung sonoporation should be feasible in clinical practice.

In mice in spontaneous ventilation, the relative increase of aminoglycoside (gentamicin) concentration in lung tissue induced by USMB was +100% (Sugiyama et al., 2018). This may appear more important than under mechanical ventilation (+33 or +56%), as showed in our study. Our results have to be challenged since they are largely underestimated (see above). Moreover, Sugiyama's animal model and aminoglycoside studied were different from our experiments. In addition, in Sugiyama's murine model, the whole thorax was sonicated (Sugiyama et al., 2018). Such large sonication is difficult to conceive in clinical practice. Our model was a non-infected one, so we were not able to directly demonstrate the anti-bacterial therapeutic effect related to the increase of lung amikacin concentration as recently reported with gentamicin (Sugiyama et al., 2018).

The conclusions drawn from our study should not be extended to other antibiotic classes. Indeed, the pharmacological and physicochemical properties (*e.g.*, molecular weight, spatial conformation, ionic charge, *etc.*) strongly vary from an antibiotic to another and the impact on the molecule diffusion after sonoporation cannot be predicted.

USMB is a new and original therapeutic approach. Its safety has to be explored. In theory, increasing vascular permeability may increase lung edema, and so increase hypoxemia. Whether this effect is negligible, additive, or synergistic with preexisting increased vascular permeability in inflamed lungs (induced by mechanical ventilation and/or infection) has to be questioned. At bedside, no harm has been attributed to diagnostic lung ultrasounds, while they have been largely used for more than 20 years, including in injured lungs (Lichtenstein et al., 1997). USMB seems to be safe during the hours following application: in agreement with Sugiyama's study, pulse oximetry was not modified by lung ultrasound application in our study (data not shown). Nevertheless, delayed deleterious effects of USMB cannot be excluded. This aspect will have to be explored in further studies on this topic, with a prolonged follow-up.

CONCLUSIONS

USMB increased amikacin concentration in mechanically ventilated condensed rabbit lung. Nevertheless, further technological developments are still required to potentiate this effect, and to validate the efficacy and the safety of therapeutic protocol in a rabbit lung infection model. Future works should study if USMB could improve the efficacy of current antibiotherapy for the treatment of pulmonary diseases, specifically in hospital-acquired and ventilator associated pneumonia.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated for this study are available on request to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Animal Care and Regional Committee for Ethics in Animal Experiments, Val-de-Loire, France (2015020312576994).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AB, FR, J-ME, and FE conceived the project and the design of experiments. FE and FR performed the experiments. FE, EP, and FD performed the amikacin concentration dosing. FD and DT performed the modeling of the pharmacokinetics of amikacin. FE and FR analyzed the results, and wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

FUNDING

This work was supported by institutional funds from Inserm and Université de Tours.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge Prof. Laffon (Department of Anesthesiology and Surgical Reanimation, CHRU de Tours, Tours, France) for his assistance in establishing the rabbit model, Dr. Bruno (Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie, Hôpital

Bretonneau, CHRU de Tours, Tours, France) for the technical assistance in dosing amikacin concentration; Mr. Jean Yves Tartu (Inserm U1253) for his technical assistance, and Mrs Valérie Schubnel and Mr. Jérôme Montharu (PST Animalerie, Université de Tours, Tours, France) for their help in handling animals.

REFERENCES

American Thoracic Society, Infectious Diseases Society of America (2005). Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 171, 388–416. doi: 10.1164/rccm.200405-644ST

Carpentier, A., Canney, M., Vignot, A., Reina, V., Beccaria, K., Horodyckid, C., et al. (2016). Clinical trial of blood-brain barrier disruption by pulsed ultrasound. *Sci. Transl. Med.* 8, 343re2. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf6086

Dimcevski, G., Kotopoulis, S., Bjånes, T., Hoem, D., Schjott, J., Gjertsen, B. T., et al. (2016). A human clinical trial using ultrasound and microbubbles to enhance gemcitabine treatment of inoperable pancreatic cancer. *J. Control Release* 243, 172–181. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.10.007

Domke, I., Cremer, P., and Huchtemann, M. (2000). Therapeutic drug monitoring on COBAS INTERGA 400—evaluation result. *Clin. Lab.* 46, 509–515.

Dong, Y., Li, J., Li, P., and Yu, J. (2018). Ultrasound microbubbles enhance the activity of vancomycin against Staphylococcus epidermidis biofilms in vivo. *J. Ultrasound Med.* 37, 1379–1387. doi: 10.1002/jum.14475

Escoffre, J. M., and Bouakaz, A. (2018). Mini-review – Biophysical mechanisms of cell membrane sonopermeabilization: knows and unknows. *Langmuir.* 35, 10151–10165. doi: 10.1021/acs.langmuir.8b03538

Escoffre, J. M., Kaddur, K., Rols, M. P., and Bouakaz, A. (2010). In vitro gene transfer by electrosonoporation. *Ultrasound Med. Biol.* 36, 1746–1755. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2010.06.019

Escoffre, J. M., Novell, A., Serrière, S., Lecomte, T., and Bouakaz, A. (2013). Irinotecan delivery by microbubble-assisted ultrasound: in vitro validation and a pilot preclinical study. *Mol. Pharm.* 10, 2667–2675. doi: 10.1021/mp400081b

Geers, B., Dewitte, H., De Smedt, S. C., and Lentacker, I. (2012). Crucial factors and emerging concepts in ultrasounds-triggered drug delivery. *J. Control Release* 164, 248–255. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.08.014

He, N., Hu, J., Liu, H., Zhu, T., Huang, B., Wang, X., et al. (2011). Enhancement of vancomycin activity against biofilms by using ultrasound-targeted microbubble destruction. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 5331–5337. doi: 10.1128/AAC.00542-11

Kooiman, K., Vos, H. J., Versluis, M., and de Jong, N. (2014). Acoustic behavior of microbubbles and implications for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 72, 28–48. doi: 10.1016/j.addr.2014.03.003

Koulenti, D., Tsigou, E., and Rello, J. (2017). Nosocomial pneumonia in 27 ICUs in Europe: perspectives from the EU-VAP/CAP study. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 36, 1999–2006. doi: 10.1007/s10096-016-2703-z

Leone, M., Bouadma, L., Bouhemad, B., Brissaud, O., Dauger, S., Gibot, S., et al. (2018). Hospital acquired pneumonia in ICU. *Anaesth. Crit. Care Pain Med.* 37, 83–98. doi: 10.1016/j.accpm.2017.11.006

Lichtenstein, D., Mézière, G., Biderman, P., Gepner, A., and Barré, O. (1997). The comet-tail artifact. An ultrasound sign of alveolar-interstitial syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156, 1640–1646. doi: 10.1164/ajrccm.156.5.96-07096

Lin, T., Cai, X. Z., Shi, M. M., Ying, Z. M., Hu, B., Zhou, C. H., et al. (2015). In vitro and in vivo evaluation of vancomycin-loaded PMMA cement in combination with ultrasound and microbubbles-mediated. *BioMed. Res. Int.* 2015, 309739. doi: 10.1155/2015/309739

Müllhaupt, D., Wenger, S., Kircher, P., Pfammatter, N., Hatt, J. M., and Ohlerth, S. (2017). Computed tomography of the thorax in rabbits: a prospective study in ten clinically healthy New Zealand White rabbits. *Acta Vet. Scand.* 59, 72–80. doi: 10.1186/s13028-017-0340-x

Martin-Loeches, I., Deja, M., Koulenti, D., Dimopoulos, G., Marsh, B., Torres, A., et al. (2013). Potentially resistant microorganisms in intubated patients with hospital-acquired pneumonia: the interaction of ecology, shock and risk factors. *Intensive Care Med.* 39, 672–681. doi: 10.1007/s00134-012-2808-5

Rello, J., Ollendorf, D. A., Oster, G., Vara-Llonch, M., Bellm, L., Redman, R., et al. (2002). Epidemiology and outcomes of ventilator-associated pneumonia in a large US database. *Chest* 122, 2115–2121. doi: 10.1378/chest.122.6.2115

Sennoga, C. A., Kanbar, E., Auboire, L., Dujardin, P. A., Fouan, D., Escoffre, J. M., et al. (2017). Microbubble-mediated ultrasound drug-delivery and therapeutic monitoring. *Expert Opin. Drug Deliv.* 14, 1031–1043. doi: 10.1080/17425247.2017.1266328

Shang, Y., Dong, X., Han, G., Li, J., Cui, D., Liu, C., et al. (2015). The roles of tight junctions and Claudin-1 in the microbubble-mediated ultrasound-induced enhancement of drug concentrations in rat prostate. *J. Membr. Biol.* 248, 1167–1173. doi: 10.1007/s00232-015-9834-5

Shih, C. P., Chen, H. C., Chen, H. H., Chiang, M. C., Sytwu, H. K., Lin, Y. C., et al. (2013). Ultrasound-aided microbubbles facilitate the delivery of drugs to the inner ear via the round window membrane. *J. Control Release* 167, 167–174. doi: 10.1016/j.jconrel.2013.01.028

Sugiyama, M., Mintsopoulos, V., Raheel, H., Goldenberg, N. M., Batt, J. E., Brochard, L., et al. (2018). Lung ultrasound and microbubbles enhance aminoglycoside efficacy and delivery to the lung in Escherichia coli-induced pneumonia and acute respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 198, 404–408. doi: 10.1164/rccm.201711-2259LE

Yu, F. T., Chen, X., Wang, J., Qin, B., and Villanueva, F. S. (2016). Low intensity ultrasound mediated liposomal doxorubicin delivery using polymer microbubbles. *Mol. Pharm.* 13, 55–64. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00421

Zhang, Y., Chang, S., Sun, J., Zhu, S., Pu, C., Li, Y., et al. (2015). Targeted Microbubbles for ultrasound mediated short hairpin RNA plasmid transfection to inhibit survivin gene expression and induce apoptosis of ovarian cancer A2780/DDP Cells. *Mol. Pharm.* 12, 3137–3145. doi: 10.1021/mp500835z

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

The handling editor is currently organizing a Research Topic with one of the authors J-ME, and confirms the absence of any other collaboration.

Copyright © 2020 Espitalier, Darrouzain, Escoffre, Ternant, Piver, Bouakaz and Remerand. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

III.2 **Expérimentation 5** : Actions des ultrasons et des microbulles de contraste sur la diffusion d'une faible concentration sanguine d'amikacine au sein du parenchyme pulmonaire de lapin

L'Expérimentation 4 a démontré la capacité des microbulles de contraste activées par les ultrasons à augmenter la concentration d'amikacine dans le tissu pulmonaire et le tissu musculaire lorsque la concentration plasmatique d'amikacine était à son pic.
L'objectif de l'Expérimentation 5 était d'étudier l'influence de la concentration plasmatique d'amikacine sur la diffusion de l'amikacine dans le parenchyme pulmonaire condensé soumis à l'action des microbulles de contraste activées par les ultrasons.

Expérimentation 5 : Actions des ultrasons et des microbulles de contraste sur la diffusion d'une faible concentration sanguine d'amikacine au sein du parenchyme pulmonaire de lapin.

Matériels et Méthodes

Sept lapins femelles adultes blancs, de race New Zealand, en bonne santé, ont été utilisés dans cette expérimentation. L'anesthésie de chaque lapin a été induite par inhalation dans un masque du gaz anesthésique Isoflurane à 3% (Isoflurane Belamont, Paris, France). Une fois anesthésié, le lapin était installé en décubitus dorsal sur une table radiante. La température corporelle était monitorée en continu par une sonde thermique rectale. La fréquence cardiaque et l'oxymétrie de pouls étaient monitorées en continu par une oxymètre de pouls portatif (PC-66V, Shenzhen creative industry, Shenzhen, China). Un cathéter veineux était positionné dans une veine marginale d'une oreille, relié à une tubulure trifurquée. Un bolus intraveineux d'atropine était injecté (100 µg) et une perfusion intraveineuse continue de sufentanil (3 $\mu g.h^{-1}$) et de propofol (15 $mg.h^{-1}$) était débutée. Après réalisation d'une trachéotomie, une sonde d'intubation (2,5 mm de diamètre interne, sans ballonnet) était positionnée dans la trachée. Le lapin était ventilé mécaniquement (Servo 300A, Siemens Elema, Solna Sweden) en mode volume contrôlé (fraction inspirée en oxygène : 1,0 ; volume courant : 8 $mL.kg^{-1}$; aucune pression positive n'était appliquée en fin d'expiration ; fréquence respiratoire : 50 à 65 cycles par minute avec pour objectif de maintenir la pression artérielle en CO2 dans les limites de la normale). Une relaxation musculaire était obtenue par des bolus intraveineux itératifs de d'atracurium (10 mg). L'injection intraveineuse à la seringue électrique d'amikacine (Mylan SAS, Saint Priest, France, 15 $mg.kg^{-1}$ dans 5 mL de chlorure de sodium pendant 30 minutes, en accord avec

l'étude de Gérard et al. (60), était débutée. Le début de l'administration de l'amikacine était noté comme T0. Un cathéter artériel était positionné dans l'artère fémorale droite du lapin afin d'obtenir un monitorage continu de la pression artérielle et de pouvoir effectuer des prélèvements sanguins (GE Datex-Ohmeda S/5, GE Datex Ohmeda, Helsinki, Finland). Une laparophrénotomie était ensuite réalisée afin de pouvoir administrer les ultrasons directement en contact avec le poumon droit.

Un cathéter (cathéter de péridurale avec mandrin 19G Vygon, Ecouen, France) était inséré entre la trachée et la sonde d'intubation. Le lapin était ensuite positionné en décubitus latéral droit, et 9 mL de chlorure de sodium étaient instillés dans la trachée par l'intermédiaire du cathéter. L'inondation du poumon droit (et donc sa condensation) ainsi que l'absence d'inondation du poumon gauche étaient ensuite contrôlées par la réalisation d'une échographie pulmonaire. L'inondation pulmonaire était réalisée quelques minutes avant le début de la sonification du poumon.

Les microbulles de contraste (Vevo MicroMarker, VisualSonics, Bracco Research, Geneva, Switzerland) ont été reconstituées dans 800 µL de chlorure de sodium à 0,9%. Les injections intraveineuses ont été réalisées sous forme de bolus de 400 µL par l'intermédiaire du cathéter veineux auriculaire. Un bolus de 1 mL de chlorure de sodium était administré afin de rincer la voie veineuse après injection de chaque bolus.

Une sonde constituée d'un transducteur en un seul élément (Sofranel, Sartrouville, France), d'un diamètre de 14 mm avec un focus naturel à 25 mm était utilisée. La fréquence centrale était de 1 MHz. Un signal électrique, généré par un générateur de d'onde arbitraire (Agilent, Santa Clara, CA), puis amplifié par un amplificateur de puissance (ADECE, Artannes sur Indre, France), était appliqué à la sonde. Le pic de pression négative de l'onde ultrasonore était mesuré dans un autre dispositif utilisant une aiguille hydrophone en PVDF calibrée (diamètre 0,2 mm ; Precision Acoustics Ltd., Dorchester, UK) à la distance naturelle de focalisation du transducteur. Lors de la sonification, les tissus pulmonaire et musculaire étaient soumis à des ondes ultrasonores sinusoïdales de 1 MHz, avec une période de répétition d'impulsion de 100 µs, 40 cycles par impulsion. La pression acoustique appliquée, c'est-à-dire la pression de pic négatif, était sélectionnée à 400 kPa. La durée d'application était de 3 minutes. Après inondation du poumon droit, et une minute après injection intraveineuses des microbulles, le poumon droit était insonifié par voie interne (trans laparophrénotomie) pendant 3 minutes, 150 minutes (T150) après le début de la perfusion d'amikacine. Dix minutes après la première injection, une 2ème injection intraveineuse de microbulles était effectuée. Une minute après la 2ème injection de microbulles, soit 160 minutes après le début de la perfusion d'amikacine (T160), le poumon droit était insonifié pendant 3 minutes pour la deuxième fois. Dans cette expérimentation le muscle n'était pas

soumis aux ultrasons. L'exsanguination du lapin était réalisée via la canule artérielle à 170 minutes (T170). Une incision cervico-thoracique était réalisée par laquelle les deux poumons étaient ensuite disséqués et séparés avec précaution. Les faces ventrales et dorsales des poumons étaient photographiées avant que les bronches soient séparées du reste du parenchyme pulmonaire. Les prélèvements pulmonaires étaient ensuite pesés à l'aide d'une balance micrométrique avant d'être broyés mécaniquement dans 5 mL de chlorure de sodium par l'ultra-Turrax T10 (IKA-Werke, GMBsH & Co., Staufen, Germany). Les échantillons étaient ensuite congelés à -20°C avant que les dosages par immunofluorescence de l'amikacine ne soient réalisés selon le protocole de dosage de l'amikacine dans le broyat pulmonaire décrit précédemment. Après que les corrections précédemment décrites pour s'affranchir de l'effet de dilution survenant dans le poumon droit inondé aient été appliquées, les concentrations d'amikacine ont été comparées entre les surnageants des poumons droits soumis aux ultrasons et des poumons gauches non soumis aux ultrasons grâce à un test de Wilcoxon, chaque lapin étant son propre contrôle. Les résultats sont exprimés en médiane [1er quartile – 3ème quartile] ou en valeurs absolues. Un $p < 0,05$ était considéré comme statistiquement significatif. Les tests statistiques ont été réalisés grâce à SPSS 25 (IBM France statistics, Bois Colombes, France).

Résultats

A T160, grâce à l'usage des microbulles de contraste activées par les ultrasons, la concentration d'amikacine dans le parenchyme pulmonaire condensé du poumon droit était 1,5 fois plus élevée que la concentration d'amikacine dans le parenchyme du poumon gauche non soumis aux ultrasons. Les concentrations pulmonaires d'amikacine étaient, respectivement, de 6,1 [4,6 – 8,2] mg/g et de 3,9 [3,6 – 4,2] mg/g dans le poumon droit soumis aux ultrasons et dans le poumon gauche non soumis aux ultrasons (p=0,028). Les résultats sont présentés dans la Figure III.1.

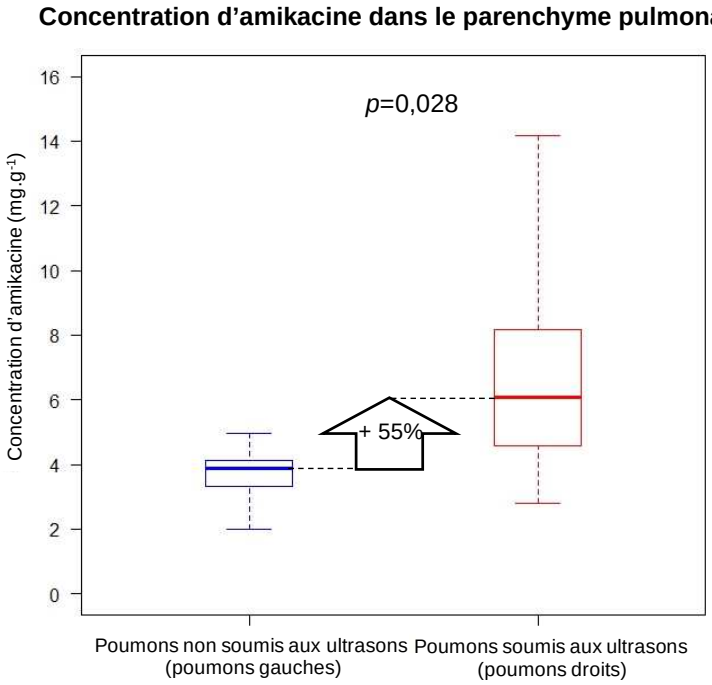


Figure III.1 - Concentration d'amikacine dans le parenchyme pulmonaire à T160.

III.3 **Expérimentation 6** : Actions des ultrasons et des microbulles de contraste sur la diffusion de la vancomycine au sein des parenchymes pulmonaire et musculaire de lapin

Dans le but de limiter le nombre d'animaux utilisés dans la recherche, comme cela a été expliqué dans le paragraphe Éthique animale, les mêmes animaux ont reçu simultanément les antibiotiques vancomycine et ceftazidime. Ces deux antibiotiques ont une action temps-dépendante. Ainsi la sonoporation pouvait être effectuée à tout moment pour les deux antibiotiques. De plus, les deux antibiotiques n'entraient en concurrence ni pour les voies d'élimination, ni pour les techniques de dosage au sein du parenchyme. Cependant, pour plus de clarté dans l'exposé de nos résultats, nous avons choisi de présenter les résultats de l'action de la sonoporation sur la concentration tissulaire de la vancomycine et de la ceftazidime comme deux expérimentations distinctes.

Expérimentation 6 : Actions des ultrasons et des microbulles de contraste sur la diffusion de la vancomycine au sein des parenchymes pulmonaire et musculaire de lapin.

Matériels et Méthodes

Cinq lapins femelles adultes blancs, de race New Zealand, en bonne santé, de 3000 à 5500 g, ont été utilisés dans cette expérimentation. L'anesthésie de chaque lapin a été induite par inhalation dans un masque d'Isoflurane 3% (Isoflurane Belamont, Paris, France). Une fois anesthésié, le lapin était installé en décubitus dorsal sur une table radiante. La température corporelle était monitorée en continu par une sonde thermique rectale. La fréquence cardiaque et l'oxymétrie de pouls étaient monitorées en continu par un oxymètre de pouls portatif (PC-66V, Shenzhen creative industry, Shenzhen, China). Un cathéter veineux était positionné dans une veine marginale d'une oreille, relié à une tubulure trifurquée. Un bolus intraveineux d'atropine était injecté (100 µg) et une perfusion intraveineuse continue de sufentanil (3 $\mu g.h^{-1}$) et de propofol (15 $mg.h^{-1}$) était débutée. Un deuxième cathéter veineux était positionné dans une veine marginale d'une oreille, relié à une tubulure trifurquée. L'administration de chaque antibiotique (vancomycine et ceftazidime) était réalisée chacune sur un des 2 cathéters veineux, de sorte à ne pas mélanger les 2 molécules qui présentent des incompatibilités physico-chimiques lorsqu'elles sont administrées en Y sur le même cathéter veineux. En effet, la solution de vancomycine est naturellement acide (pH=3), alors que la ceftazidime a un pH compris entre 5 et 8. Après réalisation d'une trachéotomie, une sonde d'intubation (2,5 mm de diamètre interne, sans ballonnet) était positionnée dans la trachée. Le lapin était ventilé mécaniquement (Servo 300A, Siemens Elema, Solna Sweden) en mode volume contrôlé (fraction inspirée en oxygène : 1,0 ; volume courant : 8 $mL.kg^{-1}$; aucune pression positive n'était appliquée en fin d'expiration ; fréquence respiratoire : 50 à 65 cycles par minute avec pour objectif de maintenir la pression artérielle en CO2 dans les limites de la normale). Une relaxation musculaire était obtenue par des bolus intraveineux itératifs d'atracurium (10 mg). Un cathéter artériel était positionné dans l'artère fémorale droite du lapin afin d'obtenir un monitorage continu de la pression artérielle et de pouvoir effectuer des prélèvements sanguins (GE Datex-Ohmeda S/5, GE Datex Ohmeda, Helsinki, Finland). Une laparophrénotomie était ensuite réalisée afin de pouvoir administrer les ultrasons directement en contact avec le poumon droit.

L'administration des antibiotiques était réalisée de la façon suivante :

- Pour la vancomycine : bolus intraveineux de 20 $mg.kg^{-1}$ dans 10 mL de chlorure de sodium administré en 30 minutes, puis 1,25 $mg.kg^{-1}.h^{-1}$ intraveineux en injection

continue (soit 30 $mg.kg^{-1}$ dans 48 mL de chlorure de sodium administré intraveineux en injection continue à 2 $ml.h^{-1}$).

- Pour la ceftazidime : 25 $mg.kg.h^{-1}$ intraveineux en injection continue (soit 1 g dans 50 mL de chlorure de sodium administré à 1,25 $mL.h^{-1}$ x poids).

Le bolus de vancomycine et la perfusion de ceftazidime ont été débutés au même moment. Le début de la perfusion des antibiotiques définissait le temps T0 minute.

Un cathéter (cathéter de péridurale avec mandrin 19G Vygon, Ecouen, France) était inséré entre la trachée et la sonde d'intubation. Le lapin était ensuite positionné en décubitus latéral droit, et 9 mL de chlorure de sodium étaient instillés dans la trachée par l'intermédiaire du cathéter. L'inondation du poumon droit (et donc sa condensation) ainsi que l'absence d'inondation du poumon gauche étaient ensuite contrôlées par la réalisation d'une échographie pulmonaire. L'inondation pulmonaire était réalisée quelques minutes avant le début de la sonification.

Les microbulles de contraste (Vevo MicroMarker, VisualSonics, Bracco Research, Geneva, Switzerland) ont été reconstituées dans 800 µL de chlorure de sodium à 0,9%. Les injections intraveineuses ont été réalisées sous forme de bolus de 400 µL par l'intermédiaire du cathéter veineux auriculaire. Un bolus de 1 mL de chlorure de sodium était administré afin de rincer la voie veineuse après injection de chaque bolus.

Une sonde constituée d'un transducteur en un seul élément (Sofranel, Sartrouville, France), d'un diamètre de 14 mm avec un focus naturel à 25 mm était utilisée. La fréquence centrale était de 1 MHz. Un signal électrique, généré par un générateur d'onde arbitraire (Agilent, Santa Clara, CA), puis amplifié par un amplificateur de puissance (ADECE, Artannes sur Indre, France), était appliqué à la sonde. Le pic de pression négative de l'onde ultrasonore était mesuré dans un autre dispositif utilisant une aiguille hydrophone en PVDF calibrée (diamètre 0,2 mm ; Precision Acoustics Ltd., Dorchester, UK) à la distance naturelle de focalisation du transducteur. Lors de la sonification, les tissus pulmonaire et musculaire étaient soumis à des ondes ultrasonores sinusoïdales de 1 MHz, avec une période de répétition d'impulsion de 100 µs, 40 cycles par impulsion. La pression acoustique appliquée, c'est-à-dire la pression de pic négatif, était sélectionnée à 400 kPa. La durée d'application était de 3 minutes. A T60, soit 60 minutes après le début de l'injection des antibiotiques, après l'inondation du poumon droit et une minute après injection intraveineuses des microbulles, le poumon droit était insonifié par voie interne (trans laparophrénotomie) pendant 3 minutes. Dix minutes après la première injection (T70), une 2ème injection intraveineuse de microbulles était effectuée. Une minute après la 2ème injection de microbulles, le muscle d'une patte antérieure (droite ou gauche, par randomisation) était

insonifié pendant 3 minutes par voie transcutanée après rasage. La zone musculaire insonifiée était délimitée par 4 aiguilles, ce qui permettait de réaliser le prélèvement musculaire dans la zone insonifiée.

L'exsanguination du lapin était réalisée via la canule artérielle à la 90ème minute (T90). Une incision cervico-thoracique était réalisée par laquelle les deux poumons étaient ensuite disséqués et retirés en bloc avec l'arbre trachéobronchique. Les faces ventrales et dorsales des poumons étaient inspectées et photographiées avant que les bronches soient séparées du reste du parenchyme pulmonaire. Les lobes pulmonaires étaient séparés avec précaution. Après ouverture de la peau, un prélèvement musculaire (5 à 10 mm de diamètre, sans séreuse) était effectué sur la patte antérieure dans la zone centrale d'administration des ultrasons (repérée par 4 aiguilles). Un autre prélèvement musculaire était réalisé dans une zone identique sur la patte antérieure controlatérale non soumise aux ultrasons. Les prélèvements tissulaires étaient ensuite pesés à l'aide d'une balance micrométrique avant d'être broyés mécaniquement dans 5 mL de chlorure de sodium par l'ultra-Turrax T10 (IKA-Werke, GMBsH & Co., Staufen, Germany). Les échantillons étaient ensuite congelés à -20°C avant que les dosages par immunofluorescence de la vancomycine ne soient réalisés selon le protocole de dosage de la vancomycine dans le broyat pulmonaire et musculaire décrit précédemment. Après que les corrections pour s'affranchir de l'effet de dilution survenant dans le poumon droit inondé aient été appliquées, les concentrations de vancomycine ont été comparées entre les surnageants des poumons droits soumis aux ultrasons et des poumons gauches non soumis aux ultrasons grâce à un test de Wilcoxon, chaque lapin étant son propre contrôle. Le même test a été utilisé pour comparer les concentrations de vancomycine des surnageants des muscles soumis aux ultrasons aux surnageants des muscles non soumis aux ultrasons. Les résultats sont exprimés en médiane [1er quartile – 3ème quartile] ou en valeurs absolues. Un $p < 0,05$ était considéré comme statistiquement significatif. Les tests statistiques ont été réalisés grâce à SPSS 25 (IBM France statistics, Bois Colombes, France).

Résultats

Un des dosages pulmonaires gauche n'a pu être réalisé pour des raisons techniques. Les résultats portent donc sur 4 lapins pour les dosages pulmonaires, et sur 5 lapins pour les dosages musculaires.

Dans aucun des 4 cas, la concentration pulmonaire en vancomycine n'était augmentée dans le poumon droit insonifié. Les concentrations pulmonaires médianes de vancomycine étaient, respectivement, de 26,4 [19,1 – 32,6] $mg.g^{-1}$ et de 36,6 [28,0 – 42,5] $mg.g^{-1}$ dans le poumon droit soumis aux ultrasons et dans le poumon gauche non soumis aux ultrasons.
Les muscles ont été sonoporés du côté droit chez 3 lapins, et du côté gauche chez 2 lapins. Les concentrations musculaires médianes de vancomycine étaient, respectivement, de 54,1 [42,6 – 120,4] $mg.g^{-1}$ et de 73,3 [68,8 – 153,3] $mg.g^{-1}$ dans le muscle soumis aux ultrasons et dans celui non soumis aux ultrasons (p=1,000).

Discussion

Cette expérimentation ne démontre pas d'effet des microbulles associées aux ultrasons pour augmenter la concentration de vancomycine dans les tissus pulmonaires et musculaires.
Ces résultats sont surprenants. En effet, 3 études chez le lapin avaient montré que l'administration de microbulles et d'ultrasons augmentait l'action bactéricide de la vancomycine sur des corps étrangers colonisés à staphylocoques (51)(52)(64). Ces protocoles étaient toutefois assez différents du nôtre, notamment sur trois aspects. Premièrement, les milieux étudiés étaient le muscle et le poumon dans notre étude, et les tissus sous cutanés (51) (64) ou médullaire (dans le tibia)(52) dans ces 3 études. L'effet des ultrasons et des microbulles sur la diffusion de la vancomycine pourrait différer d'un tissu à l'autre. Deuxièmement, les microbulles étaient injectées en intraveineux dans notre étude, alors qu'elles étaient injectées directement dans le milieu étudié dans ces 3 études. Il parait logique que l'effet des microbulles soit dans ce cas plus important, car elles sont directement au contact des bactéries. Néanmoins, il parait irréalisable d'injecter directement des microbulles dans le poumon. De plus, l'effet décrit dans ces 3 études ne nécessite pas de passage du compartiment sanguin vers le tissu interstitiel. Nos résultats suggèrent que la sonoporation pourrait augmenter la diffusion de la vancomycine à travers les membranes bactériennes, mais pas à travers les parois des capillaires vasculaires. Troisièmement, une seule application de microbulles et d'ultrasons a été réalisée dans notre étude, contre 4 à 9 traitements dans les 3 études. Ceci suggère que plusieurs applications d'ultrasons et de microbulles pourraient être nécessaires pour augmenter la diffusion de la vancomycine dans le parenchyme pulmonaire. Ceci serait d'autant plus logique que la vancomycine a une action dépendante du temps. Augmenter ponctuellement sa concentration tissulaire aurait probablement un impact limité sur la croissance bactérienne. Mais augmenter graduellement sa concentration dans le poumon sous-entend une augmentation de concentration à chaque nouvelle sonoporation. Celle-ci n'a pas pu être mise en évidence lors

de la première sonoporation. Il est à noter que les concentrations d'aminosides augmentent, elles, dans le poumon dès la première sonoporation, comme démontré dans les Expérimentations 4 et 5 et dans le travail de Sugiyama et al (65).

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer l'absence d'augmentation de la concentration tissulaire pulmonaire et musculaire de la vancomycine :

La première hypothèse est une dysfonction du matériel générant et émettant les ultrasons ou un réglage erroné de ces appareils. Cependant, le contrôle systématique du matériel (branchements, mise en tension des appareils) et des réglages techniques de ces dispositifs avant chaque expérimentation n'avait pas identifié de problème évident au cours de l'expérimentation.

La deuxième hypothèse est une incompatibilité physico-chimique entre les différentes molécules injectées par voie intraveineuse dans notre expérimentation. Nous avions pris soin de ne pas injecter la ceftazidime et la vancomycine sur la même voie veineuse afin d'éviter des réactions chimiques entre ces deux molécules qui présentent des pH différents. L'hypothèse d'incompatibilité physico-chimique entre la vancomycine et la ceftazidime survenant dans l'espace intravasculaire qui aurait modifié les propriétés physico-chimiques de la vancomycine et aurait altéré son passage au travers des pores créés dans les jonctions intercellaires lors de la sonoporation semble peu probable. L'hypothèse de réactions chimiques survenant entre la vancomycine et le sufentanil, le propofol, l'atracurium ou l'atropine semble également peu probable car toutes ces molécules étaient injectées sur la voie veineuse de la ceftazidime et pas sur celle de la vancomycine.

La troisième hypothèse est une destruction de la molécule de vancomycine rendant inopérant le dosage par immunofluorescence. Cette destruction de la molécule aurait pu survenir du fait de l'action des ultrasons sur la vancomycine ou du fait de la conservation à -20°C des prélèvements avant le dosage. Dans le cas d'une destruction par les ultrasons, il serait attendu une diminution de la concentration de vancomycine dans les tissus sonoporés. Or la concentration de vancomycine, non différente dans les tissus sonoporés et les tissus non sonoporés dans notre expérimentation, n'est pas en faveur de cette hypothèse. Dans le cas d'une destruction par la conservation à -20°C des prélèvements avant le dosage, il serait attendu une forte diminution de la concentration de vancomycine dans tous les tissus. Cependant les résultats des dosages effectués semblent cohérents avec la quantité de vancomycine administrée par voie intraveineuse, et ne sont pas en faveur d'une destruction de la molécule par le froid.

La quatrième hypothèse est une technique de dosage de la vancomycine inappropriée. En effet, la méthode de dosage de la vancomycine par immunofluorescence a été développée pour être réalisée sur du sérum et pourrait être prise en défaut si elle était réalisée sur des

matrices plus riches en protéines. Il serait attendu, dans cette hypothèse, une forte diminution de la concentration de vancomycine dans tous les tissus ou des dosages aberrants. Cependant les résultats des dosages effectués semblent cohérents avec la quantité de vancomycine administrée par voie intraveineuse. Par ailleurs, comme exposé précédemment, la technique de dosage a été préalablement testée et validée avec la vancomycine pour les tissus pulmonaires et musculaires. Ces différents arguments ne sont pas en faveur d'un défaut de la technique de dosage.

La cinquième hypothèse tient à la molécule de vancomycine en elle-même. D'abord, la taille de la molécule de vancomycine pourrait empêcher sa diffusion au travers des pores créés par la sonoporation. Cette hypothèse est peu probable car la molécule de vancomycine mesure 1,5 kDa, ce qui est moins que des molécules de dextran fluorescent de 4,4 et 70 kDa dont la pénétration homogène dans le cytosol cellulaire a été augmentée grâce à la sonoporation (66). La molécule de vancomycine pourrait présenter un encombrement stérique empêchant sa diffusion au travers des pores des jonctions intercellulaires créés par la sonoporation. Enfin, la molécule de vancomycine pourrait présenter une charge ionique empêchant sa diffusion au travers des pores des jonctions intercellulaires créés par la sonoporation. Ces dernières hypothèses nécessitent une exploration spécifique.

A minima, la diffusion de la vancomycine semble difficilement améliorable dans le poumon par la sonoporation.

Chapitre IV - Discussion

IV.1 Rappels des résultats principaux

Les Expérimentations 4 et 5 démontrent que la sonoporation permet l'augmentation significative de la concentration d'amikacine, antibiotique de la classe des aminosides, dans le parenchyme pulmonaire condensé ventilé mécaniquement. L'étude de Sugiyama et al. confirme nos résultats, cette équipe ayant montré que la sonoporation augmentait la concentration d'un autre aminoside, la gentamycine, dans le parenchyme pulmonaire de souris atteintes de syndrome de détresse respiratoire aigüe d'origine infectieuse (65). Dans nos expérimentations, la sonoporation augmentait la concentration pulmonaire d'amikacine de 33 à 55% alors que dans l'étude de Sugiyama et al., l'augmentation de la concentration de gentamycine était de plus de 200% (65). Cette différence est probablement liée au fait que, dans nos Expérimentations, seule une petite partie du parenchyme pulmonaire du lapin était effectivement soumise aux ultrasons, alors que dans l'étude de Sugiyama et al. l'ensemble du thorax des souris était soumis aux ultrasons, optimisant ainsi l'effet de la sonoporation. Ces résultats, obtenus sur modèles animaux, ne sont pas extrapolables à l'être humain mais ouvrent un nouveau champ de possibilités qui pourrait permettre d'améliorer la prise en charge des pneumopathies d'origine infectieuse.

L'Expérimentation 4 est la première à démontrer une augmentation de la concentration musculaire d'amikacine après sonoporation. Cette augmentation était de 152%, alors que l'augmentation de la concentration pulmonaire était de 33%. Cette importante différence est liée au type d'organe exposé aux ultrasons : contrairement au poumon, le muscle est superficiel, facilement accessible aux ultrasons car ne présentant pas d'interface eau / air et immobile. De plus, la zone d'administration des ultrasons sur le muscle était facilement repérable ce qui a permis de prélever un échantillon de tissu musculaire dont la plus grande portion était exposée aux ultrasons et donc aux effets de la sonoporation. Cette différence d'augmentation de la concentration tissulaire d'amikacine entre poumon et muscle était attendue, le modèle musculaire ayant initialement été introduit comme preuve du concept. Si on compare les résultats des dosages musculaires (+152 % d'augmentation de la concentration musculaire d'amikacine) aux dosages pulmonaires de Sugiyama et al. (> 200 % d'augmentation de la concentration tissulaire de gentamycine) (65), il est probable que l'effet réel de la sonoporation soit de doubler la concentration d'aminosides dans un tissu y étant exposé. Ainsi, une application thérapeutique pourrait être envisagée en cas d'infection des tissus musculaires.

L'Expérimentation 6 ne met pas en évidence d'effet de la sonoporation sur l'augmentation de la concentration tissulaire de vancomycine, que ce soit dans le tissu pulmonaire ou dans le tissu musculaire.

IV.2 Limitations

Nos travaux sous-estiment probablement l'effet réel de la sonoporation dans le tissu pulmonaire, du fait de contraintes anatomiques et techniques. Les limitations liées au modèle animal, au modèle pulmonaire, au matériel, à la technique ultrasonore et au mode de dosage des antibiotiques sont discutées dans les paragraphes suivants.

IV.2.1 Limitations liées au modèle animal

Du fait de l'anatomie particulière du lapin, décrite dans l'introduction, l'administration trans thoracique des ultrasons n'a pas été choisie dans cette expérimentation afin de réduire le risque de sonification du cœur. En effet, si le poumon et le cœur avaient été insonifiés simultanément, les microbulles risquaient d'être détruites dans les cavités cardiaques droites, n'atteignant pas le poumon en nombre suffisant pour démontrer l'efficacité de la sonoporation. Ainsi, une application directe de la sonde émettrice d'ultrasons sur le lobe inférieur droit du poumon par l'intermédiaire d'une laparophrénotomie, permettant la sonification du poumon tout en évitant le cœur, a été nécessaire. La petite taille du lapin devant la taille de la sonde utilisée pour la sonification, ainsi que l'étroitesse de son thorax ne permettaient que de très petits mouvements de la sonde au contact du lobe inférieur du poumon droit.

En pratique clinique humaine, au lit du patient, les poumons et leurs différents lobes peuvent facilement être explorés par les ultrasons, sans visualiser le cœur. Ainsi, la sonoporation semble réalisable en pratique clinique avec des sondes adaptées possédant un faisceau ultrasonore plus large.

IV.2.2 Limitations liées au modèle pulmonaire

- La diffusion des ultrasons au sein d'un organe pneumatisé tel quel que le poumon est perturbée, l'interface eau/air entrainant une réflexion de la quasi-totalité des ultrasons. Le comblement par le chlorure de sodium des alvéoles pulmonaires et des structures bronchiques naturellement aérées a supprimé l'interface eau/air et a permis la diffusion des ultrasons dans le parenchyme pulmonaire. Le fait d'inonder les alvéoles pulmonaires crée un espace pulmonaire perfusé par le système vasculaire pulmonaire, mais non ventilé. Ceci induit un shunt intra pulmonaire, le sang veineux passant dans le poumon sans que les échanges gazeux puissent être assurés. Le résultat est que ce sang faiblement concentré en oxygène va directement aller se mêler au sang artériel. Ceci génère donc une hypoxémie. Pour

limiter ce phénomène, chez l'être humain, un shunt intra pulmonaire entraine une vasoconstriction réflexe des capillaires pulmonaires. Elle vise à réduire la quantité de sang passant dans cette zone où les échanges gazeux ne sont pas effectués. Ce réflexe est appelé vasoconstriction pulmonaire hypoxique. La vasoconstriction pulmonaire hypoxique a aussi été décrite chez les lapins (67,68). Dans nos expérimentations, le poumon insonifié était préalablement inondé par le sérum physiologique. Ainsi la vasoconstriction hypoxique a pu diminuer le flux sanguin dans le poumon insonifié, limitant la quantité de microbulles présente dans cette partie du poumon et diminuant donc l'effet de la sonoporation. D'un autre côté, la vasoconstriction pulmonaire hypoxique est abolie en cas d'inflammation locale, comme c'est le cas lors des pneumonies. Il est donc possible que, chez un patient atteint de pneumonie, l'effet de la sonoporation ne soit pas limité par le réflexe de vasoconstriction hypoxique.

- Une partie importante des 9 mL de chlorure de sodium instillés dans le poumon pour permettre la diffusion des ultrasons a été trappée, augmentant ainsi la dilution des molécules d'antibiotique contenues dans le poumon au moment du dosage. Ceci a abouti à une sous-estimation de l'effet de la sonoporation sur la diffusion des molécules d'antibiotique dans le parenchyme pulmonaire. Il a donc été nécessaire de corriger cette dilution afin d'estimer de façon plus juste l'effet de la sonoporation. La méthode développée, s'appuyant sur le calcul du poids du poumon droit à partir du poids du poumon gauche avant instillation du chlorure de sodium, a permis d'approcher la concentration d'antibiotique dans le poumon soumis à la sonoporation. Cependant cette méthode est imparfaite car elle repose sur un rapport statistique entre le poids des deux poumons. Une méthode incluant la dessiccation du tissu pulmonaire avant le dosage des antibiotiques aurait permis une évaluation plus précise de l'effet de la sonoporation sur le parenchyme pulmonaire. Cette technique n'était pas à notre disposition au cours de nos expérimentations.

IV.2.3 Limitations liées au matériel

La sonde émettrice d'ultrasons que nous avons utilisée avait un faisceau ultrasonore étroit (5 mm de diamètre) et était encombrante en comparaison du volume du thorax de lapin. Ainsi, mobiliser la sonde positionnée au contact du poumon à travers la laparophrénotomie était très difficile et les mouvements de balayage du faisceau, qui auraient pu augmenter la quantité de poumon insonifié, étaient extrêmement limités. Il en résulte que seul un petit volume du lobe inférieur du poumon droit a été insonifié. Avec un faisceau de sonde plus large et avec une sonde moins encombrante, la sonoporation d'un volume plus grand de tissu

pulmonaire aurait été possible et l'augmentation de diffusion des antibiotiques dans le poumon soumis à la sonoporation aurait été plus facile à mettre en évidence.

IV.2.4 Limitations liées à la technique ultrasonore

Plusieurs études ont rapporté que les ultrasons pouvaient induire des hémorragies capillaires pulmonaires chez le petit animal comme le rat, mais également chez le lapin (69). Dans cette dernière étude, les paramètres d'émission des ultrasons étaient très différents des nôtres, générant une pression acoustique importante responsable de lésions pulmonaires. De telles complications sont faciles à détecter macroscopiquement car un point rouge ou marron, situé dans l'aire pulmonaire en contact avec la sonde émettrice d'ultrasons, est présent. Dans notre expérimentation aucune atteinte pulmonaire macroscopique n'a été observée lorsque les poumons ont été prélevés. Nous n'avons pas observé de sang trappé ou d'hémorragie dans le poumon insonifié après exsanguination. De futures expérimentations sur ce sujet devraient évaluer, par examen anatomo-pathologique, la répercussion tissulaire pulmonaire de la sonoporation en pratique clinique avec notre approche technique (réglages, matériel). Chez l'être humain, l'imagerie ultrasonore est largement utilisée depuis plus de 20 ans en pratique clinique, y compris pour des poumons endommagés (70). A notre connaissance aucun effet délétère des ultrasons n'a été rapporté pour ces examens.

IV.2.5 Limitations liées au mode de dosage des antibiotiques

Le dosage des antibiotiques était effectué dans le surnageant des broyats tissulaires, ce qui a permis de conclure à une augmentation de la concentration d'antibiotique dans les tissus, sans pouvoir préciser si cette augmentation avait bien lieu dans le tissu interstitiel. Cette information est importante car c'est la diffusion des antibiotiques dans le secteur interstitiel qui permet le traitement des pneumopathies. L'utilisation de molécules radio marquées pourrait permettre de donner, dans des expérimentations futures, des informations complémentaires sur la localisation intra tissulaire des antibiotiques.

IV.3 Axes d'amélioration et perspectives

La sonoporation a démontré sa capacité à augmenter la concentration d'amikacine dans les tissus pulmonaire et musculaire de lapin. Cependant la technique nécessite des

améliorations matérielles. De plus, devant l'échec de la sonoporation à augmenter la concentration tissulaire de vancomycine, d'autres antibiotiques doivent être testés. Enfin, le modèle développé ici n'a pas testé l'efficacité de l'augmentation de la concentration d'antibiotiques dans le parenchyme pulmonaire pour traiter une pneumopathie bactérienne.

IV.3.1 Évolution du modèle : vers le grand animal infecté

Le grand animal, notamment le porc, présente un modèle pulmonaire se rapprochant de celui de l'Homme. Développer un tel modèle permettrait de tester les principes de la sonoporation en s'affranchissant des limites anatomiques liées au modèle de lapin, ainsi qu'aux limites en lien avec la taille de l'animal. Il pourrait permettre également de mesurer la sécurité d'usage des ultrasons dans le cadre de la sonoporation sur le parenchyme pulmonaire.

Par ailleurs, la possibilité de tester nos hypothèses sur un animal atteint d'une pneumopathie serait un élément supplémentaire qui nous permettrait de passer d'une étude de preuve du concept à une étude d'application du concept. L'efficacité de l'augmentation de la concentration tissulaire d'antibiotiques pour traiter une pneumopathie, attestée par la régression de la pneumopathie après usage de la technique de sonoporation, ouvrirait la voie à une application thérapeutique de cette technique chez l'être humain.

Dans leur étude qui utilisait la gentamicine, Sugiyama et al. évaluaient l'impact de la sonoporation pulmonaire sur le nombre de colonies d'*E. coli* présent dans les poumons d'un modèle de souris présentant un syndrome de détresse respiratoire aiguë de cause bactérienne. Six heures après l'infestation bactérienne, les souris recevaient 1,5 $mg.kg^{-1}$ de gentamicine par voie intra-péritonéale. Trente minutes après, l'administration intra-veineuse de microbulles de contraste et l'application d'ultrasons sur le thorax étaient réalisés. Deux heures après les souris étaient sacrifiées, et les broyats pulmonaires étaient disposés sur gel d'agar. Le compte des colonies bactériennes montrait une diminution de 1-log des colonies bactériennes dans le groupe des souris soumises à la sonoporation par rapport aux différents groupes contrôles (65). Cette expérience vient renforcer l'idée qu'en augmentant la diffusion et la concentration dans le poumon de la gentamicine par la sonoporation, l'effet antibactérien de la molécule est renforcé. Cependant, si elle apporte des arguments en faveur de l'effet thérapeutique de la sonoporation, cette étude ne démontre pas la guérison d'animaux infectés. Ainsi, la réalisation d'une étude démontrant l'amélioration de la guérison d'une infection pulmonaire grâce à la sonoporation reste nécessaire.

IV.3.2 Adaptation du matériel

La sonde utilisée dans nos expérimentations est une sonde de petite taille, développée initialement pour des expériences de laboratoire sur des animaux de petite taille, par voie externe. Le développement d'un modèle de grand animal nécessiterait le développement conjoint d'une sonde émettrice d'ultrasons adaptée à la taille de l'animal, c'est à dire ayant : un point focal plus profond, un faisceau ultrasonore plus large, un design permettant le balayage ultrasonore large de la zone pulmonaire. Le protocole d'administration des ultrasons est une autre voie possible d'amélioration. Actuellement, l'effet de la durée d'administration, du nombre d'administration, de la puissance d'administration des ultrasons, ainsi que le volume de solutions de microbulles, n'ont pas été précisés dans les études actuellement publiées.

IV.3.3 Tester d'autres antibiotiques

Les résultats négatifs de l'augmentation de la concentration tissulaire de vancomycine (glycopeptide) par la sonoporation souligne l'impossibilité de généraliser l'applicabilité de la sonoporation à toutes les classes d'antibiotiques ainsi que la nécessité de tester les antibiotiques utilisés en réanimation pour traiter les pneumopathies et dont on souhaite augmenter la diffusion pulmonaire tout en limitant les effets systémiques. Malgré l'efficacité de la sonoporation pour augmenter la concentration tissulaire d'amikacine, tester l'effet de la sonoporation sur les autres aminosides (nétilmicine, tobramycine) paraît nécessaire, les expérimentations effectuées sur la gentamicine étant convaincantes (65). Il semble également intéressant de tester l'effet de la sonoporation sur la concentration tissulaire de teicoplanine, autre représentant de la classe des glycopeptides. Des ß-lactamines, telles que la céfépime, pourrait également être testées. Enfin, la colimycine (antibiotique du groupe des polymyxines), antibiotique à faible diffusion pulmonaire, d'index thérapeutique étroit, néphrotoxique et neurotoxique, mais efficace sur certaines bactéries résistantes aux antibiotiques les plus courants, serait une molécule dont l'augmentation tissulaire de concentration par la sonoporation pourrait avoir un grand intérêt thérapeutique.

IV.3.4 Tester des microbulles chargées d'antibiotiques

Les microbulles ont déjà été utilisées comme vecteur de molécule présentant une toxicité systémique telles que les chimiothérapies anticancéreuses. Il serait donc possible, théoriquement, d'accrocher des antibiotiques aux microbulles de contraste, ce qui permettrait de ne plus avoir de molécule d'antibiotiques libres dans le sang et donc de réduire encore le risque de toxicité systémique. En effet, les antibiotiques pourraient être encapsulés dans les microbulles ou être fixés à leur surface et n'être libérées qu'après destruction des microbulles par les ultrasons. Une destruction ciblée des microbulles par les ultrasons dans l'organe cible permettrait la création des micropores dans les parois vasculaires et le relargage de la drogue dans l'organe cible sans diffusion massive systémique de la drogue.

Enfin, des microbulles ciblées sur une molécule prédéfinies peuvent permettre d'affiner un diagnostic, principalement en cancérologie. Des microbulles chargées d'antibiotiques capables de se fixer sur un organe cible pourraient être d'un intérêt encore plus grand car elles permettraient une administration encore plus précise et raisonnée des antibiotiques.

Conclusion

L'administration conjointe d'ultrasons et de microbulles de contraste pourrait améliorer l'efficacité de certains antibiotiques en augmentant leur concentration dans un organe cible, sans en augmenter leur concentration systémique et leurs effets indésirables liés à la dose. Elle semble être une voie prometteuse pour augmenter la concentration d'amikacine dans le parenchyme pulmonaire condensé et dans le tissu musculaire. Cette approche est probablement très dépendante de la famille d'antibiotique employée, comme le suggère l'absence de capacité de la sonoporation à augmenter la concentration de la vancomycine. L'optimisation de cette approche, par exemple avec l'usage de microbulles chargées d'antibiotiques, pourrait améliorer grandement l'effet observé. La confirmation des résultats de nos expérimentations par la guérison d'un modèle animal infecté est maintenant l'étape nécessaire pour envisager cette approche thérapeutique innovante chez l'être humain.

Bibliographie

1. American Thoracic Society, Infectious Diseases Society of America. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. Am J Respir Crit Care Med. 15 févr 2005;171(4):388-416.

2. Rello J, Ollendorf DA, Oster G, Vera-Llonch M, Bellm L, Redman R, et al. Epidemiology and outcomes of ventilator-associated pneumonia in a large US database. Chest. déc 2002;122(6):2115-21.

3. Asehnoune K, Seguin P, Allary J, Feuillet F, Lasocki S, Cook F, et al. Hydrocortisone and fludrocortisone for prevention of hospital-acquired pneumonia in patients with severe traumatic brain injury (Corti-TC): a double-blind, multicentre phase 3, randomised placebo-controlled trial. Lancet Respir Med. sept 2014;2(9):706-16.

4. Warren DK, Shukla SJ, Olsen MA, Kollef MH, Hollenbeak CS, Cox MJ, et al. Outcome and attributable cost of ventilator-associated pneumonia among intensive care unit patients in a suburban medical center. Crit Care Med. mai 2003;31(5):1312-7.

5. Stone PW, Braccia D, Larson E. Systematic review of economic analyses of health care-associated infections. Am J Infect Control. nov 2005;33(9):501-9.

6. Wyncoll D, Camporota L. Number needed to treat and cost-effectiveness in the prevention of ventilator-associated pneumonia. Crit Care Lond Engl. 7 juin 2012;16(3):430.

7. Melsen WG, Rovers MM, Koeman M, Bonten MJM. Estimating the attributable mortality of ventilator-associated pneumonia from randomized prevention studies. Crit Care Med. déc 2011;39(12):2736-42.

8. Nguile-Makao M, Zahar J-R, Français A, Tabah A, Garrouste-Orgeas M, Allaouchiche B, et al. Attributable mortality of ventilator-associated pneumonia: respective impact of main characteristics at ICU admission and VAP onset using conditional logistic regression and multi-state models. Intensive Care Med. mai 2010;36(5):781-9.

9. Escoffre J-M, Bouakaz A. Minireview: Biophysical Mechanisms of Cell Membrane Sonopermeabilization. Knowns and Unknowns. Langmuir ACS J Surf Colloids. 6 août 2019;35(31):10151-65.

10. Boissenot T, Bordat A, Fattal E, Tsapis N. Ultrasound-triggered drug delivery for cancer treatment using drug delivery systems: From theoretical considerations to practical applications. J Control Release Off J Control Release Soc. 10 2016;241:144-63.

11. Remérand F, Dellamonica J, Mao Z, Ferrari F, Bouhemad B, Jianxin Y, et al. Multiplane

ultrasound approach to quantify pleural effusion at the bedside. Intensive Care Med. avr 2010;36(4):656-64.

12. Quaia E. Microbubble ultrasound contrast agents: an update. Eur Radiol. août 2007;17(8):1995-2008.

13. Dayton PA, Ferrara KW. Targeted imaging using ultrasound. J Magn Reson Imaging JMRI. oct 2002;16(4):362-77.

14. Correas JM, Hélénon O, Pourcelot L, Moreau JF. Ultrasound contrast agents. Examples of blood pool agents. Acta Radiol Suppl. 1997;412:101-12.

15. Greis C. Ultrasound contrast agents as markers of vascularity and microcirculation. Clin Hemorheol Microcirc. 2009;43(1-2):1-9.

16. Kang S-T, Yeh C-K. Ultrasound microbubble contrast agents for diagnostic and therapeutic applications: current status and future design. Chang Gung Med J. avr 2012;35(2):125-39.

17. Morel DR, Schwieger I, Hohn L, Terrettaz J, Llull JB, Cornioley YA, et al. Human pharmacokinetics and safety evaluation of SonoVue, a new contrast agent for ultrasound imaging. Invest Radiol. janv 2000;35(1):80-5.

18. Gramiak R, Shah PM. Echocardiography of the aortic root. Invest Radiol. oct 1968;3(5):356-66.

19. Foster FS, Burns PN, Simpson DH, Wilson SR, Christopher DA, Goertz DE. Ultrasound for the visualization and quantification of tumor microcirculation. Cancer Metastasis Rev. 2000;19(1-2):131-8.

20. Kaul S. Myocardial contrast echocardiography: a 25-year retrospective. Circulation. 15 juill 2008;118(3):291-308.

21. Alzaraa A, Gravante G, Chung WY, Al-Leswas D, Morgan B, Dennison A, et al. Contrast-enhanced ultrasound in the preoperative, intraoperative and postoperative assessment of liver lesions. Hepatol Res Off J Jpn Soc Hepatol. août 2013;43(8):809-19.

22. Morgan KE, Allen JS, Dayton PA, Chomas JE, Klibaov AL, Ferrara KW. Experimental and theoretical evaluation of microbubble behavior: effect of transmitted phase and bubble size. IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control. 2000;47(6):1494-509.

23. Shi WT, Forsberg F. Ultrasonic characterization of the nonlinear properties of contrast microbubbles. Ultrasound Med Biol. janv 2000;26(1):93-104.

24. Ohl C-D, Wolfrum B. Detachment and sonoporation of adherent HeLa-cells by shock wave-induced cavitation. Biochim Biophys Acta. 5 déc 2003;1624(1-3):131-8.

25. Ohl C-D, Arora M, Ikink R, de Jong N, Versluis M, Delius M, et al. Sonoporation from jetting cavitation bubbles. Biophys J. 1 déc 2006;91(11):4285-95.

26. Kaddur K, Palanchon P, Tranquart F, Pichon C, Bouakaz A. [Sonopermeabilization: therapeutic alternative with ultrasound and microbubbles]. J Radiol. nov 2007;88(11 Pt 2):1777-86.

27. Escoffre JM, Piron J, Novell A, Bouakaz A. Doxorubicin delivery into tumor cells with ultrasound and microbubbles. Mol Pharm. 6 juin 2011;8(3):799-806.

28. Kinoshita M, McDannold N, Jolesz FA, Hynynen K. Noninvasive localized delivery of Herceptin to the mouse brain by MRI-guided focused ultrasound-induced blood-brain barrier disruption. Proc Natl Acad Sci U S A. 1 août 2006;103(31):11719-23.

29. Liu H-L, Hua M-Y, Chen P-Y, Chu P-C, Pan C-H, Yang H-W, et al. Blood-brain barrier disruption with focused ultrasound enhances delivery of chemotherapeutic drugs for glioblastoma treatment. Radiology. mai 2010;255(2):415-25.

30. McDannold N, Vykhodtseva N, Raymond S, Jolesz FA, Hynynen K. MRI-guided targeted blood-brain barrier disruption with focused ultrasound: histological findings in rabbits. Ultrasound Med Biol. nov 2005;31(11):1527-37.

31. Hynynen K, McDannold N, Vykhodtseva N, Jolesz FA. Noninvasive MR imaging-guided focal opening of the blood-brain barrier in rabbits. Radiology. sept 2001;220(3):640-6.

32. Hynynen K, McDannold N, Vykhodtseva N, Jolesz FA. Non-invasive opening of BBB by focused ultrasound. Acta Neurochir Suppl. 2003;86:555-8.

33. Liu Y, Yi S, Zhang J, Fang Z, Zhou F, Jia W, et al. Effect of microbubble-enhanced ultrasound on prostate permeability: a potential therapeutic method for prostate disease. Urology. avr 2013;81(4):921.e1-7.

34. Zhang Y, Ye C, Xu Y, Dong X, Li J, Liu R, et al. Ultrasound-mediated microbubble destruction increases renal interstitial capillary permeability in early diabetic nephropathy rats. Ultrasound Med Biol. juin 2014;40(6):1273-81.

35. Song J, Chappell JC, Qi M, VanGieson EJ, Kaul S, Price RJ. Influence of injection site, microvascular pressure and ultrasound variables on microbubble-mediated delivery of microspheres to muscle. J Am Coll Cardiol. 20 févr 2002;39(4):726-31.

36. Shang Y, Dong X, Han G, Li J, Cui D, Liu C, et al. The Roles of Tight Junctions and Claudin-1 in the Microbubble-Mediated Ultrasound-Induced Enhancement of Drug Concentrations in Rat Prostate. J Membr Biol. déc 2015;248(6):1167-73.

37. Dimcevski G, Kotopoulis S, Bjånes T, Hoem D, Schjøtt J, Gjertsen BT, et al. A human clinical trial using ultrasound and microbubbles to enhance gemcitabine treatment of

inoperable pancreatic cancer. J Control Release Off J Control Release Soc. 10 déc 2016;243:172-81.

38. Kooiman K, Vos HJ, Versluis M, de Jong N. Acoustic behavior of microbubbles and implications for drug delivery. Adv Drug Deliv Rev. juin 2014;72:28-48.

39. van Wamel A, Kooiman K, Harteveld M, Emmer M, ten Cate FJ, Versluis M, et al. Vibrating microbubbles poking individual cells: drug transfer into cells via sonoporation. J Control Release Off J Control Release Soc. 15 mai 2006;112(2):149-55.

40. Fan Z, Liu H, Mayer M, Deng CX. Spatiotemporally controlled single cell sonoporation. Proc Natl Acad Sci U S A. 9 oct 2012;109(41):16486-91.

41. Yang F, Gu N, Chen D, Xi X, Zhang D, Li Y, et al. Experimental study on cell self-sealing during sonoporation. J Control Release Off J Control Release Soc. 12 nov 2008;131(3):205-10.

42. Hu Y, Wan JMF, Yu ACH. Membrane perforation and recovery dynamics in microbubble-mediated sonoporation. Ultrasound Med Biol. déc 2013;39(12):2393-405.

43. Mehier-Humbert S, Bettinger T, Yan F, Guy RH. Plasma membrane poration induced by ultrasound exposure: implication for drug delivery. J Control Release Off J Control Release Soc. 5 mai 2005;104(1):213-22.

44. Kudo N, Okada K, Yamamoto K. Sonoporation by single-shot pulsed ultrasound with microbubbles adjacent to cells. Biophys J. 17 juin 2009;96(12):4866-76.

45. Husseini GA, Diaz de la Rosa MA, Richardson ES, Christensen DA, Pitt WG. The role of cavitation in acoustically activated drug delivery. J Control Release Off J Control Release Soc. 3 oct 2005;107(2):253-61.

46. Mehta D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. Physiol Rev. janv 2006;86(1):279-367.

47. Birukov KG. Cyclic stretch, reactive oxygen species, and vascular remodeling. Antioxid Redox Signal. juill 2009;11(7):1651-67.

48. Free Radical Effects on Membranes, Volume 61 - 1st Edition [Internet]. [cité 24 août 2018]. Disponible sur: https://www.elsevier.com/books/free-radical-effects-on-membranes/simon/978-0-12-373879-0

49. Holland CK, Apfel RE. An improved theory for the prediction of microcavitation thresholds. IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control. 1989;36(2):204-8.

50. Basta G, Venneri L, Lazzerini G, Pasanisi E, Pianelli M, Vesentini N, et al. In vitro modulation of intracellular oxidative stress of endothelial cells by diagnostic cardiac ultrasound. Cardiovasc Res. 1 avr 2003;58(1):156-61.

51. He N, Hu J, Liu H, Zhu T, Huang B, Wang X, et al. Enhancement of vancomycin activity against biofilms by using ultrasound-targeted microbubble destruction. Antimicrob Agents Chemother. nov 2011;55(11):5331-7.

52. Lin T, Cai X-Z, Shi M-M, Ying Z-M, Hu B, Zhou C-H, et al. In vitro and in vivo evaluation of vancomycin-loaded PMMA cement in combination with ultrasound and microbubbles-mediated ultrasound. BioMed Res Int. 2015;2015:309739.

53. Volpicelli G, Elbarbary M, Blaivas M, Lichtenstein DA, Mathis G, Kirkpatrick AW, et al. International evidence-based recommendations for point-of-care lung ultrasound. Intensive Care Med. avr 2012;38(4):577-91.

54. Via G, Lichtenstein D, Mojoli F, Rodi G, Neri L, Storti E, et al. Whole lung lavage: a unique model for ultrasound assessment of lung aeration changes. Intensive Care Med. juin 2010;36(6):999-1007.

55. Lesser TG, Schubert H, Bischoff S, Wolfram F. Lung flooding enables efficient lung sonography and tumour imaging in human ex vivo and porcine in vivo lung cancer model. Eur J Med Res. 10 juill 2013;18:23.

56. Müllhaupt D, Wenger S, Kircher P, Pfammatter N, Hatt J-M, Ohlerth S. Computed tomography of the thorax in rabbits: a prospective study in ten clinically healthy New Zealand White rabbits. Acta Vet Scand. déc 2017;59(1):72.

57. YAO P. Évaluation et compensation de la distorsion des ultrasons traversant la paroi thoracique dans différents modèles ex-vivo. Université de Tours, France; 2011.

58. Wolfram F, Boltze C, Schubert H, Bischoff S, Lesser TG. Effect of lung flooding and high-intensity focused ultrasound on lung tumours: an experimental study in an ex vivo human cancer model and simulated in vivo tumours in pigs. Eur J Med Res. 7 janv 2014;19:1.

59. Laffon M, Pittet JF, Modelska K, Matthay MA, Young DM. Interleukin-8 mediates injury from smoke inhalation to both the lung endothelial and the alveolar epithelial barriers in rabbits. Am J Respir Crit Care Med. nov 1999;160(5 Pt 1):1443-9.

60. Gerard A, Lozniewsky A, Merle-Melet M, Montfort C, Fauche A, Weber M. Diffusion tissulaire de l'amikacine en dose unique journalière. Données expérimentales. Médecine Mal Infect. 1 sept 1993;23:37-8.

61. Song J, Chappell JC, Qi M, VanGieson EJ, Kaul S, Price RJ. Influence of injection site, microvascular pressure and ultrasound variables on microbubble-mediated delivery of microspheres to muscle. J Am Coll Cardiol. 20 févr 2002;39(4):726-31.

62. Escoffre J-M, Zeghimi A, Novell A, Bouakaz A. In-vivo gene delivery by sonoporation: recent progress and prospects. Curr Gene Ther. févr 2013;13(1):2-14.

63. Escoffre JM, Kaddur K, Rols MP, Bouakaz A. In vitro gene transfer by electrosonoporation. Ultrasound Med Biol. oct 2010;36(10):1746-55.

64. Dong Y, Li J, Li P, Yu J. Ultrasound Microbubbles Enhance the Activity of Vancomycin Against Staphylococcus epidermidis Biofilms In Vivo. J Ultrasound Med Off J Am Inst Ultrasound Med. juin 2018;37(6):1379-87.

65. Sugiyama MG, Mintsopoulos V, Raheel H, Goldenberg NM, Batt JE, Brochard L, et al. Lung Ultrasound and Microbubbles Enhance Aminoglycoside Efficacy and Delivery to the Lung in Escherichia coli-induced Pneumonia and Acute Respiratory Distress Syndrome. Am J Respir Crit Care Med. 1 août 2018;198(3):404-8.

66. Meijering BDM, Juffermans LJM, van Wamel A, Henning RH, Zuhorn IS, Emmer M, et al. Ultrasound and microbubble-targeted delivery of macromolecules is regulated by induction of endocytosis and pore formation. Circ Res. 13 mars 2009;104(5):679-87.

67. Mansoori S, Moosavi SMS, Ketabchi F. The Interaction between Trolox and 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic Acid on Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction in the Isolated Rabbit Lung. Iran J Med Sci. mai 2017;42(3):284-91.

68. Ketabchi F, Mansoori S, Moosavi SMS. The role of anion exchanger on pulmonary vascular response to sustained alveolar hypoxia in the isolated perfused rabbit lung. Iran J Med Sci. mai 2015;40(3):256-63.

69. Takayama N, Ishiguro Y, Taniguchi N, Akai K, Sasanuma H, Yasuda Y, et al. The effect of ultrasound with acoustic radiation force on rabbit lung tissue: a preliminary study. J Med Ultrason 2001. oct 2016;43(4):481-5.

70. Lichtenstein D, Mézière G, Biderman P, Gepner A, Barré O. The comet-tail artifact. An ultrasound sign of alveolar-interstitial syndrome. Am J Respir Crit Care Med. nov 1997;156(5):1640-6.

Fabien ESPITALIER

Étude *in vivo* de l'impact des ultrasons et des microbulles sur la diffusion des antibiotiques dans le parenchyme pulmonaire condensé et dans le tissu musculaire chez le lapin.

Résumé

La combinaison des ultrasons et des microbulles de contraste (sonoporation), méthode innovante et non-invasive, permet une augmentation ciblée de la concentration des médicaments dans plusieurs organes. Augmenter la concentration d'antibiotiques dans le tissu pulmonaire permettrait d'améliorer le traitement des pneumopathies acquises sous ventilation (PAVM) sans augmentation de la toxicité systémique. Nos objectifs étaient de développer un modèle de poumon condensé chez le lapin ventilé mécaniquement, et d'évaluer l'impact de la sonoporation sur la diffusion pulmonaire de plusieurs antibiotiques. La sonoporation a permis une augmentation significative des médianes de concentration pulmonaire pour l'amikacine, mais pas pour la vancomycine. Ainsi la sonoporation pourrait permettre d'améliorer le traitement des PAVM avec certains antibiotiques. Des nouvelles perspectives en thérapeutique humaine s'ouvrent, cette approche semblant aisée à mettre en œuvre au lit du patient.

Mots-clés : poumon condensé, antibiotiques, microbulles, ultrasons, traitement médicamenteux

Résumé en anglais

The combination of ultrasound and microbubbles (USMB) is an emerging method for non-invasive and targeted enhancement of uptake of various drugs in several organs. A significant enhancement of antibiotics uptake due to USMB in lung tissue could increase the efficacy of the treatment of ventilation-acquired pneumonia (VAP) without any increase of systematic toxicity. This work aimed to develop a model of condensed right lung in rabbit under mechanical ventilation and to assess the impact of USMB on the diffusion in lung of several antibiotics. In our experiments, USMB allowed a significant increase in median lung amikacin concentration, but not for vancomycin. Thus, USMB could improve VAP treatment efficacy, but not for all the antibiotics. These results are opening new therapeutic fields against lung, especially since USMB seems easy to enforce at bed-side.

Keyword: condensed lung, antibiotics, microbubbles, ultrasound, drug therapy