



HAL
open science

Etude des conséquences neurophysiologiques de l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique par sonoporation

Antoine Presset, Lydie Nadal-Desbarats, Jean-Michel Escoffre

► To cite this version:

Antoine Presset, Lydie Nadal-Desbarats, Jean-Michel Escoffre. Etude des conséquences neurophysiologiques de l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique par sonoporation. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Tours (UT), Tours, FRA, 2022. Français. NNT: . tel-04852347

HAL Id: tel-04852347

<https://inserm.hal.science/tel-04852347v1>

Submitted on 20 Dec 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE n° 549 : « Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant »

UMR 1253, iBrain, Imagerie et Cerveau, Université de Tours, Inserm

THÈSE de Doctorat

présentée par

Antoine PRESSET

soutenue le : 05 octobre 2022

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

Discipline/ Spécialité : Neurobiologie

Etude des conséquences neurophysiologiques de l'ouverture de la barrière hémato- encéphalique par sonoporation

THÈSE co-dirigée par :

Dr. NADAL-DESBARATS Lydie
Dr. ESCOFFRE Jean-Michel

MCU, UMR 1253, Imagerie et Cerveau, Université de Tours, Inserm
CR, UMR 1253, Imagerie et Cerveau, Université de Tours, Inserm

RAPPORTEURS :

Pr. PAGE Guylène
Dr. BERTHO Gildas

PU, EA3808, NEUVACOD, Université de Poitiers
IR, UMR 8601, LCBPT, Université Paris Cité, CNRS

JURY :

Dr. BERTHO Gildas
Dr. ESCOFFRE Jean-Michel
Dr. LAFON Cyril
Dr. NADAL-DESBARATS Lydie
Pr. PAGE Guylène
Pr. VIAUD Marie-Claude

IR, UMR 8601, LCBPT, Université Paris Cité, CNRS
CR, UMR 1253, Imagerie et Cerveau, Université de Tours, Inserm
DR, UMR 1032, LabTAU, Université Claude Bernard, Lyon 1, Inserm
MCU, UMR 1253, Imagerie et Cerveau, Université de Tours, Inserm
PU, EA3808 NEUVACOD, Université de Poitiers
PU, EA7501 ERL CNRS 7001, Université de Tours

UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE n° 549 : « Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant »

UMR 1253, iBrain, Imagerie et Cerveau, Université de Tours, Inserm

THÈSE de Doctorat

présentée par

Antoine PRESSET

soutenue le : 05 octobre 2022

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

Discipline/ Spécialité : Neurobiologie

Etude des conséquences neurophysiologiques de l'ouverture de la barrière hémato- encéphalique par sonoporation

THÈSE co-dirigée par :

Dr. NADAL-DESBARATS Lydie
Dr. ESCOFFRE Jean-Michel

MCU, UMR 1253, Imagerie et Cerveau, Université de Tours, Inserm
CR, UMR 1253, Imagerie et Cerveau, Université de Tours, Inserm

RAPPORTEURS :

Pr. PAGE Guylène
Dr. BERTHO Gildas

PU, EA3808, NEUVACOD, Université de Poitiers
IR, UMR 8601, LCBPT, Université Paris Cité, CNRS

JURY :

Dr. BERTHO Gildas
Dr. ESCOFFRE Jean-Michel
Dr. LAFON Cyril
Dr. NADAL-DESBARATS Lydie
Pr. PAGE Guylène
Pr. VIAUD Marie-Claude

IR, UMR 8601, LCBPT, Université Paris Cité, CNRS
CR, UMR 1253, Imagerie et Cerveau, Université de Tours, Inserm
DR, UMR 1032, LabTAU, Université Claude Bernard, Lyon 1, Inserm
MCU, UMR 1253, Imagerie et Cerveau, Université de Tours, Inserm
PU, EA3808 NEUVACOD, Université de Poitiers
PU, EA7501 ERL CNRS 7001, Université de Tours

À ma famille passée, présente et future...

“Les deux mots les plus brefs et les plus anciens, oui et non, sont ceux qui exigent le plus de réflexions”

Pythagore (580 – 495 av. JC)

“La science est le capitaine, et la pratique, ce sont ses soldats.”

Leonardo da Vinci (1452 – 1519)

Remerciements



Je remercie tout d'abord les membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse :

La professeure des universités **Guylène Page**, responsable de l'équipe NEUVACOD EA3808 « Unité neurovasculaire et troubles cognitifs » à Poitiers, et le docteur **Gildas Bertho**, ingénieur de recherche au Laboratoire de Chimie et Biochimie pharmacologiques et toxicologiques (LCBPT) CNRS UMR 8601 à l'université Paris Cité, pour avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail,

La professeure des universités **Marie-Claude Viaud**, chercheuse à EA7501 ERL CNR7001 Groupe Innovation et Ciblage Cellulaire (GICC) à l'université de Tours, et le docteur **Cyril Lafon**, directeur de recherche au Laboratoire des applications Thérapeutiques des Ultrasons (LabTAU) à l'université de Lyon à Lyon 1, pour avoir accepté d'examiner mon travail.

La maître de conférences des universités **Lydie Nadal-Desbarats**, enseignante/chercheuse au laboratoire Imagerie et Cerveau, UMR1253 de l'université de Tours et **Jean-Michel Escoffre**, chargé de recherche Inserm dans le même laboratoire, d'être présents pour la soutenance et de me soutenir du simple fait de leur présence.



Je remercie l'**université de Tours**, le laboratoire **Imagerie et Cerveau**, la **ligue contre le Cancer** et la **plateforme scientifique ASB** pour leur confiance et pour m'avoir permis d'accomplir ce travail à travers leurs divers financements et la mise à disposition de leurs moyens techniques et humains.



Je remercie également **Ayache B.** et **Patrick E.** de m'avoir accueilli dans leur équipe et, de ce fait, avoir rendu possible ce travail de recherche transverse.

Je remercie **Antoine L.**, **Claire T.**, **Rose-Anne T.**, et **Sylviane M.** pour leur bienveillance, leur disponibilité et leur compétence qui m'ont permis d'aborder de manière sereine les différentes approches de ce travail de thèse. Je remercie tout particulièrement **Sylvie B.** sans laquelle les manips *in vivo* auraient duré une éternité, même si cela valait des petites piques bienveillantes par-ci par-là.

Je remercie tout particulièrement **Camille D.**, **Cécile M.**, **Coralie M.** et **Edward O.** pour votre soutien et votre assistance contre vents et marées durant ces longues années. Je remercie également tous les autres doctorants de l'équipe **Alexandra B-P.**, **Guillaume L.**, **Laurent A.**, **Marie R.**, **Sean T.**, **Tarik I.**, **Zahraa J.**

Je remercie tous mes stagiaires, **Anaïs M.**, **Hugo D.** et **Graig F.** qui m'ont souvent enlevé une aiguille du pied, et dont, j'espère que le passage au laboratoire leur aura apporté de bons souvenirs, mais aussi un bagage scientifique utile pour la suite. Je remercie également tous les stagiaires qui sont passés transitoirement dans l'équipe du laboratoire **Arthur P.**, **Camille B.**, **Jules B.**, **Julien O.**, **Najib S.**, **Sandrine K.**,

Simon S., **Théo D.**, **Vincent G.** pour leur bonne humeur, leurs conversations à midi et en dehors du laboratoire, souvent inintéressantes mais pourtant tellement utiles. Je ne remercie finalement pas **Najib S.** pour nous avoir fait perdre au Molky. Je remercie plus particulièrement **Nina D.** pour m'avoir supporté pendant toute sa période de stage, pour avoir relu la meilleure partie de ma thèse. Tu es comme ça (pouce) !

Je remercie chaleureusement **Marion L.**, **Nadine B.**, **Sandrine D-C.** et **Fabien B.** du département de biochimie de la faculté de Sciences et Techniques pour leur soutien, leur aide et leur bienveillance durant mon année en tant qu'ATER.

Je remercie également les meilleurs stagiaires du monde **Chloé B.** et **Mahé B.** pour m'avoir permis de découvrir Tours *by night*, d'avoir fait en sorte que mes premières années à Tours soient particulièrement agréables et d'avoir maté mes déprimés passagères à grand coups de pintes. Sans vous, la vie n'aurait pas été pareil.

Je remercie **Pierre F.** pour ces virées tardivo-festives que l'on a pu faire avec les autres loustics. Je te remercie également pour ces conversations instructives et également pour me comprendre à demi-mot ou sur un simple regard.

Je remercie **Stéphanie L.** pour toutes ces conversations engagées, fortes en débat, ou parfois toutes simples, parlant du beau ou du mauvais temps. Je te remercie pour toutes ces commandes passées, toutes ces questions répondues dans l'instant et tous ces mails illustrés d'images rigolotes.

Je remercie chaleureusement **Lydie N-D.** et **Jean-Michel E.**, mère et père de substitution professionnelle pour m'avoir fait confiance pour cette thèse, mais aussi pour m'avoir confié les enseignements, et d'avoir cru en moi. Je vous remercie d'être de très bons encadrants, toujours bienveillants, en ayant su transmettre vos connaissances, vos savoir-faire et vos savoir-être. Je vous remercie de m'avoir soutenu, guidé et assisté durant tout ce long travail de thèse. Je tiens à préciser que jusqu'à maintenant Lydie a obtenu le plus de points et restera donc mon encadrante préférée.

Je remercie également **Hanaa M.**, **Jean-Marc G.** et **Jean-Pierre R.** pour leur accueil, leur bienveillance, et leurs discussions intéressantes (à l'inverse des stagiaires).



Je remercie également mes parents **Anick** et **Serge** sans qui, ne l'oublions pas, tout ce travail n'aurait pas été possible. Je les remercie de m'avoir soutenu, conseillé, assisté et rassuré durant toutes ces années, de ma plus petite enfance jusqu'à mon âge adulte. Ce travail est le plus bel hommage à la phrase « *si j'avais dû baisser les bras, et bien ils tomberaient par terre* » qui techniquement ne veut rien dire, mais qui représente si bien le travail d'une thèse.

Je remercie mon frère et ma belle-sœur **Nicolas** et **Caroline** pour le soutien que vous m'avez apporté durant toutes ces années, ainsi que mon neveu **Baptiste** et ma nièce **Charlie** à qui je **dédie ce travail**.

Je remercie mon oncle et ma tante **Jean Michel** et **Catherine** qui, à travers mon séjour chez vous, au bord de votre piscine m'aura permis d'accumuler toutes les bonnes ondes du Sud et de mettre toutes les chances de mon côté pour obtenir le droit d'accomplir cette thèse.

Je remercie mes amis **Lola, Baptiste, Théo, Thomas** pour votre soutien et votre compréhension durant toutes ces années. Mon attention et l'entretien de nos relations ont été accaparés par ce travail spoliant, mais je vous jure qu'on en ressortira grandi.



Je remercie également tous **celles** et **ceux** qui, de près ou de loin, ont participé au bon déroulement (dans le sens technique et humain) de ma thèse et dont j'aurai oublié de mentionner leur nom. Vous avez mon **entière gratitude**.



Merci **Corentin A.** pour ton pessimisme maladif, ça me permet de me sentir moins mal. Mais je sais que tu travailles là-dessus. Merci pour tes compétences en Python. Merci pour m'avoir accompagné à la piscine et me permettre de tenir la promesse que j'avais faite en arrivant à Tours. Merci d'être très bon public. Merci pour ta gênance. Merci tout simplement d'être toi. Je pense très fortement que sans toi ma rédaction et ma fin de thèse n'auraient pas eu la saveur qu'elles ont eu (gênance niveau combien cette phrase ?). Je te remercie également d'avoir pris de ton précieux temps pour relire le chapitre le plus « qualitatif » de ma thèse.

Aline B., sans toi, mon expérience dans le laboratoire et à Tours aurait clairement été différente. Je te suis mille fois reconnaissant de m'avoir intégré quasiment instantanément, d'avoir fait en sorte qu'on ait des activités extra-scolaires, de m'avoir fait découvrir la ville et différents lieux de boissons (n'ayons pas peur des mots). Merci pour ces expéditions en fin de soirée pour découvrir les lieux historiques de Tours. On se marre bien tous les deux. Merci pour notre complicité. Merci pour ta simplicité (dans le bon sens du terme hein). Merci d'être toi.



Florine, je n'aurai pas les mots pour te faire comprendre à quel point tu es incroyable et formidable. Malgré la petite distance qui nous séparait au début de ma thèse à Tours, rien n'a bougé, au contraire, tout s'est renforcé. Tu ne sais pas quel point je te suis infiniment reconnaissant pour m'avoir soutenu dans les premières et les dernières étapes de ma thèse. Tu ne sais pas à quel point nos discussions à propos de mes doutes lors de la ma thèse, de tes multiples relectures de ce manuscrit (malgré le fait qu'il reste encore des fautes, merci !) et de ton soutien sans faille m'ont été bénéfiques et ont de l'importance pour moi. J'espère que jamais nos chemins se sépareront. Je t'aime.



Table des matières

Liste des figures.....	I
Liste des tableaux.....	IX
Abréviations.....	XI
I. État de l'art	1
Chapitre 1. La barrière hémato-encéphalique	1
1. Découverte de la barrière-hémato-encéphalique.....	1
2. Description structurelle et fonctionnelle de la barrière hémato-encéphalique	2
a) La barrière physique hémato-encéphalique : description et régulation.....	3
(1) L'endothélium	4
(2) La lame basale.....	5
(3) Les astrocytes.....	5
(4) Les péricytes	6
(5) Les jonctions intercellulaires	6
(6) Liaisons intracellulaires des protéines jonctionnelles.....	8
(7) Régulation intracellulaire de la perméabilité des barrières endothéliales.....	9
b) La barrière moléculaire hémato-encéphalique : description et régulation	10
(1) Voie de passage pour les molécules biologiques.....	10
(2) Délivrance intracérébrale de molécules thérapeutiques	14
Chapitre 2. La sonoporation	19
1. Introduction	19
2. Article	21
3. Synthèse.....	42
Chapitre 3. Explorations de l'innocuité de la perméabilisation de la BHE.....	47
1. Approches macroscopiques.....	47
a) Imagerie par émission de positon et par résonance magnétique nucléaire	47
(1) Principe.....	47
(2) Résultats.....	51
b) Tests comportementaux.....	54
(1) Principe.....	54

(2) Résultats.....	55
2. Approches histologiques	56
(1) Principe.....	56
(2) Résultats.....	59
3. Approches moléculaires	61
a) Transcriptomique	61
(1) Principe.....	61
(2) Résultats.....	64
b) Métabolomique.....	68
(1) Principe.....	68
(2) Résultats.....	76
4. Synthèse.....	76
Chapitre 4. Problématique.....	81
II. Matériel et méthodes.....	85
Chapitre 1. Matériel et dispositifs ultrasonores	85
1. Dispositif ultrasonore	85
2. Banc de mesures ultrasonores.....	85
3. Caractérisation du transducteur ultrasonore	85
a) Sensibilité du transducteur	85
b) Profils en deux dimensions du faisceau généré par le transducteur.....	86
Chapitre 2. Expérimentation animale	89
1. Hébergement des animaux	89
2. Procédures communes.....	89
a) Anesthésie	89
b) Placement stéréotaxique.....	89
c) Chirurgie préparatoire	89
d) Ouverture acoustique de la BHE.....	90
e) Procédure post-opératoire	90
f) Sacrifice et perfusion des animaux.....	90
3. Contrôle de la perméabilisation de la BHE.....	90
4. Détermination des coordonnées et de la pression acoustique optimales pour la perméabilisation de la BHE dans le striatum	91

5.	Evaluation de la cinétique de fermeture de la BHE.....	91
Chapitre 3. Transcriptomique.....		95
1.	Extraction des ARN totaux	95
2.	Séquençage des ARN messagers	95
3.	Traitement des données.....	95
Chapitre 4. Métabolomique		101
1.	Prélèvements des matrices biologiques	101
	a) Striatum	101
	b) Liquide cérebrospinal	101
	c) Sérum.....	101
	d) Urine	101
2.	Traitements pré-analytiques	102
	a) Striatum	102
	b) Liquide cérebrospinal	103
	c) Sérum.....	103
	d) Urine	104
3.	Contrôle qualité	104
4.	Acquisition des données.....	104
	a) Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse	104
	b) Dosage des dérivés du tryptophane.....	105
	c) Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire.....	106
5.	Prétraitement des données.....	106
	a) Données de spectroscopie par RMN	106
	b) Données de HPLC-MS	106
6.	Traitements statistiques des données.....	107
	a) Calcul des coefficients de variation.....	107
	b) Fusion des données provenant des méthodes analytiques.....	107
	c) Normalisation	107
	d) Analyses multivariées	108
	e) Analyses univariées.....	108

f)	Analyses des voies métaboliques impactées	108
Chapitre 5.	Histologie	113
1.	Cryostats.....	113
2.	Coloration des tissus	113
a)	Coloration au crésyl violet/éosine	113
3.	Immunomarquage des tissus	113
a)	Protocole commun.....	113
4.	Acquisitions microscopiques.....	114
a)	Microscopie à lumière transmise	114
b)	Microscopie à fluorescence.....	114
5.	Traitements des données	115
a)	Fusion des canaux.....	115
b)	Reconstruction d'images par mosaïque.....	115
III.	Résultats et discussion	119
Chapitre 1.	Caractérisations acoustiques du transducteur	119
1.	Résultats	119
2.	Discussion.....	120
Chapitre 2.	Perméabilisation de la BHE par sonoporation.....	123
1.	Résultats	123
a)	Détermination des coordonnées et de la pression acoustique optimales pour l'ouverture de la BHE du noyau caudé putamen.....	123
b)	Cinétique de fermeture de la barrière hémato-encéphalique	125
2.	Discussion.....	125
a)	Influence des paramètres acoustiques	125
b)	Influence des microbulles	126
c)	Influence des paramètres physiologiques.....	127
d)	Influence de l'anesthésie	128
e)	Suivi de la perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique.....	129
Chapitre 3.	Analyses anatomopathologiques de l'ouverture de la barrière hématoencéphalique par sonoporation.....	133
1.	Coloration histologique au crésyl violet et éosine.....	133

a)	Rappels neuroanatomiques du cortex et du striatum	133
b)	Analyses des coupes sagittales des cerveaux contrôles.....	136
c)	Analyses des coupes sagittales des cerveaux 3 heures après la sonoporation	139
d)	Analyses des coupes sagittales des cerveaux 48 heures après la sonoporation	142
e)	Analyses des coupes sagittales des cerveaux 1 semaine après la sonoporation.....	142
f)	Discussion	146
2.	Immunomarquage	148
a)	Résultats.....	148
(1)	Mise en évidence des systèmes de neurotransmission GABAergique, glutamatergique et dopaminergique	148
(2)	Mise en évidence de l'unité neurovasculaire.....	152
(3)	Mise en évidence des protéines du stress cellulaire.....	156
b)	Discussion	159
(1)	Description des anticorps	159
(2)	Ajustement du protocole.....	162
(3)	Synthèse	163
Chapitre 4.	Exploration du transcriptome après la perméabilisation de la BHE par sonoporation	167
1.	Résultats	167
a)	Comparaison entre les groupes 3 h post-sonoporation vs contrôles	170
b)	Comparaison entre les groupes 1 semaine post-sonoporation vs contrôles	172
c)	Comparaison entre les groupes 3 h post-sonoporation vs 48 h post-sonoporation	174
2.	Discussion.....	175
a)	Perturbation de l'homéostasie cellulaire et de la réponse immunitaire.....	175
b)	Couplage entre le métabolisme énergétique et le choc hypoxique	177
c)	Perturbation de la transduction du signal et des voies de signalisation	178
d)	Avantages et limites de l'étude	179
Chapitre 5.	Caractérisation de la réponse métabolique après l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique par sonoporation.....	183
1.	Publication.....	185
2.	Résultats complémentaires : exploration métabolique des striata controlatéraux.....	202
3.	Synthèse.....	203

a) Neurotransmissions du striatum	204
b) Métabolismes des composants de l'unité neurovasculaire.....	206
(1) Neurones	206
(2) Astrocytes	207
(a) Réponse au stress oxydatif et hypoxique.....	207
(b) Régulation du flux sanguin en réponse à la demande métabolique	208
(3) Cellules endothéliales	209
c) Interprétation.....	210
IV. Conclusions et perspectives	215
V. Annexes	223
Références bibliographiques.....	291

Liste des figures

Figure 1 : Autoradiographie d'une souris ayant reçu une injection intraveineuse d'histamine radiomarquée.	1
Figure 2 : Image super-résolue de la vascularisation corticale dans le cerveau de rat par échographie ultrarapide.	3
Figure 3 : Représentation schématique des composants structuraux et moléculaires de la BHE.	4
Figure 4 : Représentation schématique des jonctions intercellulaires endothéliales.	7
Figure 5 : Composition de la jonction intercellulaire entre deux cellules endothéliales.	8
Figure 6 : Ensemble des systèmes de transport de molécules à la surface des cellules endothéliales de la BHE.	11
Figure 7 : Représentation schématique du principe de déstabilisation des barrières biologiques pour la délivrance de médicaments.	19
Figure 8 : Principe de la tomographie par émission de position.	48
Figure 9 : Codage de l'espace en trois dimensions pour la formation d'une imagerie par résonance magnétique nucléaire.	49
Figure 10 : Chronogramme d'une séquence de type écho de spin.	50
Figure 11 : Chronogramme d'une séquence de type écho de gradient.	50
Figure 12 : Evaluation de la neuroinflammation par imagerie TEP du [¹⁸ F] DPA-714 et du métabolisme du glucose par imagerie TEP du [¹⁸ F] FDG.	52
Figure 13 : Imagerie par résonance magnétique nucléaire contrastée T2* et <i>Fluid Attenuated Inversion Recovery</i> (FLAIR) montrant la zone de l'ouverture de la BHE.	53
Figure 14 : Evaluation du thigmotactisme des souris pendant le test de l' <i>open-field</i>	55
Figure 15 : Evaluation histologique par coloration à l'hématoxyline et à l'éosine après la perméabilisation de la BHE de l'hippocampe chez la souris.	59
Figure 16 : Marquages immunofluorescents dirigés contre la protéine CD163 et la protéine Iba1.	60
Figure 17 : Principe de séquençage du dispositif Illumina.	63
Figure 18 : Expression différentielle des gènes codant pour les cytokines et les récepteurs pro-inflammatoires entre le striatum gauche et le striatum controlatéral après sonoporation.	67
Figure 19 : Etapes standards (<i>workflow</i>) de traitements des échantillons métaboliques recueillis lors d'une étude métabolomique.	69
Figure 20 : Schéma de principe du dispositif de chromatographie en phase liquide.	70
Figure 21 : Schéma de principe d'un spectromètre de masse.	70
Figure 22 : Schéma d'organisation d'un spectromètre par résonance magnétique nucléaire.	71

Figure 23 : Séquence d'excitation NOESY.....	71
Figure 24 : Exemple de spectre RMN obtenu après traitement des données FID à partir du sérum de rat.	73
Figure 25 : Données multidimensionnelles issues de la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie.....	74
Figure 26 : Courbe de sensibilité du transducteur 1 MHz focalisé à 49 mm.	119
Figure 27 : Carte de distribution de la pression acoustique selon deux dimensions au niveau du point focal.	120
Figure 28 : Perméabilisation de la barrière hématoencéphalique par sonoporation.....	124
Figure 29 : Cinétique de perméabilisation et de fermeture de la barrière hématoencéphalique évaluée par l'extravasation de bleu d'Evans au niveau du striatum droit.....	124
Figure 30 : Organisation laminaire du cortex cérébral.	133
Figure 31 : Coupes sagittales et coronales de cerveaux de rat.	135
Figure 32 : Analyse histologique par coloration au crésyl violet et à l'éosine du cortex de rats contrôles n'ayant pas subi la sonoporation.....	136
Figure 33 : Analyse histologique par coloration au crésyl violet et à l'éosine du striatum de rats contrôles n'ayant pas subi la sonoporation.....	137
Figure 34 : Analyse histologique par coloration au crésyl violet et à l'éosine du cortex de rats 3 heures après la sonoporation du striatum.....	138
Figure 35 : Analyse histologique par coloration au crésyl violet et à l'éosine du striatum de rats 3 heures après la sonoporation.	138
Figure 36 : Agrandissement d'une vacuolisation dans le striatum sonopéré d'un rat 3 heures après la procédure.	139
Figure 37 : Structures vacuolaires identifiées dans la partie antéro-ventrale du striatum.....	141
Figure 38 : Agrandissement d'une zone montrant la présence de cellules sanguines dans le striatum sonopéré d'un rat 3 heures après la procédure.....	141
Figure 39 : Analyse histologique par coloration au crésyl violet et à l'éosine du cortex de rats 48 heures après la sonoporation du striatum.....	143
Figure 40 : Coloration de Nissl et éosine du striatum de rats 48 heures après la sonoporation.	143
Figure 41 : Analyse histologique par coloration au crésyl violet et à l'éosine du cortex de rats 1 semaine après la sonoporation du striatum.	145
Figure 42 : Analyse histologique par coloration au crésyl violet et à l'éosine du striatum de rats 1 semaine après la sonoporation.	145
Figure 43 : Immunomarquage dirigé contre la glutamate déshydrogénase (GAD) sur des coupes de cerveaux de rats.	149

Figure 44 : Immunomarquage dirigé contre la glutamine synthétase (GS) sur des coupes de cerveaux de rats	150
Figure 45 : Immunomarquage dirigé contre les transporteurs 1 et 2 du GABA et le transporteur des acides aminés excitateurs sur des coupes de cerveaux de rats	151
Figure 46 : Immunomarquage dirigé contre la tyrosine hydroxylase (TH) dans le striatum de rats contrôles	152
Figure 47 : Double immunomarquage dirigé contre la protéine S100 β et SMI71 dans le cortex, le striatum et l'hippocampe de rats contrôles.	153
Figure 48 : Double immunomarquage dirigé contre la protéine gliale fibrillaire acide (GFAP) et la claudine 5.	154
Figure 49 : Triple immunomarquage dirigé contre la protéine gliale fibrillaire acide et contre les protéines SMI71 et S100 β	155
Figure 50 : Double immunomarquage dirigé contre la protéine gliale fibrillaire acide et contre les protéines claudine 5 et ZO-1.....	156
Figure 51 : Double immunomarquage dirigé contre la protéine <i>Hypoxia Inducible Factor 1α</i> (HIF-1 α)..	157
Figure 52 : Immunomarquage dirigé contre la protéine CD163.	158
Figure 53 : <i>Heatmap</i> de classification hiérarchique des 1 000 gènes les plus variants.	168
Figure 54 : Analyses en composantes principales des 1 000 gènes les plus variants..	168
Figure 55 : Récapitulatif des résultats de l'analyse différentielle.....	169
Figure 56 : Détails des gènes dérégulés à 3 h, 48 h, et 1 semaine après la sonoporation en fonction de la <i>q-value</i> et du logarithme base 2 de l'accroissement entre deux groupes.	169
Figure 57 : Réseau relationnel entre les gènes dérégulés entre la condition contrôle et 3 h après la sonoporation.	171
Figure 58 : Réseau relationnel entre les gènes dérégulés 1 semaine après la sonoporation par rapport à la condition contrôle.....	173
Figure 59 : Réseau relationnel entre les gènes dérégulés 1 semaine après la sonoporation par rapport à la condition contrôle.....	174
Figure 60 : <i>Workflow</i> utilisé pour l'approche métabolomique afin de déterminer des effets biologiques de l'ouverture de la barrière hématoencéphalique par sonoporation.....	183
Figure 61 : Analyse en composantes principales des métabolites identifiés dans les striata controlatéraux après sonoporation.....	202
Figure 62 : Voies dérégulées établies à partir des intensités des métabolites significativement différents entre les groupes expérimentaux.	203
Figure 63 : Métabolisation après la recapture des neurotransmetteurs excitateurs (glutamate) et inhibiteurs (GABA).....	206

Figure 64 : Coopération métabolique entre les astrocytes et les neurones.....	207
Figure 65 : Principales voies dans le métabolisme de l'arginine au sein d'une cellules endothéliales.	210

Liste des tableaux

Tableau 1 : Molécules régulatrices de la perméabilité de la BHE. Modifié d'après (Abbott, 2002).	10
Tableau 2 : Principaux transporteurs endothéliaux basaux et apicaux.....	12
Tableau 3 : Transporteurs à cassette de liaison à l'ATP à la surface des cellules endothéliales au niveau de la BHE.....	13
Tableau 4 : Transporteurs à récepteurs présents à la surface des cellules endothéliales de la BHE.	14
Tableau 5 : Carte d'identité de la substance chimique idéale pour le passage de la BHE. D'après Pardridge, 2007.	16
Tableau 6 : Radiomarqueurs utilisés en clinique et en pré-clinique pour le diagnostic par tomographie par émission de positon. D'après (Vodovar <i>et al.</i> , 2019).	47
Tableau 7 : Tests comportementaux utilisés chez les rongeurs pour évaluer les fonctions motrices et cognitives.	54
Tableau 8 : Modalités de prélèvement des échantillons histologique.	57
Tableau 9 : Exemples de colorations simples et spécifiques utilisées en histologie et en anatomopathologie.	58
Tableau 10 : Comparaison des deux principales méthodes d'étude du transcriptome. D'après (Govindarajan <i>et al.</i> , 2012; Kukurba et Montgomery, 2015).	62
Tableau 11 : Avantages et inconvénients des plateformes analytiques les plus communes en métabolomique.....	68
Tableau 12 : Méthodes statistiques typiques pour l'étude des données métabolomiques.....	75
Tableau 13 : Gradient des phases mobiles A et B de la chromatographie liquide sur colonne C18 pour l'analyse métabolique.....	105
Tableau 14 : Gradient des phases mobiles A et B de la chromatographie liquide sur colonne HILIC pour l'analyse métabolique.....	105
Tableau 15 : Gradient des phases mobiles A et B de la chromatographie liquide sur colonne C18 pour le dosage des dérivés du tryptophane.....	106
Tableau 16 : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés pour l'immunomarquage.	114
Tableau 17 : Récapitulatif des paramètres acoustiques pour la perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique par sonoporation.	126
Tableau 18 : Récapitulatif des informations concernant l'injection des microbulles et l'évaluation de la perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique.....	127
Tableau 19 : Récapitulatif des métriques et des valeurs de significativité des analyses discriminantes de la régression des moindres carrés partiels (PLS-DA) calculés à partir des métabolites retrouvés dans les striata controlatéraux.....	202

Abréviations

#

¹¹ C	Carbone 11
¹⁸ F	Fluor 18
1D	1 Dimension
¹ H	Proton
2D	2 Dimensions
3D	3 Dimensions

A

ABC	ATP Binding Cassette
ACP	Analyse en Composantes Principales
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
ADP	Adénosine DiPhosphate
AF-6	AFadin-6
Akt	Protéine kinase B
AMP	Adénosine MonoPhosphate
ANOVA	ANalysis Of VAriance
AP	Antéro-Postérieur
ApoER2	Récepteur aux Apolipoprotéines
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	ARN messenger
ASCT	Alanine/Serine/Cysteine-preferring Transporter
ASICS	Automatic Statistical Identification in Complex Spectra
ATP	Adénosine Triphosphate

B

BCRP	Breast Cancer Resistance Protein
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
BHT	Barrière Hémato-Tumorale
BL	Burst Length
BOLD	Blood-Oxygen-Level Dependent
BSA	Bovine Serum Albumin

C

CAT	Cationic Amino-Acid Transporter
CCD	Coupled Charge Device
CDF	Cumulative Distribution Function
COVID	COrona VIRUS Diseases
CV	Coefficient de Variation

D

D2O	Deutérium
Da	Dalton

DAG	DiAcylGlycérol
DAMP	Danger Associated Molecular Pattern
DAPI	4',6-DiAmidino-2-PhénylIndole
dB	Décibel
DC	Duty Cycle
DHAP	DiHydroxyAcétone Phosphate
DPA	N,N-diethyl-2-[4-(2-fluoroethoxy)phenyl]-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidine-3-acetamide

E

EAAT	Excitatory Amino-Acid Transporter
EEG	Electroencephalographie
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EN4	Ligand of Myc Receptor 4
ESI	ElectroSpray Ionisation
ET-1	EndoThéline

F

f	Fréquence
FC	Fold Change
FDG	FluoroDésoxyGlucose
FDR	False Discovery Rate
FID	Free Induction Decay
FLAIR	FLuid Attenuated Inversion Recovery
FPKM	Fragment Per Kilobase Million

G

G3P	Glycéraldéhyde-3-Phosphate
GABA	Acide Gamma-AminoButyrique
GC-MS	Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry
GDNF	Glial-cell-line-Derived Neurotrophic Factor
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GK	Guanylate Kinase
GLUT1	Glucose transporter 1
GPD1	Glycérol-3-Phosphate Dehydrogénase
GRB2	Growth factor Receptor-Bound protein
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
GTP	Guanosine TriPhosphate

H

H&E	Hématoxyline & Eosine
HES	Hematoxyline Eosine Safran

HILIC	Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography	mVpp	milliVolt pics à pics
HMDB	Human Metabolome DataBase	N	
HPLC-MS	High Performance Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry	NAD+	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
		NADH	Hydrure de Nicotinamide Adénine Dinucléotide
I		NFκB	Nuclear Factor-kappa B
ICAM	InterCellular Adhesion Molecule	NGF	Nerve Growth Factor
IM	Index Mécanique	NGS	Séquençage de Nouvelle Génération
IP3	Inositol Triphosphate	NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
IR	Insulin Receptor	NP	NanoParticule
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique	O	
J		OCT	Optimal Cutting Temperature Compound
JAM	Junctional Adhesion Molecule	ORA	Over-Representation Analysis
K		ORL	Oto-Rhino-Laryngologie
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes	P	
L		P	Profondeur
L	Latéralité	PAF	Platelet-Activating Factor
LASER	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation	pb	Paire de bases
LAT	Large Amino-Acid Transporter	PBS	Phosphate Buffer Saline
LB	Line Broadening	PCA	Principal Component Analysis
LCS	Liquide cérébroSpinal	PCR	Réaction de Polymérisation en Chaîne
LfR	Récepteur à la Lactoferrine	PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
LPA	Acide LysoPhosphatidique	PDK4	Pyruvate Déshydrogénase Kinase
LRP	Low-density-lipoprotein-receptor Related <i>Protein</i>	PDZ	Post-synaptic density protein 95, Drosophila disc large tumor suppressor, and Zona occludens 1 domain
M		PECAM	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
MAGUK	Membrane-Associated GUanylate Kinase	PFA	ParaFormAldéhyde
MARVEL	Myelin And lymphocyte Related proteins for Vesicle trafficking and membrane Link	PI3K	PhosphoInositide 3-Kinase
		PKC	PhosphoKinase Calcium dépendante
MB	MicroBulles	PLS-DA	Partial Least Square Discriminant Analysis
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1	PNH	Primate Non-Humain
MCT	MonoCarboxylate Transporter	PNP	Peak Negative Pressure
MDR	Multiple Drug Resistance	ppm	Partie par million
MEC	Matrice ExtraCellulaire	pQ2	Significativité de la permutation
MI	Mechanical Index	pR2Y	Significativité de la permutation
MIP	Macrophage Inflammatory Protein	PRF	Pulse Repetition Frequency
MRP	Multidrug Resistant Protein	Q	
MS	Mass Spectrometry	Q2	Score de permutationn
MTfR	Récepteur à la Mélanotransferrine	QC	Quality Control
mTORC2	mammalian Target Of Rapamycin Receptor C2		

qRT-PCR	RétroTranscription suivie d'une Réaction de Polymérisation en Chaîne quantitative	TLR	Toll Like Receptor
		TNF α	Tumor Necrosis Factor alpha
		TR	Temps de Relaxation
		TSP	Triméthylsilylproprionate
		TSPO	Translocator Protein
		TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling
R		U	
RAGE	Receptor for Advanced Glycation Endproducts	UA	Unité Arbitraire
RCPG	Récepteurs Couplés aux Protéines G	UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
RF	RadioFréquence	UTP	Uracil triphosphate
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire	V	
RNAseq	Séquence de l'ARN	VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
ROC	Receiver Operating Characteristic	VIP	Variable Importance in Projection
RP	Reverse Phase	X	
RPKM	Reads Per Kilo base per Million mapped reads	XCMS	Various forms (X) of Chromatography Mass Spectrometry
RTK	Recepteur à Tyrosine Kinase	Z	
RT-PCR	RétroTranscription suivie d'une Réaction de Polymérisation en Chaîne	ZO	Zonula Occludens
RX	Rayons X		
S			
SDS	Sodium DodécylSulfate		
SGK1	Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase		
SGLT1	Sodium GLucose coTransporter		
SH3	SRC Homology 3 Domain		
SLC	SoLute Carrier		
SNAT	Sodium-coupled Neutral Amino acid		
SNC	Système Nerveux Central		
SNP	Single Nucleotide Polymorphism		
SN $_{pc}$	Substance Noire <i>pars compacta</i>		
SN $_{pr}$	Substance Noire <i>pars reticulata</i>		
SOD2	SuperOxide Dismutase 2		
SOLiD	Sequencing by Oligo Ligation Detection		
SSEP	Potentiel SomatoSensoriel Évoqué		
SWI	Susceptibility Weighted Imaging		
T			
T1	Temps de relaxation longitudinal		
T2	Temps de relaxation transverse		
T2*	Temps de relaxation transverse pondéré par susceptibilité		
TBE	Tampon Tris, acide borique, EDTA		
TCI	Triple resonance Inverse Cryoprobe		
TE	Temps d'Echo		
TEP	Tomographie par Emission de Position		
TfR	Transferrine Receptor		
TGF α	Tumor Growth Factor alpha		

Partie I

État de l'art

Chapitre 1

La barrière hémato-encéphalique



I. État de l'art	1
Chapitre 1. La barrière hémato-encéphalique	1
1. Découverte de la barrière-hémato-encéphalique.....	1
2. Description structurelle et fonctionnelle de la barrière hémato-encéphalique	2
a) La barrière physique hémato-encéphalique : description et régulation.....	3
(1) L'endothélium	4
(2) La lame basale.....	5
(3) Les astrocytes.....	5
(4) Les péricytes	6
(5) Les jonctions intercellulaires	6
(6) Liaisons intracellulaires des protéines jonctionnelles.....	8
(7) Régulation intracellulaire de la perméabilité des barrières endothéliales	9
b) La barrière moléculaire hémato-encéphalique : description et régulation	10
(1) Voie de passage pour les molécules biologiques.....	10
(2) Délivrance intracérébrale de molécules thérapeutiques	14

I. État de l'art

Chapitre 1. La barrière hémato-encéphalique

1. Découverte de la barrière-hémato-encéphalique

Les premières expériences sur la barrière hémato-encéphalique (BHE) ont été réalisées entre la fin du 19^{ème} siècle et le début du 20^{ème} siècle (Ribatti *et al.*, 2006). En 1885, Paul Ehrlich a injecté un colorant (aniline) dans la circulation sanguine d'un animal vivant. En disséquant l'animal, il s'est aperçu que tous les organes étaient colorés excepté le cerveau et la moelle épinière (Figure 1). Il émit alors deux hypothèses : soit le tissu nerveux ne fixe pas le colorant ; soit il existe une barrière qui empêche ce colorant de passer vers le cerveau et la moelle épinière. L'histoire raconte que Paul Ehrlich s'est arrêté sur la première hypothèse, affirmant que le manque d'affinité de ce colorant pour le tissu cérébral expliquait l'absence de coloration.

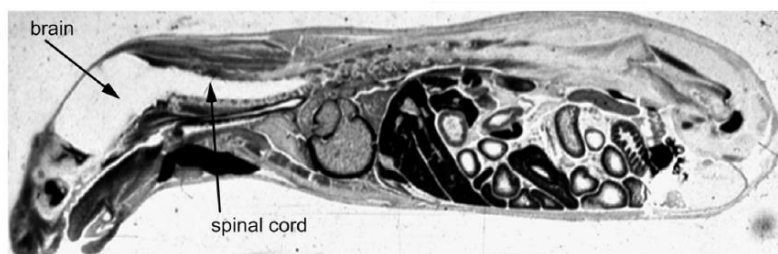


Figure 1 : Autoradiographie d'une souris ayant reçu une injection intraveineuse d'histamine radiomarquée. L'histamine est une molécule de 100 Da qui est sous le seuil des 400 Da imposé par la barrière hématoencéphalique (BHE) pour pouvoir la traverser. Tous les tissus sont radiomarqués à l'exception de l'encéphale et de la moelle épinière. Cette expérience réfute le dogme dictant la capacité des petites molécules à traverser la BHE. La BHE filtre plus de 98% des molécules de faible poids moléculaire (< 400 Da). D'après (Pardridge, 2005).

Après les travaux de Paul Ehrlich, Max Lewandowsky émit l'hypothèse en 1900 de l'existence d'une barrière semi-perméable entre le système nerveux central et le reste du corps (Marcinowski, 2020). Cette hypothèse fait suite aux observations décrites lors de l'absence de symptômes neurologiques, après l'injection d'acide cholique ou de ferrocyanure de sodium dans la circulation sanguine. Il décrit alors cette barrière comme semi-perméable, capable d'empêcher le passage de certains composés présents dans la circulation sanguine vers le cerveau. Il introduit pour la première fois le terme « barrière hémato-encéphalique » sans pour autant avoir une preuve formelle de son existence.

Ensuite, Edwin Goldman, chirurgien et étudiant de Paul Ehrlich a mené, entre 1909 et 1913, des expériences complémentaires. Il injecta directement du bleu de trypan (un colorant vital) dans le système ventriculaire cérébral de l'animal. Il observa que, non seulement le tissu cérébral était coloré mais qu'aucune fuite de ce colorant n'était observée dans les organes périphériques. Il reproduisit également la première expérience de Paul Ehrlich et montra que tous les tissus périphériques étaient colorés par le bleu de trypan, hormis le cerveau et la moelle épinière. Il infirma donc l'hypothèse de Paul Ehrlich et en conclut qu'il existait bel et bien une barrière entre le cerveau et le reste de l'organisme. Ses travaux ont également permis d'observer que les plexus choroïdes (présents dans les ventricules

cérébraux) étaient de surcroît colorés. Il émit alors l'hypothèse que les plexus choroïdes pouvaient être une voie d'entrée des composés chimiques vers le système nerveux central (SNC).

Les travaux sur la BHE reprennent tardivement à cause des guerres successives de 1914 – 1918 et de 1939 – 1945. Ainsi, de nombreuses études entre 1955 et 1959 sur la barrière ont permis de mettre en évidence les rôles essentiels des cellules endothéliales vasculaires, de la membrane basale et des pieds astrocytaires dans l'établissement de la BHE. Ce n'est qu'en 1967, grâce au développement des techniques de microscopie électronique, que Morris Karnovsky et Thomas Reese ont prouvé la présence d'une barrière structurelle au niveau de l'endothélium des capillaires cérébraux chez la souris (Reese and Karnovsky, 1967). En effet, ils ont observé que la peroxydase de Raifort venait se nicher entre les cellules endothéliales, sans pour autant franchir une ceinture formée par l'accolement des membranes cellulaires. Plus tard, des études s'attarderont sur ces ceintures et décriront des complexes protéiques, appelés jonctions serrées. Ils ont ainsi apporté la preuve irréfutable de l'existence d'une barrière spécialisée entre le SNC et le reste de l'organisme. La présence et la structure de cette barrière a donc été décrite, mais son utilité restait encore à préciser.

2. Description structurelle et fonctionnelle de la barrière hémato-encéphalique

Au cours de l'évolution, l'augmentation de la complexité morphologique et fonctionnelle du vivant a été corrélée avec le développement du système nerveux (Johanson, 1989). C'est devant cette complexité que l'approvisionnement métabolique (*i.e.*, nutriments et dioxygène), la protection (vis-à-vis des xénobiotiques, virus et bactéries), et le nettoyage du tissu cérébral (dioxyde de carbone, ammoniac, *etc.*), ont subis des transformations fonctionnelles pour s'adapter à cette évolution (Dunton *et al.*, 2021). Ainsi, la sélection naturelle a conduit à l'apparition de la BHE (Bundgaard and Abbott, 2008). Cette barrière chez les vertébrés comporte plusieurs types et fonctions cellulaires. Elle met en place un milieu privilégié et isolé, protégeant la neurotransmission de tous les éléments perturbateurs endogènes ou exogènes. En effet, la synthèse du potentiel d'action neuronal résulte de mouvements ioniques (sodium et potassium) à travers la membrane des neurones et des axones. Ainsi, les concentrations en ions sodium (Na^+) et potassium (K^+) sont finement régulées dans l'environnement cérébral et sont isolées de la variation de leur concentration dans le compartiment vasculaire (Liu *et al.*, 2012; Chen et Lui, 2022; Grider *et al.*, 2022).

Confrontée aux besoins massifs de nutriments et d'oxygène, la vascularisation du SNC s'est développée, menant à la formation d'un réseau dense et profond de vaisseaux sanguins au sein du tissu cérébral (Figure 2). Les extrémités terminales de ce réseau vasculaire comprennent les artérioles et les veinules (Gardner, 2010; Adams *et al.*, 2015). Ces vaisseaux cérébraux sont formés de plusieurs couches distinctes. Les plus externes sont des couches de tissus conjonctifs fibreux et élastiques fixant et liant les vaisseaux à leur environnement, et leur confèrent une propriété élastique. Puis une couche de cellules musculaires lisses permet les réponses vasomotrices. Néanmoins, la couche musculaire des veinules n'est pas aussi développée que celle des artérioles. Quant aux couches les plus internes, elles sont composées de l'extérieur vers l'intérieur, d'une autre couche de tissu conjonctif élastique et d'un endothélium. Cet endothélium est composé de cellules endothéliales vasculaires (Ait-Oufella *et al.*,

2008). Les capillaires sanguins, qu'ils soient artériels ou veineux, se différencient des artérioles et des veinules par la diminution du diamètre de leur lumière et par la perte des cellules contractiles.

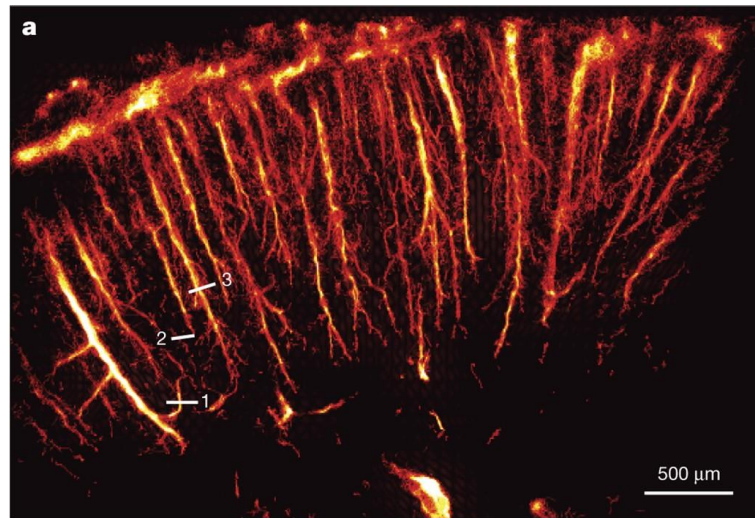


Figure 2 : Image super-résolue de la vascularisation corticale dans le cerveau de rat par échographie ultrarapide. D'après (Errico *et al.*, 2015). L'image montre les vaisseaux sanguins qui plongent dans le cortex. Cependant le dense réseau capillaire n'est pas mis en évidence grâce à cette technique d'imagerie.

Les cellules de l'endothélium des capillaires sanguins cérébraux peuvent arborer différentes conformations intercellulaires suivant leur perméabilité. Les capillaires ayant des cellules endothéliales non jointives sont de type discontinu, et sont les plus perméables. Ils sont principalement retrouvés dans le compartiment périphérique. À l'inverse, les vaisseaux dont leurs cellules endothéliales sont jointives, sont de type continu, et sont quasiment imperméables. Ils sont caractéristiques des vaisseaux sanguins cérébraux. Cette continuité entre les cellules endothéliales constituant la paroi des capillaires cérébraux découle de la présence de complexes protéiques empêchant la majorité des échanges entre le compartiment cérébral et liquidien. Ces complexes mettent en jeu les jonctions d'adhérences ainsi que les jonctions serrées (Bazzoni and Dejana, 2004).

Ces adaptations morphologiques ont provoqué la mise en place d'une régulation fine des échanges moléculaires (*via* les transporteurs moléculaires, membranaires et ioniques) en réponse à la forte demande métabolique du tissu cérébral. Dans le SNC, les neurones communiquent entre eux en utilisant une combinaison de signaux chimiques et électriques. Ainsi, une régulation locale précise du micro-environnement ionique et moléculaire autour des synapses et des axones est fondamentale pour une communication neuronale fiable. Chez les mammifères, les cellules endothéliales vasculaires cérébrales participent à la formation de la BHE. Cette barrière, du fait de ses particularités morphologiques et moléculaires, peut être décomposée en deux éléments constitutifs : une barrière physique et une barrière moléculaire.

a) La barrière physique hémato-encéphalique : description et régulation

Les composants essentiels de la BHE incluent les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, reliées entre elles par des jonctions serrées (Figure 3). De même, une épaisse membrane basale vient

renforcer l'imperméabilité de la BHE. De plus, les astrocytes et les péricytes sont importants pour l'établissement de la BHE. Tous ces composants constituent la partie physique de la BHE.

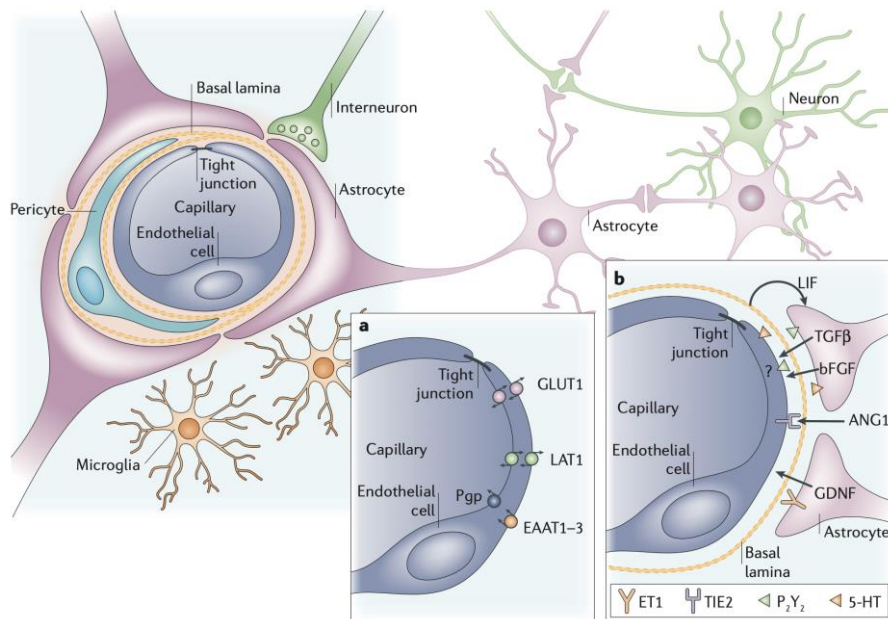


Figure 3 : Représentation schématique des composants structuraux et moléculaires de la BHE. L'ensemble de ces composants reflète la présence des deux barrières : physique et moléculaire. D'après (Abbott, 2002).

(1) L'endothélium

L'**endothélium** est un épithélium pavimenteux simple constituant la couche interne des vaisseaux sanguins (Ait-Oufella *et al.*, 2008). Les cellules endothéliales, constitutives de l'endothélium, sont plates et polarisées. La face basale est fixée sur une lame basale constituée de collagène. Ces cellules sont reliées avec la lame basale par des jonctions d'adhérence (hémidesmosomes, intégrines). La face apicale est en contact avec la lumière du vaisseau et par conséquent avec le sang. De ce fait, l'endothélium est soumis à des contraintes mécaniques associées à la pression artérielle pulsatile et au flux sanguin. Deux types de forces hydrodynamiques sont générées : l'étirement cyclique et les contraintes de cisaillement. Les variations de ces contraintes physiques sont captées par des mécanotransducteurs à la surface des cellules endothéliales. Ils comprennent des protéines d'adhésion, des récepteurs et des canaux ioniques. D'un point de vue mécanique, les protéines d'adhésion (intégrine, cadhérine, *etc.*) vont transmettre *via* le cytosquelette, les forces mécaniques aux cellules adjacentes (Cucullo *et al.*, 2011). Au niveau intracellulaire, les mécanotransducteurs vont engendrer une cascade de signalisation qui va induire une adaptation du cytosquelette ainsi qu'une modulation de l'expression génique (Davies, 1995; Abe and Berk, 2014). Les cellules endothéliales sécrètent un certain nombre de facteurs de croissance, notamment le *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF).

Au sein du tissu cérébral, les cellules endothéliales sont reliées entre elles par des jonctions serrées, rendant le passage paracellulaire de molécules et/ou de cellules quasi impossible. Les hématies sont incapables de la traverser. En revanche, sous l'action de signaux chimiotactiques et d'effecteurs protéolytiques, les leucocytes peuvent passer par diapédèse entre les cellules endothéliales (Glezer *et al.*, 2007; Engelhardt, 2008). De plus, cette structure étanche impose aux cellules de mettre en place un

système de transport passif et/ou actif, pour permettre les échanges entre le système nerveux central et le système périphérique (Takakura *et al.*, 1991).

(2) La lame basale

La **lame basale** est constituée de trois feuillets successifs et d'épaisseur variable (Xu *et al.*, 2018). Le premier est la *lamina lucida* essentiellement constitué de glycosaminoglycane et de laminines. Le deuxième feuillet est une couche collagénique (de type V) appelé *lamina densa*. Ce feuillet est complété d'héparane sulfate et de glycoprotéines (fibronectine, perlécan). Enfin, le dernier feuillet est la *lamina fibro-reticularis* qui permet l'ancrage au tissu conjonctif sous-jacent à partir de fibrille de collagène de type VII. Les cellules endothéliales et les péricytes sont entourés par une membrane basale locale qui forme une matrice extracellulaire (MEC) périvasculaire. De la même manière, les pieds astrocytaires s'accrochent à la face externe de la MEC périvasculaire formant une MEC spécifique du parenchyme cérébral (Abbott *et al.*, 2010).

(3) Les astrocytes

Les **astrocytes** sont des cellules gliales qui constituent la population majoritaire dans le SNC. Avec les cellules endothéliales, ils constituent un composant clé de la BHE (Keaney and Campbell, 2015). Les astrocytes peuvent être de type fibrillaire ou protoplasmique (Haim and Rowitch, 2017). Les premiers seront principalement retrouvés dans la substance blanche alors que les seconds seront localisés dans la substance grise. L'expression de la protéine GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) sera plus importante dans un astrocyte fibrillaire que dans un astrocyte protoplasmique. Ces cellules gliales possèdent des filaments intermédiaires du cytosquelette appelés gliofilaments. Ces filaments sont formés par la protéine fibrillaire gliale acide (*i.e.*, GFAP), caractéristiques des astrocytes. En raison de leur implication dans les processus inflammatoires, l'immunomarquage de la GFAP donne une indication sur l'état d'activation des astrocytes. Ils ont également un rôle de soutien métabolique pour les autres populations cellulaires cérébrales. En effet, les astrocytes possèdent de nombreux grains de glycogène disséminés dans leur cytoplasme, leur permettant *via* leurs pieds astrocytaires de fournir aux cellules adjacentes les nutriments nécessaires à leur fonctionnement. Ces pieds recouvrent près de 98% de la surface microvasculaire cérébrale.

La classification fonctionnelle distingue deux types d'astrocytes selon leurs fonctionnalités et la cible des pieds astrocytaires (Figley and Stroman, 2011). Le premier type correspond à des astrocytes qui seront impliqués dans le rôle barrière (*e.g.*, BHE ou barrière hémato-méningée). À l'inverse, les astrocytes de type 2 auront principalement un rôle de soutien métabolique et trophique vis-à-vis des neurones et des oligodendrocytes. Ces derniers peuvent sécréter des facteurs de croissance (de type *Nerve Growth Factor* – NGF ou *Glial Cell-line Derived Neurotrophic Factor* – GDNF) promouvant la neurogénèse, la survie neuronale, la plasticité synaptique et la régénération post-lésionnelle des fibres neuronales. De plus, ils veillent au maintien des concentrations ioniques à un niveau correct pour la neurotransmission. Ils émettent également des prolongements au niveau de la synapse afin de nettoyer l'espace intersynaptique de toutes les molécules neuroactives, de manière à les recycler. Les astrocytes participent également à la réponse immunitaire, par la synthèse de cytokines pro- et/ou anti-

inflammatoires ou par la présentation des antigènes aux lymphocytes T périphériques (Verkhatsky and Nedergaard, 2018).

Ces cellules sont également capables d'établir une communication bidirectionnelle avec les neurones, nommée gliotransmission (Savtchouk and Volterra, 2018). En effet, en réponse à la transmission synaptique, les astrocytes sont capables de détecter l'activité neuronale et d'y répondre par une augmentation intracellulaire de la concentration en calcium. Cet afflux ionique induit la libération de substances neuroactives. Les astrocytes sont aussi capables de former des réseaux astrocytaires permettant l'intercommunication à travers des jonctions communicantes de type « *Gap junction* ». Ces jonctions Gap sont des protéines de communication intercellulaire composées de connexines 43 formant des connexons. Ces jonctions communicantes permettent le transfert intercellulaire des ions (*e.g.*, ions K^+ , Ca^{2+} , Na^+), de messagers secondaires (*e.g.*, calcium, inositol triphosphate, AMPc) et de métabolites énergétiques (*e.g.*, glucose, lactate). Les principales fonctions des réseaux astrocytaires sont de diffuser les ions potassium libérés dans le milieu extracellulaire au cours de la propagation du potentiel d'action, de fournir les ressources énergétiques aux neurones, et de faciliter la propagation des signaux calciques qui sont essentiels pour induire la libération des gliotransmetteurs.

(4) Les péricytes

Les **péricytes** sont des cellules périvasculaires qui encerclent les parois vasculaires (Rucker *et al.*, 2000). La vascularisation du SNC a un nombre de péricytes significativement supérieur à la vascularisation périphérique. Les péricytes jouent un rôle clé dans le maintien de l'intégrité de la BHE à travers la signalisation opérée par les facteurs de croissance de type PDGF et TGF (*Transforming Growth Factor*) (Armulik *et al.*, 2010; Bell *et al.*, 2010; Daneman *et al.*, 2010). De plus, ils sont impliqués dans la biosynthèse des protéines de la matrice extracellulaire et dans la modulation du flux sanguin cérébral (Keaney and Campbell, 2015). En effet, le glutamate issu de la neurotransmission favorise la libération des messagers comme la prostaglandine E_2 et le monoxyde d'azote (NO), qui participent à la vasodilatation des capillaires par la relaxation des péricytes (Hall *et al.*, 2014). Ce mécanisme a pour but d'augmenter le débit sanguin cérébral en réponse aux besoins énergétiques neuronaux (Attwell *et al.*, 2010).

(5) Les jonctions intercellulaires

Les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins cérébraux sont reliées entre elles par des **jonctions d'adhérence** et par des **jonctions serrées** (Figure 4). Ces jonctions confèrent à la BHE une forte sélectivité vis-à-vis des molécules (Wallez and Huber, 2008).

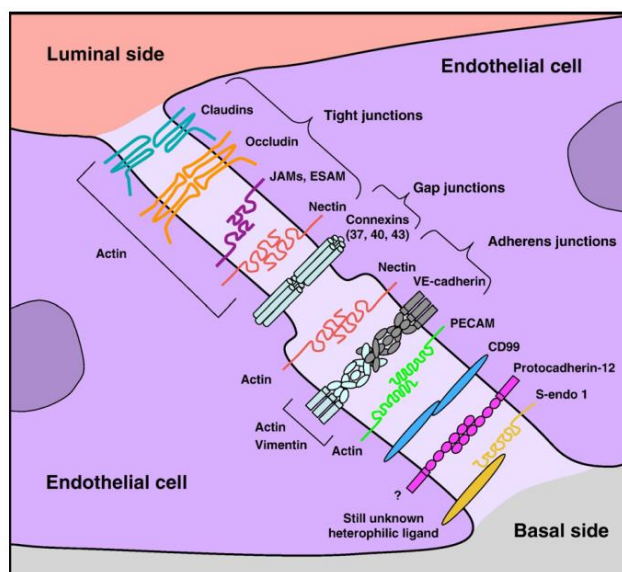


Figure 4 : Représentation schématique des jonctions intercellulaires endothéliales. Ces structures intercellulaires sont composées des jonctions d'adhérence, des jonctions Gap et des jonctions serrées. Elles empêchent le passage de tous composés chimiques ou cellules sanguines de passer à travers les barrières biologiques. D'après (Wallez and Huber, 2008).

Les **jonctions d'adhérence** sont responsables de l'adhérence intercellulaire et correspondent aux protéines transmembranaires appelées cadhérines (VE-cadhérines), ainsi qu'aux protéines membranaires appelées PECAM « *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule* », aux nectines et aux desmosomes (desmocolline, desmogléine, *etc.*). Les desmosomes ont la particularité de pouvoir former une *zonula adherens* (ceinture d'adhérence qui scelle l'extrémité apicale) ou une *macula adherens* (zone ponctuelle de fusion des membranes adjacentes). Ils participent à l'intégrité de la barrière en reliant mécaniquement le cytosquelette (filaments intermédiaires) des cellules endothéliales. Les jonctions d'adhérence sont primordiales pour la formation des jonctions serrées. Ces jonctions sont constituées de trois types de protéines transmembranaires : les claudines, les occludines et les *junctional adhesion molecules* (JAMs).

Les **claudines** sont également des protéines à 4 domaines transmembranaires (Berndt *et al.*, 2019). Elles sont structurellement similaires à l'occludine. Elles présentent des capacités hétérodimériques et/ou homodimériques d'adhésion de leur domaine extracellulaire. Elles constituent la colonne vertébrale des jonctions serrées et conditionnent les propriétés de la BHE. Elles contiennent des domaines de liaisons PDZ dans leur partie C-terminale, qui interagissent avec des protéines échafaudages.

Les **occludines** sont des protéines à 4 domaines transmembranaires (Liu *et al.*, 2012), qui permettent d'acquérir la fonction barrière. Elles forment des dimères homophiliques entre deux cellules adjacentes. Les domaines extracellulaires des protéines forment deux boucles, dont les N- et C- terminaux se trouvent dans la cellule. La liaison homophile des occludines est permise par les motifs *Myelin And lymphocyte Related proteins for VEsicle trafficking and membrane Link* (MARVEL), par la partie C-terminale, et aussi par la seconde boucle extracellulaire (Blasig *et al.*, 2006; Yaffe *et al.*, 2012). Ces domaines sont sensibles aux changements des conditions oxydatives du milieu environnant (Walter *et al.*, 2009; Lochhead *et al.*, 2010; Bellmann *et al.*, 2014). La partie N-terminale

est principalement impliquée dans la régulation de la fonction d'adhérence et au maintien de l'intégrité des jonction serrées. La partie C-terminale est susceptible d'être phosphorylée par des protéines kinases pour réguler la perméabilité de la BHE. Cette partie peut également se lier aux domaines guanylate kinase (GK) des protéines échafaudages (Wegmann *et al.*, 2004).

Les **JAMs** sont des protéines transmembranaires de type immunoglobuline qui participent à l'établissement et à la stabilité des jonctions serrées (Bazzoni *et al.*, 2000). Elles peuvent opérer une liaison homodimérique ou hétérodimérique. La partie C-terminale contient de multiples sites de phosphorylation qui se terminent par un motif PDZ permettant l'interaction avec une protéine ZO (*Zonula Occludens*) (Ebnet *et al.*, 2003; Van Itallie and Anderson, 2018). Ce motif PDZ est impliqué dans la signalisation cellulaire, notamment au niveau des récepteurs membranaires et des protéines jonctionnelles (Cho *et al.*, 1992).

(6) Liaisons intracellulaires des protéines jonctionnelles

Les protéines d'échafaudage assurent l'intégrité structurelle et la cohésion physique entre deux cellules adjacentes (Figure 5). Les parties intracellulaires de ces protéines (i.e., claudine, occludine, cadhérine et JAM) sont couplées au cytosquelette directement via les caténines, et indirectement grâce aux protéines d'échafaudages Zonula Occludens-1 (ZO-1), ZO-2 et ZO-3, mais également grâce à la cinguline (Bazzoni *et al.*, 2000). Ces dernières vont à leur tour interagir avec d'autres intermédiaires protéiques pour se lier aux protéines du cytosquelette.

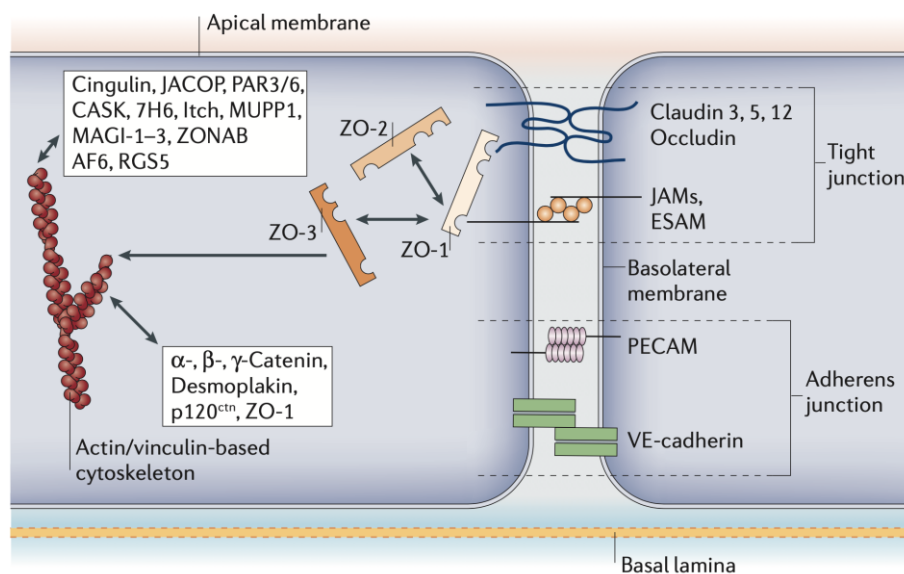


Figure 5 : Composition de la jonction intercellulaire entre deux cellules endothéliales. D'après (Abbott *et al.*, 2010).

Les **protéines ZO** appartiennent à la famille des guanylate kinases (*Membrane Associated GUanylate Kinase* – MAGUK) et sont constituées de trois domaines PDZ, d'un domaine SH3 et d'un domaine guanylyl-kinase. Le rôle majeur de ces protéines est de connecter les protéines des jonctions serrées avec les protéines du cytosquelette. Elles permettent également l'interaction entre les trois protéines formant les jonctions serrées.

La **cinguline** est une protéine cytoplasmique composée de deux parties globulaires. Elle joue le rôle d'adaptateur entre (i) les différentes isoformes de la protéine ZO ; entre (ii) les protéines JAM et l'afadine (AF-6) ; et (iii) avec la myosine. Elle transmet également aux cellules adjacentes les forces mécaniques issues du cytosquelette d'actine et de myosine.

(7) Régulation intracellulaire de la perméabilité des barrières endothéliales

Les études sur les protéines de jonction intercellulaire des tissus endothéliaux ont mis en évidence leur rôle dans la modulation des interactions entre les protéines, dans le trafic intracellulaire et dans les mécanismes de *turn-over* protéique (Rahimi, 2017). En effet, Yamamoto *et al.*, ont montré que la phosphorylation par la Rho kinase d'un résidu tyrosine de la partie C-terminale de la claudine induisait une diminution de la résistance transendothéliale (Yamamoto *et al.*, 2008). Ces résultats suggèrent que la signalisation induite par la Rho kinase joue un rôle important dans la modulation de la perméabilité des jonctions serrées au niveau de la BHE. Les activités et la localisation intracellulaire de l'occludine sont modulées par la phosphorylation de sa partie C-terminale (Liu *et al.*, 2012; Lochhead *et al.*, 2020). Il a également été montré qu'elle avait la capacité d'interagir avec un grand nombre de kinases et de phosphatases. Ainsi, la phosphorylation de la tyrosine et la déphosphorylation de la sérine et de la thréonine de la partie C-terminale de l'occludine interfèrent sur son interaction avec les protéines ZO, induisant la déstabilisation des barrières endothéliales. De plus, la phosphorylation des occludines entraînent une relocalisation de ces dernières au niveau basolatéral des cellules endothéliales. Ceci montre l'importance d'examiner la localisation des protéines de jonctions, en plus de leur expression. Enfin, la protéolyse des parties N- et C-terminales intracellulaires des occludines conduit à une perte de l'intégrité des barrières endothéliales.

L'activation des voies de signalisation par des signaux extracellulaires engendrent des altérations fonctionnelles des occludines. En effet, le *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), la monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), l'acide lysophosphatidique (LPA), et l'histamine conduisent par l'intermédiaire de leur récepteurs respectifs, à la phosphorylation des résidus aminoacides sérine et thréonine présents sur les parties N- et C- terminales des protéines jonctionnelles. Ces phosphorylations ont été corrélées avec une augmentation de la perméabilité des barrières endothéliales. Les effecteurs secondaires de ces cascades de signalisation sont les protéines kinases de type C, C α et les GTPases de la famille des RhoA (*Transforming protein Ras homolog family member A*) (Hashimoto and Campbell, 2020). Les protéines kinase C (PKC) sont des sérine/thréonine kinases qui sont activées par un grand nombre de mécanismes, incluant les récepteurs à tyrosine kinase (RTK) et les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) exprimés à la surface de la BHE (Black and Black, 2013). D'une manière générale, la PKC est dépendante du diacylglycérol (DAG), du calcium, et de la phosphatidylsérine. Cependant, certaines PKC ne nécessitent pas de calcium pour s'activer, c'est le cas notamment de la PKC δ (Black and Black, 2013). L'activation de la PKC est directement associée à l'assemblage des jonctions serrées (Luissint *et al.*, 2012). En effet, l'inhibition de la PKC par la calphostine C empêche la réorganisation des protéines ZO-1 conduisant ainsi à une diminution de la résistance transendothéliale (González-Mariscal *et al.*, 2008). De plus, la signalisation calcique joue

également un rôle majeur dans la perméabilité de la BHE, notamment lors de la modulation de la concentration calcique (Juffermans *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2010).

De plus, un large panel de facteurs de croissance, de cytokines, de médicaments et d'hormones régule les activités des jonctions serrées et donc la perméabilité de la BHE (Tableau 1) (Harhaj and Antonetti, 2004). Par exemple, les glucocorticoïdes, la prolactine et les acides gras insaturés réduisent la perméabilité de la BHE en augmentant l'expression des occludines. À l'inverse les cytokines (*Tumor Necrosis Factor α* – TNF α , interleukine 1 α – IL1 α , TGF α) et les facteurs de croissance (PDGF) provoquent la déstabilisation des jonctions serrées, augmentant ainsi la perméabilité de la BHE (Abbott, 2002).

Tableau 1 : Molécules régulatrices de la perméabilité de la BHE. Modifié d'après (Abbott, 2002).

Classes	Molécules
Molécules neuroactives	Substance P, glutamate
Molécules vasoactives	Bradykinine, Endothelin-1 (ET-1), thrombine
Dérivés du tryptophane	Acide quinoléique, sérotonine
Nucléotides puriques et pyrimidiques	ATP, UTP, ADP, AMP
Dérivés de l'acide arachidonique	Prostaglandines, leucotriènes
Cytokines/chimiokines	IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, Tumeur Necrosis Factor- α (TNF α), histamine, Platelet Activating Factor (PAF), MIP-1, MIP-2, C3a-desArg, PDGF
Gaz	Oxyde nitrique, radicaux libres de l'oxygène et/ou de l'azote

Les cellules endothéliales, les péricytes, les astrocytes, les neurones, et la matrice extracellulaire constituent une **unité neurovasculaire**. Cet ensemble coopératif régule par l'intermédiaire de signaux intra- et extracellulaire, la perméabilité microvasculaire de la BHE ainsi que le flux sanguin cérébral (Anderson and Nedergaard, 2003; Attwell *et al.*, 2010). Ainsi l'augmentation de l'activité neuronale induira une augmentation locale du flux sanguin cérébral *via* la régulation du diamètre des vaisseaux sanguins. Ce flux sanguin accru comblera les besoins en nutriments (glucose et O₂) nécessaires au fonctionnement des neurones.

Cependant, cette barrière physique hautement sélective ne peut à elle seule réguler l'homéostasie cérébrale. En effet, des mécanismes de transport permettent le passage des éléments nutritifs entre le compartiment sanguin et le parenchyme cérébral, alors que d'autres mécanismes empêchent le passage d'éléments néfastes.

b) La barrière moléculaire hémato-encéphalique : description et régulation

(1) Voie de passage pour les molécules biologiques

La seule présence des jonctions serrées entre les cellules endothéliales empêche le passage des molécules solubles du compartiment sanguin vers le parenchyme cérébral (Pardridge, 2005). Cependant, les molécules hydrophobes apolaires d'un poids moléculaire inférieur à 400 Da peuvent librement passer à travers la membrane plasmique des cellules endothéliales (diffusion passive des molécules hydrophobes). Pour les autres molécules, des systèmes de transport sont présents à la surface des cellules endothéliales de la BHE (Abbott *et al.*, 2010; Barar *et al.*, 2016).

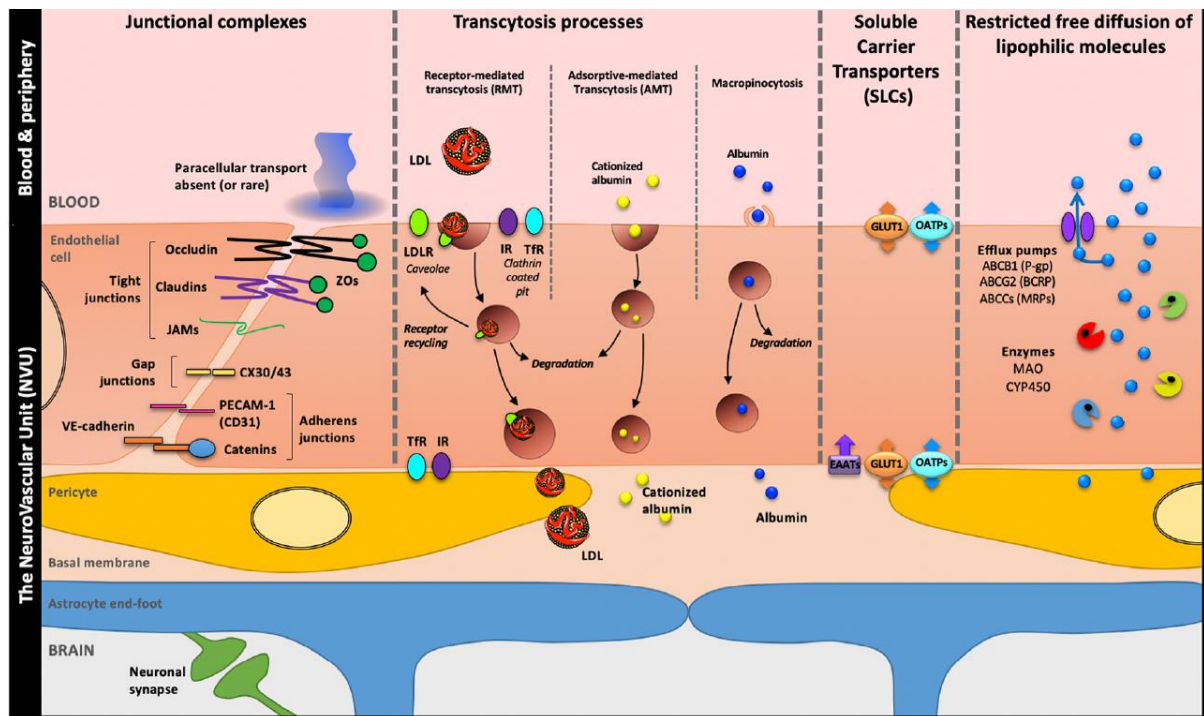


Figure 6 : Ensemble des systèmes de transport de molécules à la surface des cellules endothéliales de la BHE. D'après (Gosselet *et al.*, 2021).

L'endothélium possède à sa surface apicale un grand nombre de **transporteurs actifs** (Figure 6). Ces transporteurs permettent le transport contre leur gradient de concentration des molécules comme les lipides non polaires, les glucides simples et complexes, les acides aminés, les nucléosides, les peptides et les ions organiques (Tableau 2). Les **transporteurs de solutés** (*Solute Carriers* – SLC en anglais) sont impliqués dans le transport par diffusion facilitée de la plupart des composés nutritifs polaires, comme le glucose (GLUT1) et les acides aminés (LAT1). Ils peuvent être unidirectionnel ou bidirectionnel. La direction du transport est déterminée par le gradient de concentration du substrat ou est imposé par l'échange dans le sens ou contre le gradient d'une autre molécule (symport/antiport) et par le transport grâce à un gradient ionique. La surface de l'endothélium est donc riche de ces SLC et une polarité va se mettre en place entre les pôles basaux et apicaux des cellules endothéliales. En effet, certains de ces transporteurs SLC sont exprimés préférentiellement sur la membrane luminale alors que d'autres vont être exprimés sur la membrane basale. Enfin, les transporteurs peuvent être exprimés de chaque côté de la cellule endothéliale.

Tableau 2 : Principaux transporteurs endothéliaux basaux et apicaux.

Transporteurs	Abréviations	Localisations sur les cellules endothéliales	Orientations	Molécules endogènes transportées
Glucose (facilité, bidirectionnel)	GLUT1	Basal et apical	Du sang vers le cerveau	Glucose
Transporteur sodium dépendant du glucose	SGLT1	Basal	Du cerveau vers l'endothélium	Glucose
Acide L aminé cations dépendant	CAT1/CAT3	Apical	Du sang vers l'endothélium	L-Lysine, L-Arginine, L-Histidine
Transporteur des grands acides aminés neutres (facilité, bidirectionnel)	LAT1/LAT2	Basal et apical	Du sang vers le cerveau	L-Asparagine, L-Glutamate, L-Histidine, L-Isoleucine, L-Leucine, L-Méthionine, L-Phénylalanine, L-Thréonine, L-Tryptophane, L-Tyrosine, L-Valine, L-Arginine, L-Lysine, L-Ornithine
Transporteur des grands acides aminés neutres (sodium dépendant)	LAT2	Basal	Du cerveau vers l'endothélium	L-Alanine, L-Glycine, L-Histidine, L-Isoleucine, L-Leucine, L-Méthionine, L-Phénylalanine, L-Thréonine, L-Tryptophane, L-Tyrosine, L-Valine
Transporteur des petits acides aminés neutres (sodium dépendant)	SNAT2/SNAT3/SNAT5	Basal	Du cerveau vers l'endothélium	L-Alanine, L-Asparagine, L-Proline, L-Sérine, L-Glycine
Transporteur de l'Alanine/Sérine/Cystéine/Thréonine (sodium/chlore dépendant)	ASCT1/ASCT2	Basal	Du cerveau vers l'endothélium	L-Alanine, L-Cystéine, L-Glycine, L-Isoleucine, L-Leucine, L-Méthionine, L-Sérine, L-Thréonine, L-Valine
Transporteur des acides aminés acides excitateurs (sodium dépendant)	EAAT1/EAAT2/EAAT3	Basal	Du cerveau vers l'endothélium	Acides aminés anioniques Glumatate, Aspartate
Transporteur des acides monocarboxyliques	MCT1	Basal et apical	Du sang vers le cerveau	Corps cétoniques
Transporteur des acides monocarboxyliques	MCT2	Basal	Du cerveau vers l'endothélium	Corps cétoniques

Les **transporteurs à cassette de liaison à l'ATP** (*ATP Binding Cassette – ABC*) sont des transporteurs actifs qui sont impliqués dans l'efflux d'un grand nombre de composés organiques et de molécules thérapeutiques (Tableau 3). En effet, ces pompes actives rejettent toutes les substances qui seraient susceptibles de passer à travers la BHE vers le compartiment sanguin. Cette fonctionnalité est importante pour détoxifier le tissu cérébral des molécules xénobiotiques et des neurotoxiques. Ces transporteurs sont classés en sous-familles. Au niveau de la BHE, le transporteur ABC le plus important (de par sa fonction) est la **glycoprotéine P (Pgp)**, qui est aussi connue sous le nom de **protéine de résistance multiple aux médicaments** (MDR1). Il existe aussi les **protéines associées à la multirésistance aux médicaments** (MRP), comme la *Breast Cancer Resistance Protein* (BCRP).

Tableau 3 : Transporteurs à cassette de liaison à l'ATP à la surface des cellules endothéliales au niveau de la BHE.

Sous-Famille	Membres (alias)	Substrats
ABCA	ABCA1-4,7,12,13	Cholestérol et lipides
ABCB	ABCB1 (MDR1/CD243/Pgp)	Rejet d'une grande variété de xénobiotiques et de métabolites toxiques
ABCC	MRP1-13	Pompe à efflux des anions et des métabolites conjugués (comme les glucuronides ou les glutathions)
ABCD	ABCD1	Acides gras à longue chaîne
ABCF	ABCF1	Rejet des médicaments
ABCG	ABCG1-4	Transport des lipides, des stéroïdes, du cholestérol et des différentes molécules thérapeutiques

Les macromolécules dont la masse moléculaire est comprise entre 5 kDa et 400 kDa, sont transportées par **endocytose** (Tableau 4) (Meijering *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2018). La formation des vésicules d'endocytose est liée à l'invagination de la membrane plasmique autour de la molécule à transporter. Cette invagination se referme et se détache de la membrane pour être transportée au sein de la cellule. Il faut distinguer trois grandes catégories d'endocytose : la **phagocytose** pour capturer et détruire ; la **pinocytose** pour absorber le milieu ; et l'**endocytose à récepteur**, qui sélectionne la molécule à capter par des récepteurs spécifiques. Au niveau de la BHE, deux mécanismes endocytotiques sont présents : la **transcytose à récepteurs** et la **transcytose par adsorption**.

La **transcytose à récepteurs** met en jeu un récepteur spécifique à la molécule qui doit être transportée. La molécule se lie à son récepteur et une vésicule internalisant le complexe molécule/récepteur est créée (mécanismes dépendant des cavéolines ou de la clathrine). Cette vésicule est ensuite transportée du pôle apical au pôle basal pour y être libérée (Barar *et al.*, 2016). L'insuline et la transferrine emploient ce mode de transport. La **transcytose par adsorption** repose sur les interactions électrostatiques entre la surface membranaire de la cellule endothéliale et la molécule. En effet, la surface de ces cellules est chargée négativement par les glycoprotéines et les têtes polaires des phospholipides. À l'inverse, les molécules transportées devront avoir un excès de charges positives pour pouvoir interagir avec la surface cellulaire et être internalisées.

Tableau 4 : Transporteurs à récepteurs présents à la surface des cellules endothéliales de la BHE.

Systèmes de transport	Abréviations	Ligands	Type	Direction
Transferrine	TfR	Fe-Transferrine	Transcytose médiée par récepteur (clathrine)	Du sang vers le cerveau
Insuline	IR	Insuline	Transcytose médiée par récepteur (clathrine)	Du sang vers le cerveau
Mélanotransferrine	MTfR	Mélanotransferrine	Transcytose médiée par récepteur	Du sang vers le cerveau
Lactoferrine	LfR	Lactoferrine	Transcytose médiée par récepteur	Du sang vers le cerveau
Récepteur à apolipoprotéine E	ApoER2	Lipoprotéines et molécules liées aux apolipoprotéines	Transcytose médiée par récepteur	Du sang vers le cerveau
Protéines réceptrices aux LDL	LRP1 /LRP2	LDL	Transcytose médiée par récepteur (cavéoline)	Bidirectionnel
Récepteurs des produits finaux glycosylés	RAGE	Protéines glycosylées, β -amyloïde, S-100 β , amphotéricine	Transcytose médiée par récepteur	Du sang vers le cerveau
Facteur de nécrose tumorale		TNF α	Transcytose médiée par récepteur	Du sang vers le cerveau
Facteur de croissance épidermique		EGF	Transcytose médiée par récepteur	Du sang vers le cerveau
Protéines cationisées		Albumine cationisée	Transcytose à adsorption	Du sang vers le cerveau
Peptides pénétrants		SynB5 /pAnt-(43-58)	Transcytose à adsorption	Du sang vers le cerveau

Les cellules provenant de la lignée monocytaire de la moelle osseuse entrent dans le cerveau pendant le développement embryonnaire et deviennent alors la microglie résidente immunocompétente au sein du SNC (Glezer *et al.*, 2007). Les cellules immunitaires périphériques passent entre les cellules endothéliales par diapédèse. Ce processus implique un réarrangement transitoire des jonctions serrées. Cependant, ces cellules immunitaires franchissent également la BHE en empruntant une voie d'endocytose (Engelhardt, 2008). Lors d'une pathologie inflammatoire, les signaux cytokiniques vont induire l'ouverture des jonctions serrées ouvrant la voie paracellulaire aux cellules immunitaires périphériques.

De par ses propriétés intrinsèques, la BHE empêche donc le passage de la majorité des agents thérapeutiques pour le traitement des affections neurologiques. Il est donc nécessaire de développer des modalités de délivrance intracérébrale des molécules thérapeutiques.

(2) Délivrance intracérébrale de molécules thérapeutiques

Plusieurs stratégies sont envisageables pour délivrer des molécules thérapeutiques dans le tissu cérébral (Pardridge, 2007; Dong, 2018; Mulvihill *et al.*, 2020; Gosselet *et al.*, 2021).

Dans le cadre de nombreuses pathologies centrales et périphériques, les composants cellulaires et moléculaires de la BHE subissent des dysfonctionnements, menant à l'augmentation de sa perméabilité (Abbott, 2002; Desai *et al.*, 2007; Bernardo-Castro *et al.*, 2020). En effet, lors des accidents vasculaires et des traumatismes cérébraux, les astrocytes de la BHE secrètent des facteurs pro-inflammatoires (*i.e.*,

TGF β , IL-6, bradykinine) et expriment des aquaporines 4, ainsi que des effecteurs de la protéolyse de la MEC (*i.e.*, MMP-9). L'ensemble de ces événements biologiques conduit à l'augmentation de la perméabilité de la BHE. De plus, une infection ou un terrain inflammatoire (méningites, encéphalites, septicémie, *etc.*) conduisent *via* l'action de facteurs pro-inflammatoires à l'augmentation de la perméabilité de la BHE. De même, les maladies neurodégénératives (sclérose en plaque, maladies de Parkinson et d'Alzheimer) sont responsables de l'ouverture de la BHE (déstabilisation des protéines jonctionnelles et des transporteurs de la BHE). Enfin, les tumeurs cérébrales, par leur nature et leur vascularisation particulière, induisent une augmentation de la perméabilité de la BHE.

Dans le cas où la BHE est physiologiquement intacte, la méthode de délivrance de molécules thérapeutiques la plus évidente est celle de l'injection directe de ces dernières dans le tissu cérébral. Deux méthodes similaires existent : l'**injection intracérébrale** et l'**injection intracérébroventriculaire**. Ces deux méthodes nécessitent une intervention neurochirurgicale susceptible d'induire des séquelles post-opératoires. Néanmoins, la délivrance des molécules thérapeutiques sera hautement localisée. Par conséquent, l'étendue de diffusion du médicament sera limitée au point d'injection et diffusera selon la composition cellulaire environnante. L'avantage de la délivrance intracérébroventriculaire est l'exposition de l'ensemble du cerveau et de la moelle épinière aux molécules thérapeutiques *via* le système d'irrigation du liquide cébrospinal (LCS).

Il est également possible d'utiliser la voie trans-nasal pour délivrer de petites molécules liposolubles par **instillation nasale**. Cette technique maximise la dose délivrée dans le LCS augmentant ainsi les chances de délivrer les molécules thérapeutiques dans le tissu cérébral. Cette voie de délivrance est similaire à celle de l'injection intracérébroventriculaire. Elle offre le principal avantage d'être non-invasive mais elle ne permet pas de délivrance localisée à l'image de l'injection intracérébrale. De plus, il est nécessaire que les molécules thérapeutiques soient liposolubles et d'instiller un petit volume (*i.e.*, 100 μ L) pour éviter d'endommager la muqueuse nasale.

L'injection de **solutions hyperosmotiques** (*e.g.*, mannitol) dans la carotide ou de **composés vasoactifs** (*e.g.*, bradykinine, peptide vasoactif intestinal) augmente rapidement la perméabilité de la BHE, en induisant un réarrangement transitoire des jonctions serrées. Cette technique présente l'inconvénient d'offrir aux protéines plasmatiques une voie de passage incontrôlée vers le SNC, induisant ainsi des effets indésirables graves. En effet, l'albumine est nocive pour les astrocytes et provoque une neuroinflammation (Eimerl and Schramm, 1991; Nadal *et al.*, 1995).

D'autres stratégies se basent sur la **modification des propriétés physicochimiques des molécules thérapeutiques**. En effet, le passage à travers les barrières biologiques est conditionné par cinq paramètres physicochimiques (principes de Lipinski, (Lipinski *et al.*, 2001)) : la masse moléculaire, la lipophilie, la surface polaire, le nombre de liaison hydrogène et la charge électrique (Tableau 5). Ces paramètres peuvent être optimisés pour améliorer le passage des molécules thérapeutiques à travers les barrières biologiques (*i.e.*, augmentation de la lipophilie, acétylation ou suppression des groupements hydroxyles des molécules, *etc.*). Bien que les modifications physicochimiques des principes actifs augmentent sensiblement leur passage à travers les barrières biologiques, elles modifient également les paramètres de pharmacocinétique et de pharmacodynamique. En effet, en

augmentant la lipophilie des molécules, la liaison tissulaire non spécifique est également augmentée, causant alors des effets secondaires systémiques. La modification des molécules constitue un compromis entre leur passage à travers la BHE, leur pharmacodynamique et leur pharmacocinétique.

Tableau 5 : Carte d'identité de la substance chimique idéale pour le passage de la BHE. D'après Partridge, 2007.

Paramètres	Valeur idéale
Masse moléculaire	Inférieure à 500 Da
Donneur de liaisons hydrogènes	Pas plus de 5
Accepteur de liaisons hydrogènes	Pas plus de 10
Coefficient de partage (sans unité)	Inférieur à 5

La chimie moderne est capable de modifier les principes actifs pour que les molécules thérapeutiques franchissent la BHE par l'intermédiaire de **transporteurs endogènes** présents à la surface des cellules endothéliales. C'est le cas par exemple de la dopamine qui ne passe pas naturellement la BHE. Il est nécessaire de transformer la dopamine en son précurseur, la L-Dopa qui franchit la BHE *via* le transporteur des grands acides aminés neutres (LAT1). Ensuite, la L-Dopa est décarboxylée en dopamine et joue son rôle thérapeutique dans le cadre de la maladie de Parkinson. Cependant, cette méthode est tributaire de l'existence endogène de la molécule ainsi que de ses dérivés, et nécessite que le poids moléculaire de ces molécules thérapeutiques soit inférieur à 400 Da. Il est également nécessaire de connaître la biologie associée à ces transporteurs endogènes. La compréhension et l'utilisation de ces transporteurs endogènes constituent un important travail de recherche fondamentale.

Une autre stratégie pour franchir la BHE est l'utilisation de **nanoparticules** (Mulvihill *et al.*, 2020). Ces nanoparticules (NP) ont généralement une taille comprise entre 1 et 100 nm et sont constituées de polymères, de lipides ou de composés inorganiques. Elles utilisent différents mécanismes physiologiques pour la délivrance de molécules à travers la BHE. Le moteur principal de cette délivrance thérapeutique est en général le transport par les récepteurs/transporteurs. De plus, l'avantage de cette technologie est la possibilité d'adapter ou de fonctionnaliser ces nanoparticules. En effet, il est possible de les charger chimiquement, et de contrôler la délivrance et la pharmacocinétique du principe actif encapsulé dans la NP. En outre, ces NP ont la capacité de protéger le principe actif, l'empêchant d'être métabolisé par le métabolisme périphérique. Elles peuvent également être modifiées de manière à cibler spécifiquement des entités biologiques (peptides, substrats spécifiques des récepteurs par endocytose, surfactant, modification des charges de surface, anticorps, *etc.*). Cependant, cette technologie présente des limitations, notamment au niveau de l'efficacité de la formulation. En effet, l'encapsulation des molécules dépend largement de leurs propriétés physicochimiques. Du fait de leur petite taille, les NP non ciblées peuvent s'accumuler dans les tissus sains, notamment dans le foie et les reins, et par conséquent peuvent être toxiques. Néanmoins, l'innocuité des NP non ciblées ou ciblées doit être démontrée pour être portée dans le domaine clinique. Enfin des questions économiques se posent sur la translation du laboratoire à la production industrielle à grande échelle.

Au cours des deux dernières décennies, une méthode prometteuse de délivrance de molécules thérapeutiques reposant sur l'utilisation conjointe des **ultrasons focalisés** et des **agents de contraste**

ultrasonore, constitués de microbulles de gaz, a été développée pour traiter des affections neurologiques (Hynynen *et al.*, 2005). Cette méthode est appelée sonoporation et dénote le processus qui perméabilise les membranes plasmiques des cellules, ainsi que les barrières biologiques. L'avantage de cette technique est la possibilité d'administrer de manière non-invasive et hautement localisée les composés thérapeutiques dans les tissus. Elle réduit la dose administrée au patient, maximise la biodistribution du principe actif thérapeutique dans le tissu cible, et augmente l'index thérapeutique de la molécule. Finalement, en réduisant l'exposition des tissus périphériques aux médicaments, les effets secondaires néfastes sont drastiquement réduits et la qualité de vie des patients est améliorée. L'une des principales limitations de l'utilisation des ultrasons pour la délivrance intracérébrale de molécules thérapeutiques est la propagation des ultrasons à travers les structures osseuses du crâne. En effet, les ondes ultrasonores sont diffractées et/ou réfléchies par les structures denses telles que les os du crâne, engendrant ainsi une atténuation de la pression acoustique délivrée dans le tissu cérébral ainsi qu'une défocalisation du faisceau ultrasonore (Fry and Barger, 1978; Gerstenmayer *et al.*, 2018). Néanmoins, des progrès technologiques ont permis de minimiser les écueils de la propagation des ultrasons (utilisation d'une matrice de transducteurs focalisés, diminution de la fréquence des ultrasons, *etc.*). L'utilisation de cette méthode de délivrance de molécules thérapeutiques pour le traitement d'affections neurologiques nécessite le développement et la validation de protocoles ultrasonores efficaces et sûrs.

Partie I

État de l'art

Chapitre 2

La sonoporation



Chapitre 2.	La sonoporation	19
1.	Introduction	19
2.	Article	21
3.	Synthèse.....	42

Chapitre 2. La sonoporation

1. Introduction

Le terme « **sonoporation** » répond à l'utilisation conjointe des ultrasons focalisés et de microbulles injectées dans la circulation sanguine. De ce fait, les microbulles au sein d'un champ acoustique ultrasonore vont osciller et/ou caviter dépendamment de la pression acoustique (Figure 7). Ces phénomènes physiques déclenchent des réponses de la part des cellules constituant les parois des barrières biologiques (*i.e.*, BHE, barrière hémato-tumorale – BHT, *etc.*).

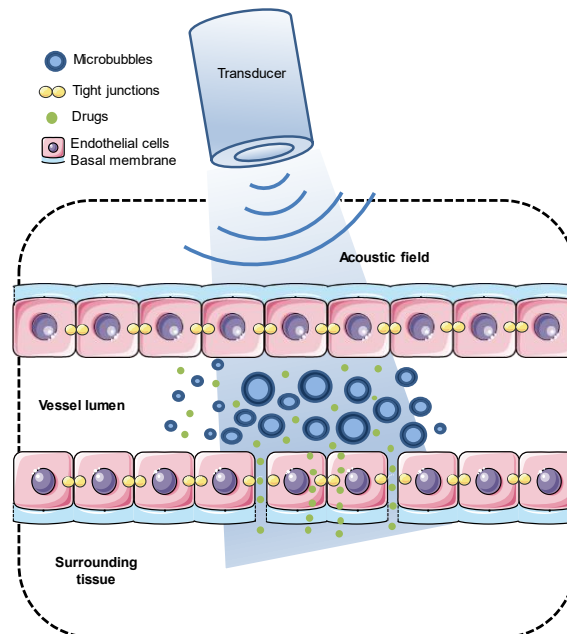


Figure 7 : Représentation schématique du principe de déstabilisation des barrières biologiques pour la délivrance de médicaments. Schéma personnel produit à partir de la banque d'images Servier Medical Art.

Rapidement, cette méthode relativement peu coûteuse et facile à mettre en place s'est imposée comme une méthode innovante pour la délivrance non-invasive et ciblée de molécules thérapeutiques. Plusieurs travaux ont étudié les mécanismes et l'efficacité de cette méthode dans de nombreuses applications cliniques (oncologie, neurologie, infectiologie, ophtalmologie, ORL, *etc.*). Cependant, bien que des pistes mécanistiques sur les phénomènes à l'origine de la perméabilisation cellulaire et de la déstabilisation des barrières biologiques ont été avancées, de nombreuses interrogations demeurent sur les mécanismes réels des effets biologiques observés.

Dans le cadre d'une collaboration avec le Professeur Noboru Sasaki (Université d'Hokkaido, Japon), nous avons rédigé une revue de la littérature sur les conséquences physiologiques de la perméabilisation de cellules et barrières endothéliales par sonoporation (Preset *et al.*, 2020). Cette revue a été publiée dans le journal *Ultrasound in Medicine and Biology*. Elle constitue, à notre connaissance, le premier travail de synthèse de la littérature concernant les bioeffets de la sonoporation sur les cellules endothéliales vasculaires, ainsi que sur les barrières endothéliales qu'elles constituent. En raison de la nature et de la localisation du processus de sonoporation, ces cellules sont donc considérées comme ses premières cibles. Après une brève introduction qui rappelle les principes

physiques de la sonoporation, une première partie décrit l'état de nos connaissances sur les effets biologiques *in vitro* de la sonoporation. Ces effets biologiques ont été étudiés sur des modèles *in-vitro* de monocouches cellulaires mimant les barrières endothéliales. Ces modèles ont permis d'étudier les conséquences membranaires (*i.e.*, formation de pores membranaires, stimulation de l'endocytose, *etc.*), intracellulaires (*i.e.*, signalisation calcique, production d'espèces réactives de l'oxygène, cytosquelette d'actine, *etc.*) et intercellulaires (*i.e.*, intégrité des jonctions serrées, *etc.*) de la sonoporation. Ensuite, une deuxième partie est consacrée aux données de la littérature sur la perméabilisation *ex vivo* et *in vivo* des cellules et des barrières endothéliales (*e.g.*, barrières hémato-encéphalique, hémato-tumorale, hémato-placentaire, *etc.*) par sonoporation, ainsi que sur les changements provoqués par cette dernière sur la dynamique vasculaire *in vivo*.

Référence bibliographique :

Presset, A., Bonneau, C., Kazuyoshi, S., Nadal-Desbarats, L., Mitsuyoshi, T., Bouakaz, A., Kudo, N., Escoffre, J.M., Sasaki, N., 2020. *Endothelial Cells, First Target of Drug Delivery Using Microbubble-Assisted Ultrasound. Ultrasound Med Biol* 46, 1565-1583.

DOI : 10.1016/j.ultrasmedbio.2020.03.013



● Review Article

ENDOTHELIAL CELLS, FIRST TARGET OF DRUG DELIVERY USING MICROBUBBLE-ASSISTED ULTRASOUND

ANTOINE PRESSET,^{*} CORENTIN BONNEAU,^{*} SASAOKA KAZUYOSHI,[†] LYDIE NADAL-DESBARATS,^{*}
 TAKIGUCHO MITSUYOSHI,[‡] AYACHE BOUAKAZ,^{*} NOBUKI KUDO,[‡]
 JEAN-MICHEL ESCOFFRE,^{*} and NOBORU SASAKI[†]

^{*}UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, Tours, France; [†]Laboratory of Veterinary Internal Medicine, Department of Clinical Sciences; Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Japan; and [‡]Laboratory of Biological Engineering, Graduate School of Information Science and Technology, Hokkaido University, Sapporo, Japan

Abstract—Microbubble-assisted ultrasound has emerged as a promising method for local drug delivery. Microbubbles are intravenously injected and locally activated by ultrasound, thus increasing the permeability of vascular endothelium for facilitating extravasation and drug uptake into the treated tissue. Thereby, endothelial cells are the first target of the effects of ultrasound-driven microbubbles. In this review, the *in vitro* and *in vivo* bioeffects of this method on endothelial cells are described and discussed, including aspects on the permeabilization of biologic barriers (endothelial cell plasma membranes and endothelial barriers), the restoration of their integrity, the molecular and cellular mechanisms involved in both these processes, and the resulting intracellular and intercellular consequences. Finally, the influence of the acoustic settings, microbubble parameters, treatment schedules and flow parameters on these bioeffects are also reviewed. (E-mail: Jean-michel.escoffre@univ-tours.fr) © 2020 World Federation for Ultrasound in Medicine & Biology. All rights reserved.

Key Words: Drug delivery, Endothelial cells, Endothelial barrier, Endothelial membrane, Microbubble, Ultrasound, Permeability, Vascular effects.

INTRODUCTION

Despite the increasing number of drugs and the development of novel-targeted therapies, therapeutic progress remains modest for many prevalent and costly diseases. Major obstacles are the non-specific delivery of drugs (related to drug formulation or physicochemical properties) and the presence of biologic barriers, including endothelial barriers (*e.g.*, blood-tumor barrier, blood-brain barrier). These barriers thus limiting drug extravasation from the blood compartment to extravascular tissues, hence restraining their therapeutic efficacies (Cheng 2013; Weinberg 2014; Di and Kerns 2015). In addition, the majority of these drugs induce significant side effects in healthy tissues. In this context, any targeted and active drug delivery method promoting increased drug bioavailability specifically in diseased tissues, while at the same time minimizing healthy tissue

side effects, remains today a major challenge for efficient and safe treatments.

To improve the trans-endothelial delivery of drugs, viral (mainly for gene delivery), chemical (*e.g.*, bare or targeted nanoparticles, liposomes) and physical methods (*e.g.*, electroporation, magnetofection and hydrodynamic injection) have been designed (Sercombe *et al.* 2015; Kolosnjaj-Tabi *et al.* 2018; Kou *et al.* 2018; Price *et al.* 2018). The general principle of these various methods is based on passive (*e.g.*, enhanced and permeability retention effect) or active (*e.g.*, transient disruption of endothelial barrier, receptor-mediated trans-endothelial transports, *etc.*) transport of drugs by facilitating drug extravasation and uptake into the target tissue. Recently, research in the field of acoustically-mediated drug delivery has rapidly expanded, specifically with respect to microbubble-assisted ultrasound (Escoffre and Bouakaz 2016; Guvener *et al.* 2017; Roovers *et al.* 2019). Microbubbles are the main component of ultrasound contrast agents (UCAs) and are currently used in radiology (Erlichman *et al.* 2019). They are formulated as lipid-, protein-, or polymer-shelled micrometer-sized gas

Address correspondence to: Dr. Jean-Michel Escoffre, UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, 10 Boulevard Tonnellé, 37032, Tours Cedex 1, France. E-mail: Jean-michel.escoffre@univ-tours.fr

bodies in saline solution (Paefgen et al. 2015). When microbubbles are injected intravenously they are considered an intravascular-specific tracer, hence the endothelial barriers not being crossed (Sennoga et al. 2017). In medical ultrasound diagnostics, microbubbles are administered by intravenous (i.v.) injection to increase the acoustic contrast between blood and surrounding tissue, thus improving image quality and diagnostic confidence (Dietrich et al. 2018). The main uses of microbubble-based diagnostic imaging are in the examination of perfused organs, the physiopathologic characterization of lesions and border detection in cardiology. Beyond these diagnostic objectives, promising new applications of UCAs have emerged for targeted drug delivery (Lammertink et al. 2015). UCAs can be intravenously co-injected with drugs or carry these drugs inside or on/in their encapsulated shells (Suzuki and Klivanov 2016). Acoustically activated microbubbles (*i.e.*, oscillating microbubbles) in close endothelial barrier proximity lead to an increase in vascular permeability, thus facilitating drug extravasation into targeted tissues. In turn, this increases intra-tissue drug bioavailability and potentially the drug therapeutic efficacy (Castle and Feinstein 2016; Qin et al. 2016; Poon et al. 2017). The microbubble response to ultrasound depends on the applied acoustic parameters, as well as the intrinsic properties of the microbubbles and surrounding medium (Kooiman et al. 2014). In brief, microbubbles oscillate stably over time upon exposure to low acoustic pressures (*i.e.*, stable cavitation), oscillating more rigorously at higher acoustic pressures (*i.e.*, inertial cavitation). Stable microbubble oscillations generate cell massage (*i.e.*, pulling/pushing process) and fluid microstreaming (Wu 2002; van Wamel et al. 2006; Doinikov and Bouakaz 2010a) effects. However, microbubble disruption induces the formation of shock waves in the surrounding medium (Kodama et al. 2006; Qiu et al. 2010), and the asymmetric collapse of microbubble leads to the formation of high-velocity microjets (Postema et al. 2005; Ohl et al. 2006). In close contact with endothelial cells, these four mechanical stimuli result in shear stress on endothelial cells, leading to intracellular and trans-endothelial delivery of drugs (Escoffre and Bouakaz 2019; Qin et al. 2018). Today, the great interest in this method, especially the potential of this method for drug delivery, is clearly demonstrated by an increasing number of publications in the field. Indeed, microbubble-assisted ultrasound is a non-invasive and easy-to-apply method for the delivery of a wide range of drugs to either superficial or deep organs (Kotopoulos et al. 2013; Carpentier et al. 2016; Dimceviski et al. 2016; Abrahao et al. 2019; Mainprize et al. 2019). Microbubble-assisted ultrasound could be guided by magnetic resonance imaging or ultrasound imaging, but current pre-clinical and clinical studies

based on microbubble-assisted ultrasound have not explored these possibilities (Chai et al. 2018; Chertok and Langer 2018).

As reported earlier in this report, endothelial cells are clearly one of the first targets of acoustically-mediated drug delivery (Song et al. 2002; Gao et al. 2012; Hu et al. 2012). However, no consensus has been reached regarding the molecular and cellular mechanisms involved in acoustically-mediated drug extravasation and the restoration of endothelial integrity (Qin et al. 2018). Various hypotheses have been put forward with respect to the mechanisms underlying endothelial barrier permeabilization after the application of microbubble-assisted ultrasound (Qin et al. 2018). Indeed, the reversible disruption of endothelial barriers has been found to occur according to two characteristically distinct processes: (i) endothelial micro-disruptions, referring to focal paracellular pathways and involving destabilized tight junctions (TJs) (Raymond et al. 2007; Kooiman et al. 2010) or (ii) transcellular pathways that are stimulated by vasoconstriction and local cell membrane stimulation, inducing in turn active drug transport (Deng et al. 2012).

In this review, we focus first on the bioeffects of microbubble-assisted ultrasound (*i.e.*, increased permeability of endothelial cell plasma membranes and of the vascular endothelium). We outline the main roles of microbubble-assisted ultrasound in both *in vitro* and *in vivo* drug delivery. The limitations of available literature and future perspectives are also discussed.

METHODS

PubMed and Web of Science electronic databases were screened by four authors of this review (A.P., C.B., J. M.E. and N.S.) using pre-defined search dates (January 1995–January 2020) and terms for *in vitro* and *in vivo* studies investigating the bioeffects of microbubble-assisted ultrasound on endothelial barriers. The PubMed database search terms used were as follows: (endothelium [MeSH terms] OR endothelial cell [MeSH terms] OR endothelial barrier [MeSH terms]) AND (bioeffects [MeSH terms]) AND (microbubbles [MeSH terms] OR ultrasound contrast agents [MeSH terms]) AND (ultrasound [MeSH terms]) AND (“English” [language]) OR (Sonoporation [MeSH terms] OR microbubble-assisted ultrasound [MeSH terms]). The research terms (“endothelium OR endothelial cell”) AND (“microbubbles OR ultrasound contrast agents”) OR (“sonoporation” OR “microbubble-assisted ultrasound”) were used on the Web of Science. The research term “ultrasound AND endothelial” were used on both databases. The inclusion and exclusion criteria are summarized in the Table 1. All *in vivo* procedures discussed in this review were performed according to ethical guidelines and were approved by the Animal Care and Regional Committees for Ethics in Animal Experimentation. Data were extracted by

Table 1. Inclusion and exclusion criteria used to select studies

Inclusion criteria	Exclusion criteria
Concerning endothelial bioeffects	Ultrasound without microbubbles
Studies investigating the mechanisms of extravasation	Review papers, comments, letters
Involving microbubble-assisted ultrasound	Studies investigating the therapeutic efficacy of acoustically-mediated drug delivery
On endothelial cells and <i>in vitro</i> endothelial barriers	Studies investigating the biodistribution and pharmacokinetics of drug after acoustically-mediated drug delivery
On animals	Studies involving humans
English	

the same four authors of this report, following a pre-defined list including the following: endothelial cells, endothelial barrier model, ultrasound parameters (frequency, duty cycle, total insonation time, pulse repetition frequency [PRF] and peak negative pressure), microbubble characteristics (type, dose, administration route) and significant bioeffects.

In vitro bioeffects on endothelial monolayers and barriers: Membrane consequences

Formation of membrane pores. The main membrane consequence resulting from exposure of endothelial cells to ultrasound in the presence of microbubbles is the increase in native membrane permeability to non-permeant exogenous molecules (Meijering *et al.* 2007; Park *et al.* 2011; Juffermans *et al.* 2014; Juang *et al.* 2019). Both stable and inertial cavitation of microbubbles induce the formation of hydrophilic membrane pores as a result of chemical (e.g., production of reactive oxygen species) and mechanical (van Wamel *et al.* 2006; Juffermans *et al.* 2009; Kudo *et al.* 2009; Helfield *et al.* 2016) stimuli. Using high-speed optical imaging, van Wamel *et al.* (2006) reported that stably cavitating microbubbles (1 MHz, peak negative pressure [PNP] 0.4 MPa, 10 cycles, PRF 50 Hz, 5 s; BR14 microbubbles), in direct contact with, or in close vicinity of adherent bovine endothelial cells deformed the plasma membrane in a smooth curve-shaped manner. The plasma membrane deformation changed according to the oscillating radial fluctuations of the microbubbles (van Wamel *et al.* 2004, 2006). As presented in Figure 1, the deformed cells demonstrated an intracellular uptake of propidium iodide (non-permeant fluorescent dye; 668 Da); whereas the non-deformed cells did not exhibit dye incorporation. Membrane integrity recovery time was approximately 1 min (van Wamel *et al.* 2006). Using their own ultrasound settings and microbubbles (1 MHz, 8 cycles, PNP 0.8 MPa; lab-made phospholipid-shelled microbubbles), Helfield *et al.* (2016) also reported that the exposure of primary human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) to microbubble-assisted ultrasound induced membrane permeabilization (Helfield *et al.* 2016).

Kooiman *et al.* (2011) described that lab-made CD31-targeted phospholipid-shelled microbubbles can

also be exploited to increase the native membrane permeability of HUVECs (Kooiman *et al.* 2011). Indeed, they reported that, regardless of PNP (1 MHz, 10 cycles, PNP 80-200 kPa), the intracellular uptake of propidium iodide was observed when the relative oscillation amplitude of targeted microbubbles was greater than 0.5. No relationship was established between the position of the targeted microbubbles at the cell surface and the induction of membrane permeabilization (Kooiman *et al.* 2011). Van Rooij *et al.* (2016) revealed the first study that directly compared bare and CD31-targeted microbubbles for the membrane permeabilization of HUVECs (1 MHz, 500–50000 cycles, PNP 150–500 kPa) (van Rooij *et al.* 2016). The authors demonstrated that longer pulses at higher PNP resulted in more displacement of and more oscillations of bare microbubbles than targeted microbubbles. Displacing bare microbubbles led to reversible and irreversible membrane permeabilization of HUVECs. For targeted microbubbles, Van Rooij *et al.* (2016) reported an increase in reversible membrane permeabilization that concurred with a similar increase in membrane permeabilization caused by displacing targeted microbubbles. In addition, the percentage of irreversibly permeabilized HUVECs by displacing targeted microbubbles was much lower than the percentage by bare microbubbles. These data suggest that displacing targeted microbubbles for the most part induce reversible membrane permeabilization, but it is not possible to define if several of these microbubbles can permeabilize several HUVECs or a single HUVEC. Supporting this, van Rooij *et al.* (2016) demonstrated a direct relationship between non-displacing microbubbles and irreversible membrane permeabilization. This was explained by persistent microbubble oscillation at the same location on the plasma membrane (van Rooij *et al.* 2016).

Earlier publications have demonstrated the influence of physiologic flow on the acoustically-mediated membrane permeabilization of endothelial cells (Park *et al.* 2011; Shamout *et al.* 2015). Indeed, Park *et al.* (2011) examined the effects of constant shear stress (5 dyne/cm² for 5 d) on membrane permeabilization efficacy by simulating the *in vivo* shear stress condition within the microvasculature (4–20 dynes/cm²). Murine brain microvascular endothelial cells (bEnd.3) and

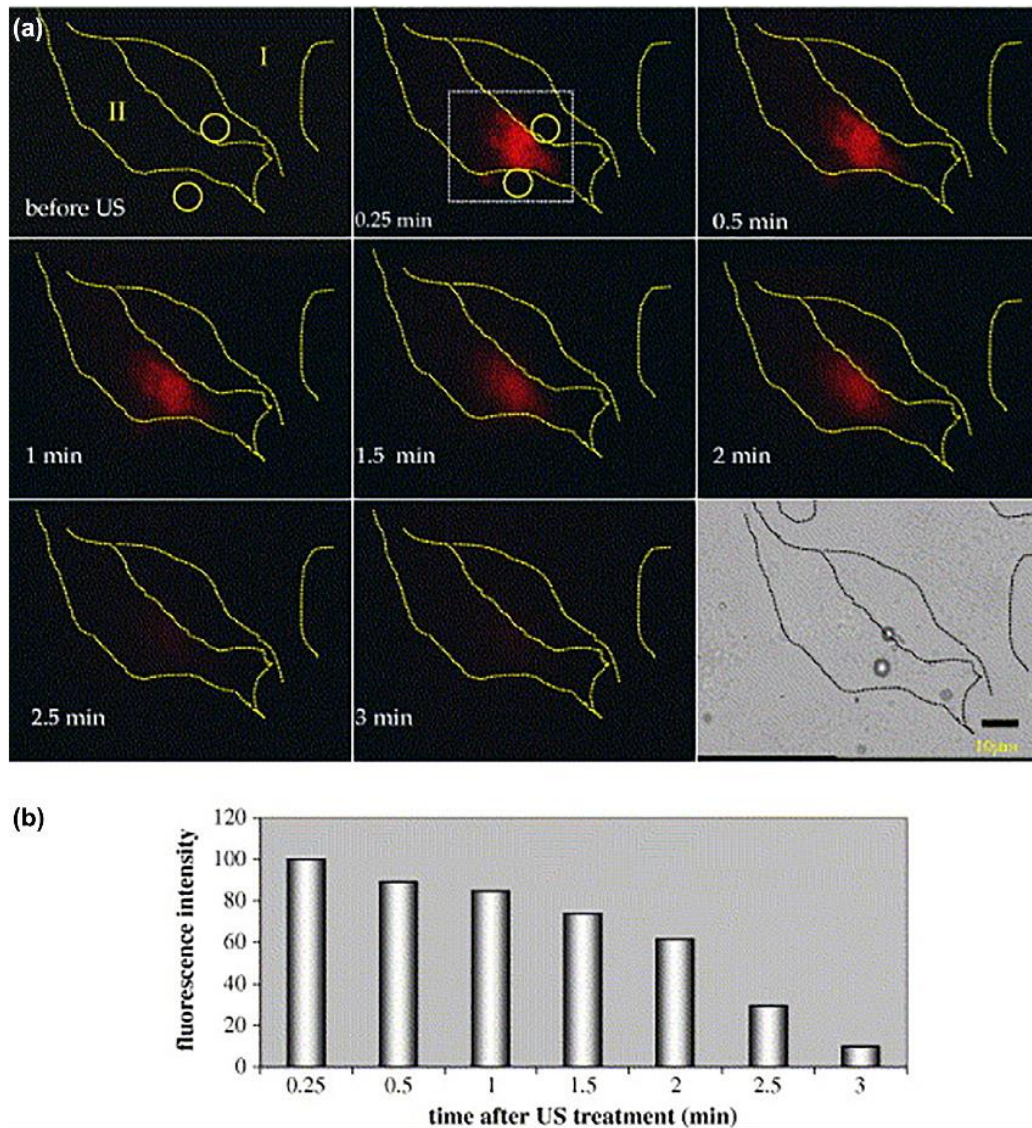


Fig. 1. Membrane permeabilization of endothelial cells, using microbubble-assisted ultrasound. (a) Fluorescence images of propidium iodide uptake of the 2 cells. The first frame is before US exposure, and the 2 circles indicate the position of the microbubbles. The second frame is taken 0.25 min after US was turned off. In this image, a region of interest is drawn. The last frame is a bright field image of the cells 3 min after US exposure. (b) The corresponding relative fluorescence intensity in the deformed cell II as a percentage of the first fluorescent image at $t=0.25$ as a function of time.

Adapted with permission from van Wamel et al. (2006). Copyright 2006, Elsevier B.V.

HUVECs were cultured under either a static or shear stress condition. The cells were then exposed to microbubble-assisted ultrasound (1.25 MHz, $8 \mu\text{s}$, PNP 0.24 MPa; Definity microbubbles) in the presence of propidium iodide. The results indicated that endothelial cells cultured under the shear stress condition displayed a significant decrease in level ($51.3 \pm 8.3\%$ vs. $10.7 \pm 14.7\%$ for bEnd.3 cells, $70.9\% \pm 10.5\%$ vs. $4.4\% \pm 6.1\%$ for HUVECs) and efficiency (69 ± 97 a.u. vs. 6 ± 27 a.u. for bEnd.3 cells, 148 ± 153 a.u. vs. 25 ± 56 a.u. for

HUVECs) of membrane permeabilization compared with the statically cultured cells. These changes in membrane permeabilization may be ascribed to the shear stress-mediated alterations in endothelial cell biomechanical properties, specifically the significant increase in membrane and intracellular viscoelasticity, as well as cytoplasmic stiffening. These biomechanical changes may induce higher endothelial cell resistance to ultrasound-driven microbubble activities in comparison with static condition-cultured cells. Similarly, Shamout et al.

(2015) reported the acoustically-mediated permeabilization of EA.hy926 endothelial cells (0.5 MHz, PNP 40 kPa, 50 cycles, PRF 0.2 Hz and 500 pulses; lab-made phospholipid-shelled microbubbles) under fluid flow conditions, mimicking blood flow in the vicinity of atherosclerotic plaque formation at a carotid artery bifurcation (Shamout *et al.* 2015). Under these ultrasound settings, the membrane permeabilization level was $62.6\% \pm 4.3\%$ with a cell viability of $95\% \pm 4.2\%$. Recently, Juang *et al.* (2019) claimed the acoustically-mediated permeabilization of HUVEC cells using an *in vitro* 3-D endothelial-cell-seeded microvascular model under physiologic flow conditions (*i.e.*, $10 \mu\text{L}/\text{min}$) (Juang *et al.* 2019). In this study, custom-made phospholipid-shelled microbubbles and 2 ultrasound settings were examined: (i) 1 MHz, 1.4 MPa, 500 cycles, 5% duty cycle (DC) and (ii) 1 MHz, 0.4 MPa, 1000 cycles, 20% DC. Juang *et al.* (2019) concluded an enhanced cell permeabilization and cell death in both ultrasound conditions (*i.e.*, permeabilization efficiency of $16\% \pm 16\%$ at 1.4 MPa vs. $4.4\% \pm 8.2\%$ at 0.4 MPa), with the higher acoustic pressure setting inducing more significant effects on both these biological processes.

The main limitation of these studies is the use of non-fully ultrasound compatible *in vitro* flow setups, potentially inducing ultrasound reflections and standing waves. Consequently, the results have to be carefully interpreted with regard to these putative acoustic phenomena. On the other hand, Hallow *et al.* (2007) confirmed these results by exposing viable *ex vivo* porcine carotid arteries to ultrasound-driven microbubbles (1 MHz, 1% DC, PNP 0.7–2.5 MPa, 300–3000 ms; Optison microbubbles) in the presence of TO-PRO-1 (non-permeant fluorescent dye; 645 Da) (Hallow *et al.* 2007). At low (0.7 MPa, 300 ms) and intermediate (1.4 MPa, 1000 ms) ultrasound conditions, the exposed viable endothelial cell permeabilization level was 9–24%. Nevertheless, these ultrasound settings also induced 7%–25% of endothelial cell death. High ultrasound conditions (2.5 MPa, 3000 ms) caused the permeabilization of smooth muscle cells, which is positively correlated to denuding or death of proximal endothelial cells. This work represents the first investigation into the intracellular delivery of ultrasound-driven microbubbles into tissue endothelial cells (Hallow *et al.* 2007).

All together these results suggest that the exposure of adherent endothelial cells to ultrasound-driven microbubbles generates a critical transmembrane shear stress, resulting in the formation of membrane pores once the membrane breakdown threshold is exceeded (VanBavel 2007). Indeed, Helfield *et al.* (2016) reported that there is an oscillation-induced shear-stress threshold, in the kPa order, beyond which HUVEC membrane permeability increases (Helfield *et al.* 2016). Rapidly oscillating

microbubbles induce fluid microstreaming over the plasma membrane of endothelial cells (Doinikov and Bouakaz 2010b). This biophysical process is likely responsible for the disruption of the plasma membrane by tearing the phospholipid bilayer (VanBavel 2007; Wu and Nyborg 2008; Helfied *et al.* 2016). Given it is known that mammalian cells are more sensitive to elongation forces compared with compression forces, the elongation forces may be the main factor governing membrane pore formation (VanBavel 2007). Although these results described a positive correlation between membrane permeabilization, *via* the formation of membrane pores and the intracellular uptake of small molecules, there is no direct observation of membrane pores, nor information about their size and their composition in endothelial cells.

Stimulation of endocytosis. Meijering *et al.* (2009) described that the exposure of primary bovine aortic endothelial cells to stably cavitating microbubbles (1 MHz, 0.22 MPa, 6.2 % DC, PRF 20 Hz, 30 s; sulphur hexafluoride [SonoVue] microbubbles) in the presence of fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled dextrans (4.4–500 kDa) resulted in a homogeneous distribution of 4.4- and 70-kDa FITC-labelled dextrans throughout the cytoplasm of endothelial cells. On the other hand, 155- and 500-kDa FITC-dextrans were located in distinct intracellular vesicles (Meijering *et al.* 2009). The adenosine triphosphate (ATP) depletion of endothelial cells partially inhibited the intracellular uptake of 4.4-kDa FITC-dextrans, and completely hindering the intracellular delivery of 500-kDa FITC-dextrans. In addition, the independent pre-treatment of endothelial cells with endocytosis inhibitors, including chlorpromazine (inhibitor of clathrin-mediated endocytosis), filipin (inhibitor of caveolin-mediated endocytosis) and wortmannin (inhibitor of macropinocytosis), led to a significant decrease in intracellular incorporation of 4.4- and 500-kDa FITC-dextrans. The 3-D confocal imaging revealed the colocalization of 500-kDa FITC-dextran with clathrin- and caveolin-coated vesicles. Meijering *et al.* (2009) confirmed these results by exposing *in vivo* rat femoral artery endothelium to the same ultrasound setting in the presence of 500-kDa FITC-dextran. Likewise, these dextrans were co-localized within clathrin- and caveolin-coated vesicles (Meijering *et al.* 2009).

Overall, these data indicated that microbubble-assisted ultrasound led to the intracellular delivery of small and large non-permeant molecules through the formation of transient membrane pores and by triggering endocytosis. The contribution of one or both of these pathways is strongly dependent on the ultrasound settings and exogenous compound molecular size (Meijering *et al.* 2007).

Intracellular consequences

The physiologic consequences of microbubble-assisted ultrasound are not limited to the plasma membrane of endothelial cells. Indeed, some *in vitro* investigations have reported that the intracellular homeostasis of calcium (Juffermans et al. 2009; Meijering et al. 2009; Park et al. 2010), reactive oxygen species (ROS) (Juffermans et al. 2009) and the actin cytoskeleton (Juffermans et al. 2009) are also acoustically disturbed.

Calcium signaling. Park et al. (2010) investigated the effects of ultrasound-driven microbubbles on the intracellular calcium concentrations of murine brain microvascular endothelial cells (bEnd.3), using real-time and high-speed optical imaging (Park et al. 2010). Endothelial cells were exposed to a single ultrasound pulse (1.25 MHz, 0.24 MPa PNP, 10 cycles) in the presence of Definity microbubbles and an extracellular calcium concentration of 0.9 mM. In this *in vitro* study, the plasma membrane permeabilization and the change in intracellular calcium concentrations were assessed using propidium iodide and Fura-2 respectively (Fig. 2). Endothelial cells in close proximity to a microbubble demonstrated an immediate and transient change in intracellular calcium concentration after ultrasound exposure. The rise in intracellular calcium concentration was doubled in permeabilized cells, but not associated with a loss in cell viability. Furthermore, the more rapid increases in intracellular calcium concentration versus plasma membrane permeabilization (propidium iodide levels) suggested differences in diffusion and binding kinetics, as well as calcium release from intracellular stores (Park et al. 2010). However, endothelial cells (bEnd.3 or HUVECs) cultured under shear stress conditions (5 dyne/cm² for 5 d) exhibited a significant decrease in intracellular calcium concentration changes compared with the statically cultured cells (Park et al. 2011). In agreement with earlier studies (Juffermans et al. 2009), these results suggest that the acoustically induced membrane pores facilitated the intracellular delivery of calcium, resulting thus in intracellular concentration changes. Although direct evidence based on endothelial cell exposure to microbubble-assisted ultrasound is still required, *in vitro* studies published elsewhere support the hypothesis that the acoustically-mediated mechanical stress on the plasma membrane can trigger changes in intracellular calcium concentration. These changes are considered to be attributable to an activation of stretch-activated channels, and subsequent calcium release from internal calcium stores (Tran et al. 2007, 2008; Juffermans et al. 2008). In addition, endothelial cells with intact plasma membranes adjacent to permeabilized cells, but not in proximity to microbubbles, exhibited delayed changes in intracellular calcium

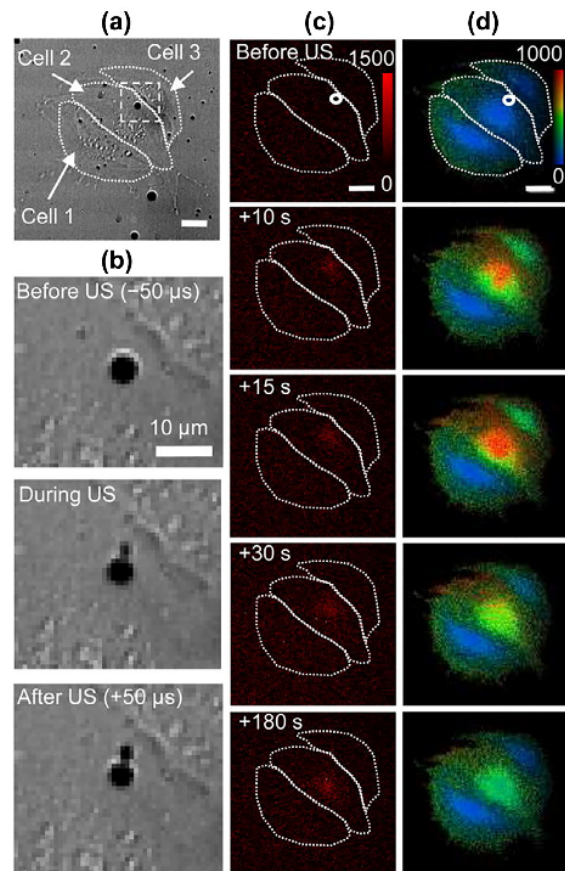


Fig. 2. US-driven microbubble activities produce membrane disruption and intracellular calcium concentration changes in an endothelial cell. (a) Brightfield image before US application, showing a microbubble located on the membrane of cell 2. (b) Enlarged high-speed images before, during and after US exposure (50- μ s time interval), showing the US-driven microbubble fragmented into smaller bubbles by a single US pulse of 10 cycles at 1.25 MHz and 0.24 MPa. (c) Time-lapse images of propidium iodide fluorescence. (d) Time-lapse images of intracellular calcium concentration. The circle outlines the microbubble on the membrane. The times are relative time after US application. The color bars in C and D indicate the PI intensity in arbitrary units and intracellular calcium concentration in nM, respectively. The scale bars in A, C and D indicate 25 μ m. Adapted with permission from Park et al. (2010). Copyright 2010 Elsevier B.V.

concentration (Park et al. 2010). These results suggested that these changes in intracellular calcium concentration were unlikely the direct result of calcium delivery through the formation of membrane pores. However, the propagation of acoustically-mediated mechanical stress by both intra- and extra-cellular messengers (inositol triphosphate, ATP, etc.) could explain these results (Boitano et al. 1992; Osipchuk and Cahalan 1992). Indeed, the release of such messengers may initiate calcium waves in neighboring endothelial cells. Nevertheless,

there is not as yet direct evidence describing such molecular mechanisms after the exposure of endothelial cells to microbubble-assisted ultrasound.

Reactive oxygen species homeostasis. Juffermans *et al.* (2009) monitored the effects of ultrasound-driven microbubbles (1 MHz, 0.2% DC, 20 Hz PRF, 0.1 MPa PNP, 10 s; SonoVue microbubbles) on ROS homeostasis of HUVECs (Juffermans *et al.* 2009). In this *in vitro* investigation, the permeabilization of plasma membranes for calcium ions and the change in intracellular ROS levels were assessed using Fluo-4 and CM-H₂DCFDA, respectively. The authors demonstrated that ultrasound-mediated microbubbles evoked a concomitant increase in intracellular calcium and H₂O₂ levels upon ultrasound initiation (Juffermans *et al.* 2009). Scavenging extracellular H₂O₂ with catalase significantly decreased membrane permeabilization for calcium ions, suggesting a close relationship between membrane permeabilization and H₂O₂ production. Other studies (Leung *et al.* 2014) have described that membrane phospholipids are very sensitive to ROS attack, a process referred to as phospholipid oxidation. This biologic process results in significant phospholipid conformational changes, leading to an increase in the average area per lipid and a decrease in membrane thickness (Wong-Ekkabut *et al.* 2007). As a result, plasma membrane water defects are generated, thus increasing membrane permeability to small molecules, such as calcium ions and water (Wong-Ekkabut *et al.* 2007). This membrane permeability increases with the increasing concentration of oxidized phospholipids. It is unfortunate that there is no experimental evidence reporting the presence of oxidized phospholipids in the plasma membrane of endothelial cells exposed to microbubble-assisted ultrasound. This could reinforce the relationship between membrane permeabilization and H₂O₂ generation. Along these lines, Juffermans *et al.* (2009) reported that the decrease in endogenous ROS scavenger glutathione concentrations, as well as the increase in protein nitrosylation levels, both correlated with an increase in intracellular H₂O₂ levels (Juffermans *et al.* 2009). These results indicated that extracellular H₂O₂ production does not only have significant functional effects at the endothelial cell plasma membrane level (i.e., increased permeability to calcium ions), but also at the intracellular compartment level (i.e., decrease in total glutathione content, increase in protein nitrosylation). In concurrence with current literature, ROS may act as second messengers in several signal transduction pathways, thus influencing membrane permeability (Wei *et al.* 2013), gene expression (Sena *et al.* 2018) and endothelial functions (angiogenesis, vasodilation, etc.) (Chen *et al.* 2018). However, further investigations are needed to identify the origin of

ROS production and to profoundly decipher the functional consequences of acoustically-mediated ROS generation.

Actin cytoskeleton. All mammalian cells alike, endothelial cells sense physical and biochemical cues produced from the extracellular medium (Yusko and Asbury 2017). Except for electrical and biochemical stimuli, mechanical stimuli (e.g., shear stress induced by an oscillating microbubble) can propagate without the diffusion of informative compounds (calcium, growth factors, etc.). Such stimuli are transmitted through mechanically stiff structures, including actin filaments and microtubules, generating spatiotemporal alterations in cytoskeletal-associated proteins and signaling pathway-related proteins. In this light, Juffermans *et al.* (2009) investigated the effects of ultrasound-driven microbubbles on the spatiotemporal distribution of the actin cytoskeleton in HUVEC cells using rhodamine-labelled phalloidin staining (Juffermans *et al.* 2009). They reported that individual F-actin stress fibers appeared over the center of sonoporated cells in comparison with control cells, whose stress fibers were arranged along the sides of the endothelial cells. The native actin cytoskeleton was restored within 30 min after ultrasound and microbubble exposure. These results suggested that shear stress acting on the endothelial cell membranes can translate mechanical forces into specific intracellular signals, thereby inducing a reversible actin cytoskeleton remodeling. To date, no studies have described the bioeffects of microbubble-assisted ultrasound on cellular and molecular actors (membrane mechanosensors, microtubules, cytoskeletal-associated proteins, enzymes etc.) involved in intracellular mechanical stimuli transmission, and the subsequent increases in transmembrane and trans-endothelial permeabilities (Qin *et al.* 2018).

Intercellular consequences

The vascular endothelium actively controls the transport of fluids, molecules and cells between the blood compartment and extravascular tissues. The integrity of this selective barrier strongly depends upon the presence of specialized TJs between adjacent endothelial cells. Consequently, this endothelial barrier is also a major obstacle for drug delivery into extravascular tissues. Recent studies have established that microbubble-assisted ultrasound can locally and transiently increase the permeability of the *in vitro* endothelial monolayer (Nixdorff *et al.* 2005; Juffermans *et al.* 2009) and barrier (Kooiman *et al.* 2010; Sasaki *et al.* 2015; L  lu *et al.* 2017). Accordingly, Juffermans *et al.* (2009) investigated the effects of ultrasound and microbubbles (1 MHz, 0.2% DC, 20 Hz PRF, 0.1 MPa PNP, 10 s; SonoVue microbubbles) on the intercellular permeability

of confluent HUVEC monolayers (Juffermans et al. 2009), using confocal microscopy after β -catenin immunostaining (a cell adherens junction protein). The ultrasound treatment alone of endothelial monolayers had a slight but insignificant impact on their integrity (Fig. 3). However, a disruption of intercellular contacts was observed after the exposure of endothelial monolayers to microbubble-assisted ultrasound. The endothelial monolayers restored their integrity within 30 min.

Kooiman et al. (2010) reported the acoustically-mediated disruption of intracellular contacts using an *in vitro* endothelial barrier (Kooiman et al. 2010). Indeed, the authors cultured HUVECs on cell culture inserts to mimic the endothelial barrier. They then evaluated the effects of microbubble-assisted ultrasound (1 MHz, 10000 cycles, 20 Hz PRF, PNP 210 kPa, 30 s; BR14 microbubbles) on endothelial permeability by measuring

the trans-endothelial electrical resistance (TEER). They reported that ultrasound-driven microbubbles significantly decreased TEER compared with ultrasound treatment alone. This increase in endothelial permeability was not associated with cell detachment or damage. Using the same setup and acoustic settings, Kooiman et al. (2013) described that this enhanced endothelial permeability lasted for up to 12 h. The pre-treatment of HUVEC cells with an intracellular calcium chelator (BAPTA-AM) or an antioxidant agent (butylated hydroxytoluene) resulted in a permeability recovery within 2 h. This suggests that both intracellular calcium and ROS play a major role in the mechanism underlying increased endothelial permeability. In addition, several studies have described that permeabilization of the *in vitro* endothelial barrier was strongly dependent on the ultrasound settings and microbubble concentrations

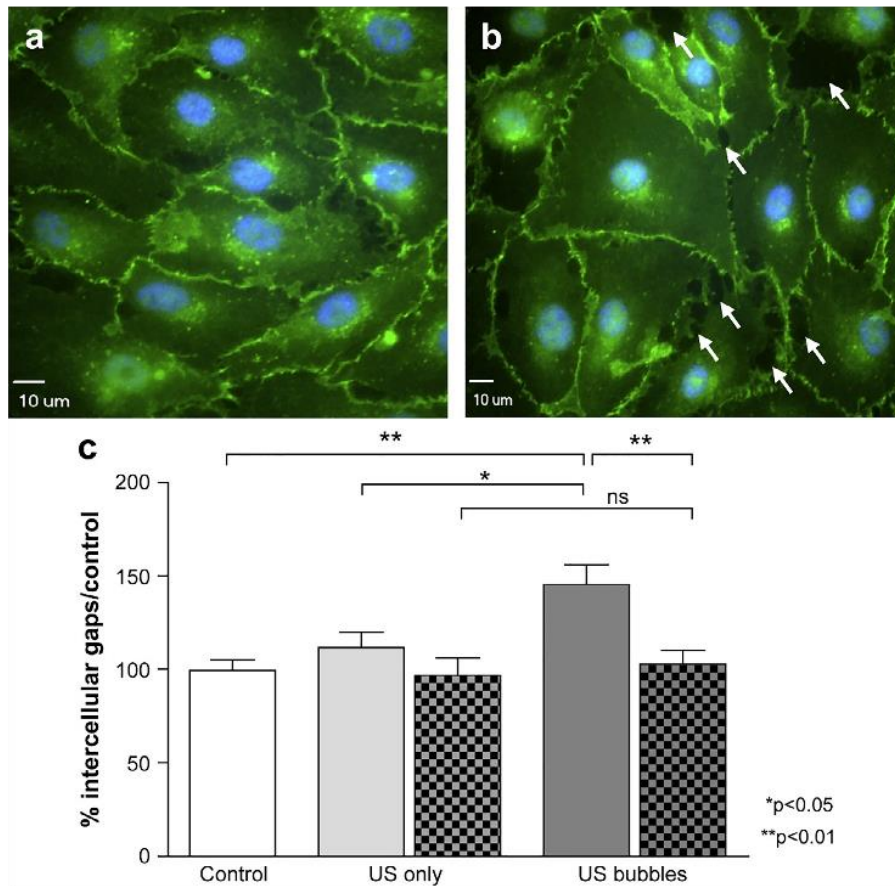


Fig. 3. Endothelial monolayer integrity. (a) and (b) Representative darkfield images of HUVECs stained for β -catenin (green), nuclei are stained blue. Intercellular gaps are indicated by arrows. (a) Control cells not exposed to US or microbubbles. (b) Cells exposed to US and microbubbles. (c) Mean number of intercellular gaps per cells \pm SEM. US alone caused a nonsignificant increase in the number of intercellular gaps; whereas US and microbubbles caused a significant increase (dark gray bar; $p < 0.01$), which returned to control levels after 30 min (checked bar; $p < 0.01$ compared with direct fixation). Adapted with permission from Juffermans et al. (2009). Copyright 2009, Elsevier B.V.

(Nixdorff *et al.* 2005; L  lu *et al.* 2017). Nixdorff *et al.* (2005) demonstrated that the number of intercellular gaps significantly increased with the mechanical index (MI) value (MI, from 0–1.6) and the soft tissue thermal index ([TIS] from 0–1.3 with pulsed-wave Doppler mode; from 0–1.5 with power Doppler), as well as with microbubble concentration (from 0.002–4 mg/mL Levovist) (Nixdorff *et al.* 2005). The MI was adopted by the US Food and Drug Administration as a real-time output display to estimate the potential for bubble formation *in vivo*. The MI is defined as the derated peak rarefactional pressure divided by the square root of the center frequency of the acoustic pulse (Apfel and Holland 1991). It is an indicator of the non-thermal bioeffects (*i.e.*, mechanical bioeffects) of the acoustic field. Furthermore, L  lu *et al.* (2017) indirectly investigated the effects of inertial (1 MHz, MI 0.8, 5% DC, PRF 1 kHz, for 5 s SonoVue microbubbles) and stable cavitation (1 MHz, MI 0.11, for 60 s as a continuous wave; SonoVue microbubbles) on the integrity of intercellular contacts in an *in vitro* blood–brain barrier (BBB) model. The TEER was assessed, as well as the trans-endothelial transport of tracers, including Lucifer yellow and AF647-labelled albumin from bovine serum (L  lu *et al.* 2017). The *in vitro* BBB model consisted in primary porcine brain endothelial cells cultured on a cell culture insert. The results indicated that stable cavitation induced a more efficient permeabilization of the endothelial barrier *via* the disruption of intercellular contacts compared with inertial cavitation.

As described in Helfield *et al.* (2016), ultrasound-driven microbubbles may generate a higher shear stress on the endothelial barrier than physiologic conditions. The alterations in endothelial barrier permeability may be attributed to the transmission of shear stress-triggered mechanical stimuli between the luminal surface and intercellular junctions *via* the cytoskeleton (Juffermans *et al.* 2009). This, in turn, could induce changes in intracellular signaling pathways that modulate endothelial barrier permeability and intercellular communication (Nixdorff *et al.* 2005; Kooiman *et al.* 2010; Sasaki *et al.* 2015). Further analysis is needed to identify the molecular actors involved in the permeabilization and subsequent recovery of the endothelial barrier. Research should focus on the detection of the mechanical stimuli at the luminal surface (channels, receptors, integrins, *etc.*) and the contributing factors of intercellular junction destabilization (TJ-associated proteins, actin cytoskeleton, *etc.*), as well as the intracellular propagation involved (*i.e.*, signaling pathways, actin cytoskeleton).

Permeabilization of *in vivo* endothelial barriers: BBB

The BBB is a highly selective and specialized barrier, composed of endothelial cells enhanced by the

presence of tight junctions, a basal membrane and pericytes (Abbott *et al.* 2006). Glial cells also play a dominant role in the highly selective permeability of the BBB. More than 99% of therapeutic molecules used for the treatment of patients with neurologic diseases do not pass through the BBB, thus causing a major problem for the therapeutic care of these patients (Abbott *et al.* 2006).

Using electron microscopy techniques, Sheikov *et al.* (2004) carried out a deep investigation into the biophysical mechanisms underlying the sonoporation-mediated destabilization of the BBB in rabbits (Sheikov *et al.* 2004). As presented in Figure 4, they reported that microbubble-assisted ultrasound (1.67 MHz, burst length [BL] 100 ms, PRF 1 Hz, 1–3 MPa, 20 s; Optison microbubbles) at 1 MPa induced a significant increase in the number of intracellular vesicles and vacuoles in both capillary endothelial cells and pericytes in comparison with the control condition (*i.e.*, no ultrasound exposure). Likewise, increased fenestration, channel formation and

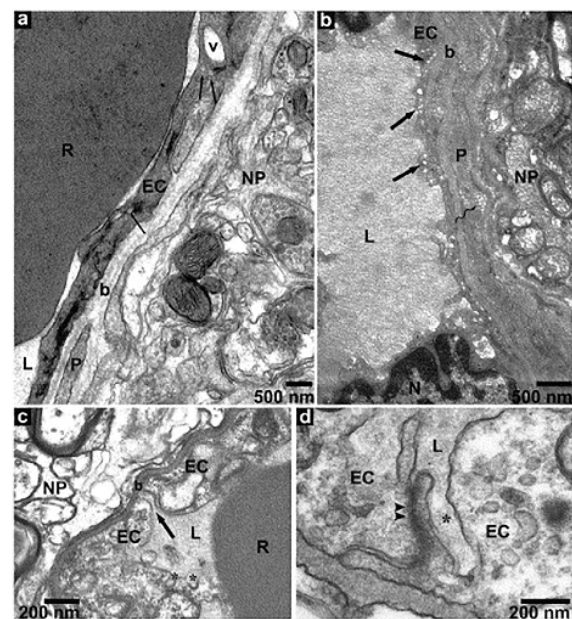


Fig. 4. Photomicrographs of brain microvessels from (a) non-sonicated control and (b)–(d) sonicated areas, showing: (a) scarce vesicles (arrows) and a vacuole (v) in the endothelial cell cytoplasm (EC), a part of a pericyte (P) and neuropil (NP); R = red blood cell in lumen (L); b = basement membrane. (B) Numerous vesicles (arrows) in an endothelial cell cytoplasm (EC) and in a pericyte (P, curved arrows). (c) A trans-endothelial channel (arrow) that exposes the basement membrane, b, to the lumen, L; (*) 2 plasmalemmal pits at the luminal surface of the endothelial cell. (d) Deep channel-like invagination (*) in an edematous-looking endothelial cell (EC, right); the interendothelial cleft (arrowheads) near the invagination does not appear to be widened. Adapted with permission from Sheikov *et al.* (2004). Copyright 2004, Elsevier B.V.

disruption of some TJs were also observed. Immunocytochemical staining against endogenous immunoglobulin G (IgG) revealed the presence of immunosignals in intracellular vesicles and vacuoles and in cytoplasmic channels, but rarely in intercellular clefts (Sheikov et al. 2004). Immunosignals were also observed in neuropil around blood vessels. Neither neuronal damage, nor morphologic changes of blood vessels or neuropil were detected. However, the exposure of brain tissue to an acoustic pressure of 3 MPa resulted in cell destruction and significant leakage of IgG through injured endothelium. Under this acoustic condition, arteriolar spasms were observed with lumen obstruction. In addition, damaged pericytes and edematous astrocytes with agglomerated nuclear chromatin were also described. Together, these results indicate that microbubble-assisted ultrasound stimulates transcellular (*e.g.*, transcytosis) and paracellular (*e.g.*, disruption of TJs) pathways depending on the acoustic pressure applied (Sheikov et al. 2004).

Following, Sheikov et al. (2008) explored the integrity of TJs in rat brain microvessels after acoustically-mediated BBB opening (1.5 MHz, PRF 1 Hz, DC 1%, BL 10 ms, PNP 1.1 MPa; Optison microbubbles). Immunoelectron imaging of TJ-specific protein markers (*i.e.* occludin, claudin-1, claudin-5 and ZO-1) was carried out at various time points (1 h–24 h) after ultrasound exposure (Sheikov et al. 2008). The BBB opening was confirmed by the extravasation of 2 intravascular tracers, including horseradish peroxidase and lanthanum chloride. This extravasation was detected within the first 2 h after ultrasound exposure and still 4 h later in a few brain vessels. Changes in endothelial permeability were positively correlated with the transient disruption of TJs. Indeed, a TJ reorganization and loss of claudin-5, occluding and ZO-1 immunosignals were observed, thus suggesting that these TJ proteins were involved in the extravasation process (Sheikov et al. 2008). The exposure of the endothelial wall to acoustically-mediated mechanical stress may induce the secretion of pro-inflammatory agents and other bioactive substances (*e.g.*, metalloproteinases) by the endothelium or perivascular glia, thus leading to the degradation of TJ proteins and BBB dysfunction (Cucullo et al. 2003). Nevertheless, TJ and endothelial permeability were restored 6 to 24 h after ultrasound exposure, thus explaining the absence of tracer extravasation at these time points (Sheikov et al. 2008). Later, Marty et al. (2012) performed a dynamic study of BBB closure after its acoustically-mediated disruption (1.5 MHz, 3-ms bursts every 100 ms for 1 min, PNP 0.45 MPa, SonoVue microbubbles). Magnetic resonance (MR) contrast agents of various hydrodynamic diameters (1 nm–65 nm) were used to estimate the largest molecular size permissible across the BBB (Marty et al. 2012). They reported that inter-

endothelial gaps slightly above 65 nm could safely be generated, and full BBB integrity could be recovered within 24 h. These results suggest that microbubble-assisted ultrasound could deliver small molecules (<65 nm), including therapeutic antibodies (*ca.* 5–10 nm), siRNA (*ca.* 50 nm) and recombinant adeno-associated virus vectors (*ca.* 20 nm), into brain tissue. However, drug nanocarriers (*e.g.*, Doxil, Abraxane) with hydrodynamic diameters above 100 nm would be difficult to deliver into the brain *via* TJ disruption, using microbubble-assisted ultrasound. To this end, the authors measured BBB opening duration by intravenously injecting contrast agents with varying hydrodynamic diameters at various times post-BBB disruption (12 min to 24 h). They reported that BBB opening duration decreased rapidly as a function of MR contrast agent hydrodynamic diameter. For example, small molecules (*ca.* 1 nm) crossed the BBB for longer than 10 h; whereas large iron oxide nanoparticles (*ca.* 25 nm) had a time window of only a few minutes.

Sheikov et al. (2006) also investigated the influence of ultrasound frequency (0.26–0.69 MHz, 20 cycles of 10 ms, PRF 1 Hz, PNP 0.3–0.8 MPa; Optison microbubbles) on trans-endothelial vesicle trafficking in capillaries, arterioles and post-capillary veins, using ultrastructural morphometry and horseradish peroxidase as a pinocytosis tracer. Independent of ultrasound frequency, the mean endothelial pinocytotic densities were significantly increased in the capillaries and arterioles 1 h after sonoporation in comparison with control locations (no sonoporation). Nevertheless, the arterioles exhibited a 2-fold increase in pinocytotic densities versus the capillaries after sonoporation. A low number of pinocytotic vesicles were observed in the venules. These results reveal that the exposure of precapillary microvessels to microbubble-assisted ultrasound stimulates the trans-endothelial delivery of macromolecules through an active vesicle transport. Deng et al. (2012) confirmed these results in part, using biochemical techniques and transmission electron microscopy. Indeed, the exposure of rat brains to microbubble-assisted ultrasound (2.2 W, 30 s; SonoVue microbubbles) enhanced BBB permeability through a caveolae-mediated transcellular transport pathway by upregulating caveolin-1 expression level and, subsequently, the amount of caveolae in cerebral vessel endothelial cells. In agreement with earlier studies (Virgintino et al. 2002; Frank et al. 2003), caveolae in endothelial cells may sense and transduce the acoustically-mediated hemodynamic changes into intracellular biochemical signals, thus regulating vascular functions such as endothelial permeability. More recently, McMahon et al. (2017) investigated the effects of microbubble-assisted ultrasound (0.5 MHz, BL 10 ms, PRF 1 Hz, 120 s; Definity microbubbles) on rat dorsal hippocampal microvessels at 6 and 24 h post-sonoporation, using

transcriptomic approaches. They reported that microbubble-assisted ultrasound increased the transcription of proinflammatory cytokine genes, thus suggesting the initiation of brain endothelium inflammation. The transcription of these genes returned to baseline 24 h after sonoporation. As described in [Jordão et al. \(2013\)](#) and in [Leinenga and Götz \(2015\)](#), this inflammation may contribute to BBB opening by the stimulation of the endocytosis pathways ([Sheikov et al. 2006](#); [Deng et al. 2012](#)) and the disruption of TJs ([Sheikov et al. 2006](#)). In fact, a downregulation in the expression of BBB transporter genes was observed at 6 h after sonoporation (*i.e.*, ABC and SLC gene families). Given the concomitant increase and decrease in pro-inflammatory cytokine and BBB transporter gene expressions, respectively, it is reasonable to believe that inflammation could induce a rapid downregulation in transporter gene expression. The authors also reported a significant upregulation in the expression of several genes related to angiogenesis at 6 h after sonoporation, indicating a stimulation of angiogenesis in the brain ([McMahon et al. 2017](#)). It has already been put forward that changes in expression of angiogenesis-related genes could be the result of the direct effects of inflammatory mediators ([Szade et al. 2015](#)).

Although these preclinical studies have demonstrated that microbubble-assisted ultrasound permeabilizes the BBB through the stimulation of transcellular (*e.g.*, transcytosis) and paracellular (*e.g.*, disruption of TJs) pathways, the identification of the underlying molecular and cellular mechanisms requires further *in vivo* study in both small and large animals. Indeed, even though acoustically-mediated BBB opening has been reported in large animals (pig, non-human primates), the investigations into the BBB opening mechanisms were for the most part described in small animals (mouse, rat, rabbit). In addition, current studies have focused their attention on the process of acoustically-mediated BBB opening and little on the mechanisms of BBB integrity restoration. The understanding of these mechanisms is key to the design of optimal therapeutic protocols.

Blood-tumor barrier

Tumor growth is strongly dependent on the development of a tumor vasculature that not only supplies nutrients and oxygen to the tumor, but also participates in metabolite clearance ([Kutova et al. 2019](#)). During tumor growth, pro-angiogenic factors are massively released, stimulating the chaotic growth of newly formed vessels (*i.e.*, tumor neoangiogenesis). Indeed, these immature vessels are characterized by a disordered structure (*i.e.*, tortuous shape and diameter), with no defined vessel hierarchy (*i.e.*, abnormal protrusions, blind ends and arteriovenous shunts) and no distinct vessel type (*i.e.*, arterioles, capillaries and venules). Although the

blood-tumor barrier (BTB) is more permeable than the BBB, the BTB still limits access of anti-tumor drugs to tumoral tissue ([Kutova et al. 2019](#)).

Many proofs of concept and several clinical trials have described that microbubble-assisted ultrasound improved intratumoral drug bioavailability, thus increasing drug therapeutic efficacy ([Qin et al. 2016](#)). In the next section of this report, we turn our focus on the effects of microbubble-assisted ultrasound on the BTB (*i.e.*, permeabilization, mechanisms of BTB opening). [Stieger et al. \(2007\)](#) investigated the effects of microbubble-assisted ultrasound (1 or 2.25 MHz; MI 0.5–2.4, 10 cycles, PRP 500 Hz, 5 s; phospholipid-shelled microbubbles) on the vascular endothelium, using a chorioallantoic membrane model ([Stieger et al. 2007](#)). This model is often used as chorioallantoic membrane neovessels resemble tumor neovessels. Sonoporation-induced extravasation of FITC-labelled dextrans (85 nm in diameter) and vascular consequences were monitored using intravital imaging and electron microscopy. The trans-endothelial delivery of FITC-labelled dextrans relied on their convective transport through micro-sized focal endothelial gaps with a mean fluid velocity of 188.6 $\mu\text{m}/\text{sec}$ at low MI (<1.13) and 362.5 $\mu\text{m}/\text{sec}$ at high MI (>1.13). The threshold pressure for the extravasation of the model drug was 0.5 and 1.6 MPa at 1 and 2.25 MHz, respectively. Electron microscopy indicated that microbubble-assisted ultrasound induced disseminated membrane blebs, filopodia and intracellular vacuoles in endothelial cells. These results clearly demonstrated that microbubble-assisted ultrasound increased vascular permeability, leading to nanoparticle convective extravasation. Further investigations are required to understand the roles of such membrane and intracellular events in the permeabilization and/or restoration of the BTB.

[Skachkov et al. \(2014\)](#) went on to report that targeted microbubbles can also induce permeabilization of endothelial cells *in vivo*, thereby making it possible to combine molecular imaging and drug delivery techniques ([Skachkov et al. 2014](#)). Using intravital microscopy, they studied the uptake of propidium iodide by ultrasound activation of integrin-targeted microbubbles (biotinylated lipid-coated microbubbles) in a chicken embryo model. The chicken embryo vessel walls were insonified at 1 MHz at 150 kPa (10000 cycles) and 200 kPa (1000 cycles) PNP. [Skachkov et al. \(2014\)](#) reported that endothelial cell propidium iodide uptake was observed in 48% of microbubble-vessel–wall complexes at 150 kPa and in 33% at 200 kPa. They concluded that propidium iodide uptake efficiency was dependent on the local targeted microbubble concentration. It is important to note that [Skachkov et al. \(2014\)](#) claimed that ultrasound or microbubbles alone did not induce propidium iodide uptake, suggesting that only the integrin-

targeted microbubbles were responsible for increased permeabilization. The authors did not report extravasation of red blood cells, vessel rupture or any significant differences in mean heart rate during the experiment at these low acoustic pressures. They did not, however, report propidium iodide uptake with bare microbubbles.

Bekeredjian et al. (2007) examined whether microbubble-assisted ultrasound (1.3 MHz, MI 1.6, phospholipid-shelled microbubbles) could locally increase permeability of the BTB in the rat hepatoma model, using the Evans blue (EB) drug model (Bekeredjian et al. 2007). The intratumoral concentration of EB was 5-fold higher when the tumors were exposed to microbubble-assisted ultrasound in comparison with control tumors. No tissue damage, including hemorrhage, was observed in any of the tumors. However, the exposure of tumors to ultrasound alone did not induce a significant increase in BTB permeability compared with control tumors. In addition, no significant difference in intratumoral EB concentration was observed between treated and control tumors when EB was intravenously injected after the sonoporation. In agreement with this study, Lin et al. (2012) also reported that microbubble-assisted ultrasound (1 MHz, 2 W/cm², 50% DC, BL 10 ms, PRF 50 Hz, 60 s; SonoVue microbubbles) was able to hinder tumor growth of early-stage murine colorectal tumors. However, no inhibition in tumor growth was observed with respect to medium-stage tumors (Lin et al. 2012). Nevertheless, the treatment of medium-stage tumors with microbubble-assisted ultrasound disrupted the tumor microvasculature, thus enhancing the delivery of doxorubicin-loaded PEGylated liposomes into the tumors, and, in turn, this significantly inhibited tumor growth. Moreover, Xia et al. (2009) reported that microbubble-assisted ultrasound (1 MHz, 12 mW, 20 s; Optison microbubbles) enhanced the extravasation of EB through the BTB in the rat C6 glioma model (Xia et al. 2009). Using transmission electron microscopy, a rise in the number of pinocytotic vesicles in brain microvascular endothelial cells was observed. Accordingly, the significant upregulation of caveolin-1 and caveolin-2 expressions found in this study could explain this enhanced endothelial cell endocytotic transport.

In conclusion, the tumor physiology, the treatment schedule and the presence of microbubbles together have significant effects on the efficacies of BTB permeabilization and drug delivery. However, the effective disruption of TJs were not reported. The stimulation of caveolae- and clathrin-dependent endocytosis pathways must be confirmed and demonstrated in future investigations.

Blood-muscle barrier

Only a handful of publications have reported the delivery of model drugs into skeletal muscle, using

microbubble-assisted ultrasound and the molecular and cellular mechanisms. First, Price et al. (1998) investigated the interstitial delivery of fluorescent red blood cells (RBCs) and polymer microspheres (205 and 503 nm in diameter), using microbubble-assisted ultrasound (2.3 MHz, MI 0.7, 4-cycle pulse delivered over 0.1 ms; Optison microbubbles) in rat spinotrapezius skeletal muscle (Price et al. 1998). The delivery and the dispersion of RBCs and microspheres were assessed by intravital microscopy. Price et al. (1998) reported that RBCs and microspheres were delivered into the interstitium of rat skeletal muscle through microvessel ruptures. Nevertheless, the mean microsphere dispersion area ($24.2 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ and $27.2 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ for 503-nm and 205-nm microspheres, respectively) was significantly larger than that of RBCs. The difference observed in microsphere versus RBC delivery may be explained by the effects of several factors, including interstitial tissue resistance, microvessel rupture geometry and lifetime, a potential pressure gradient across the microvessel rupture and local convective forces produced by ultrasound-driven microbubbles. This work is the first study demonstrating the potential of microbubble-assisted ultrasound to deliver drug-loaded nanoparticles, as well as engineered cells, across the endothelial lining of a target tissue.

Song et al. (2002) studied the influence of ultrasound pulse interval (1 MHz, PNP 0.75 MPa, pulse interval of 1, 3, 5 and 10 s; Optison microbubbles), microbubble administration route (arterial or venous injection) and microvascular pressure on the delivery of 100-nm microspheres in rat spinotrapezius muscle. Here, the authors reported the formation of microvessel ruptures, and the extravasation of microspheres were greatest when the ultrasound pulse interval was 5 or 10 s rather than 1 or 3 s. However, the administration route had no influence on the microspheres. In addition, the increased arterial microvascular pressure significantly enhanced the delivery of microspheres into the skeletal muscle without a concomitant increase in the number of microvessel ruptures. Although both studies (Price et al. 1998; Song et al. 2002) illustrated the delivery of microspheres and cells through the BMB, using microbubble-assisted ultrasound, little is known about the permeabilization kinetics in skeletal muscle. Sanches et al. (2013) explored this scientific question by assessing the extravasation of ¹¹¹In-labeled bovine serum albumin (¹¹¹In-labelled BSA) as a model macromolecular drug in skeletal muscle, using post-sonoporation positron emission tomography imaging (1.2 MHz, PNP 2 MPa, 10,000 cycles, 10 min; polymer-shelled microbubbles). In concordance with former studies, the exposure of skeletal muscle to microbubble-assisted ultrasound induced the extravasation of ¹¹¹In-labelled BSA compared with ultrasound exposure alone. The extent of ¹¹¹In-labelled

BSA extravasation decreased exponentially with increasing post-sonoporation time. The half-life of this extravasation was approximately 21 min.

Overall, these results demonstrated that microbubble-assisted ultrasound leads to the trans-endothelial delivery of cells and microspheres through the formation of microvessel ruptures. The efficacy of this method is strongly dependent on the ultrasound settings, microvascular pressure and exogenous compound nature and molecular size (Song *et al.* 2002; Sanches *et al.* 2013). Indeed, resistance to extravasation is determined by the hydraulic resistance at the site of endothelial rupture, by the size of the rupture with respect to drug size (free or drug-loaded nanoparticles), by the geometric configuration of the extracellular space and by the physicochemical properties of drugs (Song *et al.* 2002). Given that the skeletal muscle may be used as a factory for the production of therapeutic proteins, future research interests should consider the mechanisms underlying therapeutic gene delivery into skeletal muscle, using microbubble-assisted ultrasound.

Other endothelial barriers

Blood-retinal barrier. The delivery of therapeutic molecules to the retina from the peripheral circulation is limited by the low membrane permeability of the blood-retinal barrier (BRB), formed by complex TJs of the endothelium of retinal blood vessels and the retinal pigment epithelium (Bleeker *et al.* 1968; Cunha-Vaz 2004). In 2012, Park *et al.* investigated whether microbubble-assisted ultrasound (0.69 MHz, PNP 0.81–1.1 MPa, BL 10 ms, PRF 1 Hz, 60 s; Definity microbubbles) could permeabilize the BRB. The BRB opening was monitored using a magnetic resonance imaging contrast agent (Magnevist). Extravasation of magnetic resonance imaging contrast agent into the vitreous humor increased near acoustic pressure-targeted regions. In addition, BRB opening was not detected 3 h after sonoporation at 0.81 MPa, thus suggesting the molecular extravasation time window was less than 3 h. The post-sonoporation histologic analyses revealed the presence of petechia in the eyes exposed to microbubble-assisted ultrasound at 0.81 MPa and 0.88 MP; whereas the retinal tissue was severely damaged at 1.1 MPa. Even if this study did not describe the molecular and cellular mechanisms of drug extravasation, it clearly demonstrated that microbubble-assisted ultrasound could provide an innovative and non-invasive approach for the targeted delivery of drugs to the retina.

Blood-prostate barrier. Li *et al.* (2012) explored the effect of microbubble-assisted ultrasound (1 MHz, 1 MPa, 0.375% DC, 12s; phospholipid-shelled microbubbles)

on the blood-prostate barrier (BPB) in rabbits, using EB as a tracer (Li *et al.* 2012). The concentration of EB was significantly higher in prostate tissue exposed to microbubble-assisted ultrasound in comparison with control prostates (without treatment, microbubble injection alone or ultrasound treatment alone). Furthermore, histologic analysis revealed an epithelial cell disorganization, loss of interstitial structure and greater fibrous stroma thickness in the sonoporated prostates. In agreement with these observations, transmission electron microscopy images demonstrated opening gap junctions, the presence of dense lysosomes and secretory granules, as well as mitochondrial swelling. All these ultrastructural changes were absent in control groups. Of note, the authors reported an upregulation of connexin-43 (a gap junction protein) in the sonoporated prostates, possibly participating in the restoration of intercellular connections and BPB functions after sonoporation. Even if the authors did not provide clear evidence of disruption of TJs in endothelial cells, given they focused their attention on epithelial tissue, they demonstrated for the first time that microbubble-assisted ultrasound increased BPB permeability. Liu *et al.* (2013) consolidated these observations by assessing acoustically-mediated BPB permeabilization (0.81 MHz, 2.4 MPa, 0.375% DC; phospholipid-shelled microbubbles) in rabbits, using EB and lanthanum nitrate as tracers (Liu *et al.* 2013). Indeed, both tracers were highly dispersed in the intercellular space of the extravascular stroma and the glandular epithelium of prostates exposed to microbubble-assisted ultrasound in comparison with control prostates (ultrasound treatment alone). Moreover, the disruption of TJs between vascular endothelial cells was only detected in the transmission electron microscopy images of sonoporated prostates. These vascular changes were not detected 24 h after sonoporation, thus indicating that the microbubble-assisted ultrasound can transiently permeabilize the BPB. We can expect these studies to be further confirmed in future preclinical studies. Otherwise, the mechanisms underlying BPB permeabilization and subsequent restoration still need to be thoroughly investigated.

Changes in vascular dynamics

The interaction of oscillating microbubbles with the vascular endothelium has been reported to result in endothelial permeabilization, but also in changes in hemodynamics.

Microbubble/vessel interaction without ultrasound. Systemically administered microbubbles continue flowing as single microbubbles regardless of vessel nature (i.e., artery or vein), but microbubble flow duration depends on microbubble half-life (i.e., the longer

the half-life, the longer the flow duration). Under a certain size (less than 15 μm), microbubbles do not affect vascular hemodynamics in various perfused tissues (Kono et al. 2002; Braide et al. 2006; Schneider et al. 2012). Braide et al. (2006) investigated the behavior of phospholipid-shelled microbubbles (SonoZoid) in rat microvascularization, using intravital imaging. They reported that these microbubbles did not alter microvascular flow and did not plug microvessels. In addition, these microbubbles did not impair structural integrity or macromolecular retention. Schneider et al. (2012) confirmed these results on the microcirculation of various rodent tissues, using the same experimental strategy. They described that untargeted (SonoVue, BR14) and targeted (BR55) phospholipid-shelled microbubbles did not impair microvascular perfusion. Together, these results demonstrate that microbubbles on their own do not influence vascular structure or functions.

Microbubble/vessel interaction with ultrasound.

The behavior of oscillating microbubbles on the vascular structure, functions and hemodynamics was mainly analyzed using high-speed photomicrography and/or recording coupled with intravital imaging. Indeed, Caskey et al. (2007) reported that the exposure of microbubbles to short-pulsed ultrasound (1 MHz, 2 pulses, 0.8 or 2.0 MPa PNP; home-made phospholipid-shelled microbubbles) led to a significant decrease in microbubble expansion in small vessels (18 μm in mean diameter). Because of this decreased microbubble oscillation, the microbubble/endothelium interaction only occurred at higher acoustic pressure, otherwise a large resting microbubble formed because of microbubble fusion. In addition, this interaction was only observed during the asymmetric collapse of microbubbles and never during their expansion. Chen et al. (2011) went on to investigate the translational dynamics of individual Definity microbubbles (1 MHz, 1 cycle, 0.8–4 MPa PNP) in microvessels of ex vivo rat mesenteries, using real-time and high-speed photomicrography. Upon ultrasound exposure, the microbubble/endothelium interaction resulted in microbubble translation up until 20- μm away from the nearest vascular endothelium. The formation of microjets directed away from the nearest vascular endothelium was also described.

Using the same experimental approach, Chen et al. (2012a) described an invagination of one vessel wall side attributable to microbubble growth reaching a maximum of 2 μm , and the subsequent collapse of the coalesced microbubbles induced an invagination of both vessel wall sides. Histologic analysis of vessels revealed the presence of vascular damage when the vessel invagination reached more than 50% of the initial vessel radius. These vessel invaginations were on the same

microsecond timescale as microbubble oscillations (Chen et al. 2012b). Wood et al. (2012) confirmed that the exposure of rat dorsal aortas to microbubble-assisted ultrasound (2 MHz, MI 1.9, 4 cycle burst, 1 kHz PRF, 30 s; Optison microbubbles) altered arterial integrity and caused vascular injury. These vascular damages prevented vasoconstriction and vasodilation in response to phenylephrine and acetylcholine respectively. Moreover, Christiansen et al. (2003) investigated the efficacy of gene delivery by microbubble-assisted ultrasound in rat hindlimb skeletal muscle after intra-articular (i.a.) or i.v. injection of plasmid-loaded microbubbles (1.75 MHz, MI 1.9, pulsing interval of 7 s, exposure time of 15 min; phospholipid-shelled cationic microbubbles). Reporter gene expression in the target tissue was 200-fold higher with i.a. versus i.v. injection of microbubbles. These results were positively correlated with the perivascular deposition of fluorescent-labelled plasmids, which was 2-fold higher for i.a. compared with i.v. injection administration. The efficacy of plasmid deposition was in turn strongly associated with focal vascular injuries that were greater for i.a. injection. Christiansen et al. (2003) hypothesized that these differences were likely related to the acoustic effects of large microbubbles, which having penetrated the vascular bed *via* the i.a. administration route, stayed in the tissue microvasculature. This did not occur with i.v. administration attributable to pulmonary filtering.

These studies have provided key information on microbubble/vessel interactions after ultrasound exposure, which provide insights into improvements for the design of acoustically-mediated drug delivery using microbubbles. However, the studies discussed thus far in this report have been limited to both tissues (*i.e.*, cecum, mesenteric tissues) either from small animals (*i.e.*, rats) or *ex vivo*. These results need confirming on other perfused tissues in small and large animals, using intravital confocal imaging.

Effects of microbubble-assisted ultrasound on blood perfusion

Many preclinical studies investigated the influence of oscillating microbubbles on the blood flow in various tissues (liver, brain, tumors *etc.*), using contrast-enhanced ultrasound (CEUS) or intravital imaging.

Liver tissue. Gao et al. (2012) reported the effects of microbubble-assisted ultrasound on liver blood perfusion at high acoustic pressure (1.22 MHz, pulse length of 500 cycles, PRF 10 Hz, PNP 4.6 MPa; phospholipid-shelled microbubbles), using CEUS (Gao et al. 2012). The exposure of rabbit liver tissue to these acoustic conditions led to a transient decrease in liver tissue perfusion. Indeed, the liver perfusion was gradually recovered

during a 60-min period. Anatomopathologic examination of the liver tissue revealed a positive correlation between liver perfusion decrease and acoustically-mediated acute microvascular injury of the liver (microvascular rupture, hemorrhage, etc.). Keravnou *et al.* (2016) confirmed these results, using *ex vivo* perfusion of pig livers combined with CEUS. They described the effects of PNP (1.7–4 MPa) and number of cycles (20 or 1000 cycles) on perfusion of pig livers (1 MHz, 8% DC, 5 s on and 5 s off for 15 min; Definity microbubbles). The exposure of pig liver tissue to PNP above 1.7 MPa induced an irreversible tissue perfusion alteration. Whole liver-tissue devascularization was detected when treated with higher acoustic pressures (4 MPa). At the same PNP, longer pulses (1000 cycles) resulted in much greater perfusion changes than with shorter acoustic pulses (20 cycles). It would be interesting to validate these results in animal models of liver disease (liver fibrosis, tumors, etc.) to investigate the influence of pathologic liver tissues on these hemodynamic changes and on the acoustically-mediated permeabilization of liver vessels.

Brain tissue. Using multiphoton intravital imaging, Raymond *et al.* (2007) monitored the hemodynamic effects of microbubble-assisted ultrasound on brain tissue in healthy mice (1.029 MHz, 1 Hz PRF, 10-ms burst, peak focal pressure of 0.2 MPa, 45–60 s; Optison microbubbles). They claimed that microbubble-assisted ultrasound induced a transient vasomotor response and a reversible BBB opening; however, the brain vasculature was not affected by the ultrasound or microbubbles. This vasomotor response resulted in an initial vasoconstriction, causing a significant decrease in vessel diameter (60% on average) followed by a recovery step (21s–615 s). The broad recovery step timing could be explained by a variable intravascular delivery of microbubbles. The vasoconstriction occurred in both primary arteries (>50 μm) and late arterioles (10–20 μm), and no vein or capillary constriction was detected. The vasoconstriction was in majority along the entire vessel length but was prominently greater at focal regions. This vasoconstriction induced a significant but transient decrease in intracerebral blood flow (5 min). In agreement with earlier studies (Sheikov *et al.* 2004), Raymond *et al.* (2007) suggest that vasoconstriction could contribute to BBB opening by altering cerebral blood flow.

Tumor tissue. Hu *et al.* (2012) investigated the effects of the combination of ultrasound (5 MHz, 2 or 4 MPa PNP, 8.1-ms pulse repetition period, pulse length of 6 cycles for 900 s) with targeted microbubbles (Vivistar integrin cyclic-RGD microbubbles) on the microvasculature of a murine mammary tumor model. The exposure of tumors to PNP of 2 MPa, after the binding

of targeted microbubbles onto the endothelial wall, induced a 28% decrease in blood flow. This blood flow change persisted for 30 min after the ultrasound exposure. At PNP of 4 MPa, the blood flow was reduced by 71%. The histologic examination of tumoral tissues revealed vessel dilation and enhanced extravasation of FITC-dextran, suggesting that the oscillating and collapsing microbubbles mechanically disrupted the tumor vessel endothelium. In accordance with earlier studies (Hwang *et al.* 2005, 2006), Hu *et al.* (2012) hypothesized that the endothelial damage, specifically the exposure of the basement membrane, could induce platelet activation and aggregation, potentially playing a key role in blood flow alteration. To validate their hypothesis, the authors pre-injected an anti-CD41 antibody to block potential thrombogenic effects before the exposure of the tumoral tissue to microbubble-assisted ultrasound (same murine mammary tumor model as discussed earlier in this report). The data demonstrated that this treatment hindered the reduction of blood flow, suggesting that platelet activation was one of the factors responsible for blood flow reduction.

Later, Rix *et al.* (2014) investigated the influence of multiple injections of non-targeted microbubbles (SonoVue) and vascular endothelial growth factor receptor 2-targeted contrast agents (MicroMarker) on time to peak (TTP) and peak enhancement (PE) in human epidermoid carcinoma xenografts in mice. They reported a significant decrease in TTP values and a slight, but insignificant, increase in PE values in tumoral tissue during subsequent injections of non-targeted microbubbles, resulting in a significant and fast wash-in effect of these microbubbles into the tumor. The monitoring of heat rate over the entire imaging procedure revealed that this physiologic parameter increased during repeated injection. A higher heart rate is consistent with a faster blood circulation, which may induce a faster wash-in of non-targeted microbubbles into the tumor tissue, thus explaining a significant decrease in TTP value after repeated injections. In addition, the enhanced heart rate and reduced TTP value could lead to a concentrated non-targeted microbubble bolus, which may explain the tendency for increased PE values. Finally, Rix *et al.* (2014) described that multiple injections of vascular endothelial growth factor receptor 2-targeted microbubbles resulted in enhanced accumulation on the tumor endothelium. Both a positive and significant correlation between PE value and signal intensity of bound microbubbles was reported. These results may be explained by exposure of additional target sites on the endothelial wall caused by the mechanical forces generated from the oscillation and destruction of microbubbles.

In conclusion, the bioeffects of oscillating microbubbles on the vascular structure, functions and

hemodynamics are strongly dependent on the physiologic properties of vessels (*i.e.*, type, elasticity, diameter of vessels *etc.*), the physicochemical properties of microbubbles (*i.e.*, shell composition, size, gas, *etc.*) and the acoustic parameters (*i.e.*, center frequency, acoustic pressure, *etc.*).

Muscle tissue. Recently, studies have shown that microbubble-assisted ultrasound increases hindlimb skeletal muscle perfusion and reverses tissue ischemia in mice and patients (Belcik et al. 2015, 2017). Indeed, Belcik et al. (2015) reported that the exposure of mouse hindlimb to ultrasound (1.3 MHz, PRF 9.3 kHz, MI 0.6 or 1.3 for 10 min) induced a 2-fold increase in muscle perfusion compared with the control group (*i.e.*, without ultrasound) regardless of the MI. Microbubble-assisted ultrasound (lab-made phospholipid-shelled microbubbles) led to a 3- and 10-fold increase in muscle perfusion at MI values of 0.6 and 1.3, respectively, compared with control groups (Belcik et al. 2015). To investigate the biochemical mediators involved in this biologic process, Belcik et al. (2015) administered various inhibitors of well-known mediators known to play a role in endothelial physiology. Accordingly, the inhibition of endothelial nitric oxide synthase significantly decreased the enhanced muscle perfusion produced by microbubble-assisted ultrasound (*i.e.*, 70%). This result was confirmed by the increase in muscle nitric oxide production and endothelial nitric oxide synthase activity measured after the exposure of muscle tissue to microbubble-assisted ultrasound. In 2017, Belcik et al. confirmed these results (1.3 MHz, PRF 9.3 kHz, MI 0.6 or 1.3 for 10 min; lab-made phospholipid-shelled microbubbles) and reported that acoustically enhanced muscle perfusion relies on shear-dependent production of ATP and activation of purinergic signaling pathways. Using a murine model of peripheral artery disease, Belcik et al. (2015) demonstrated that microbubble-assisted ultrasound at MI 1.3 resulted in a 2-fold increase in tissue perfusion compared with the control ischemic hindlimb. Tissue ischemia was reversed for up to 24 h without tissue damage. Using Definity microbubbles, the authors reported that microbubble-assisted ultrasound induced a 2-fold increase in muscle perfusion in patients with sickle cell disease (Belick et al. 2017) and peripheral artery disease (Mason et al. 2020), thus demonstrating the therapeutic potential of this ultrasound technology.

CONCLUSIONS

Currently available data on microbubble-assisted ultrasound clearly demonstrate that the permeabilization of the endothelial barrier, which is required for drug extravasation, is key to acoustically-mediated drug

delivery. Thus, these data confirm that the endothelial cells and tissues are the first target of microbubble-assisted ultrasound. A growing number of *in vivo* investigations have described that the bioeffects of oscillating and collapsing microbubbles on the vascular structure and functions are dependent on the acoustic parameters, the physicochemical properties of microbubbles and the physiologic properties of vessels. However, the design of therapeutic protocols for a rational use of this method in clinics requires the following: (i) the study of the spatiotemporal dynamics of endothelial barrier permeabilization and recovery, (ii) the identification of the molecular and cellular actors involved in both biologic processes and (iii) the vascular consequences at short, medium and long terms. These further investigations need to be performed on small, but also on large, animal disease models. Overall, microbubble-assisted ultrasound could become a clinically approved technology to improve the efficacy of treatments for many prevalent and costly diseases.

FUNDING/SUPPORT

This work was supported by the Inserm Collaboration Agreement - Therasound.

Conflict of Interest disclosure—The authors have no conflicts of interest to disclose.

REFERENCES

- Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 2006;7:41–53.
- Abraham A, Meng Y, Llinas M, Huang Y, Hamani C, Mainprize T, Aubert I, Heyn C, Black SE, Hynynen K, Lipsman N, Zinman L. First-in-human trial of blood-brain barrier opening in amyotrophic lateral sclerosis using MR-guided focused ultrasound. *Nat Commun* 2019;10:4373.
- Apfel RE, Holland CK. Gauging the likelihood of cavitation from short-pulse, low-duty cycle diagnostic ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 1991;17:179–185.
- Bekeredjian R, Kroll RD, Fein E, Tinkov S, Coester C, Winter G, Katus HA, Kulaksiz H. Ultrasound targeted microbubble destruction increases capillary permeability in hepatomas. *Ultrasound Med Biol* 2007;33:1592–1598.
- Belcik JT, Davidson BP, Xie A, Wu MD, Yadava M, Qi Y, Liang S, Chon CR, Ammi AY, Field J, Harmann L, Chilian WM, Linden J, Lindner JR. Augmentation of muscle blood flow by ultrasound cavitation is mediated by ATP and purinergic signaling. *Circulation* 2017;135:1240–1252.
- Belcik JT, Mott BH, Xie A, Zhao Y, Kim S, Lindner NJ, Ammi A, Linden JM, Lindner JR. Augmentation of limb perfusion and reversal of tissue ischemia produced by ultrasound-mediated microbubble cavitation. *Circ Cardiovasc Imaging* 2015;8. doi: 10.1161/CIRCIMAGING.114.002979.
- Bleeker GM, van Haeringen NJ, Maas ER, Glasius E. Selective properties of the vitreous barrier. *Exp Eye Res* 1968;7:37–46.
- Boitano C, Dirksen E, Sanderson M. Intercellular propagation of calcium waves mediated by inositol trisphosphate. *Science* 1992;258:292–295.
- Braide M, Rasmussen H, Albrektsson A, Bagge U. Microvascular behavior and effects of sonazoid microbubbles in the cremaster muscle of rats after local administration. *J. Ultrasound Med* 2006;25:885–890.

- Carpentier A, Canney M, Vignot A, Reina V, Beccaria K, Horodyckid C, Karachi C, Leclercq D, Lafon C, Chapelon JY, Capelle L, Cornu P, Sanson M, Hoang-Xuan K, Delattre JY, Idhah A. Clinical trial of blood-brain barrier disruption by pulsed ultrasound. *Sci Transl Med* 2016;8:343re2.
- Caskey CF, Stieger SM, Qin S, Dayton PA, Ferrara KW. Direct observations of ultrasound microbubble contrast agent interaction with the microvessel wall. *J Acoust Soc Am* 2007;122:1191–1200.
- Castle J, Feinstein SB. Drug and gene delivery using sonoporation for cardiovascular disease. *Adv Exp Med Biol* 2016;880:331–338.
- Chai WY, Chu PC, Tsai CH, Lin CY, Yang HW, Lai HY, Liu HL. Image-guided focused-ultrasound CNS molecular delivery: An implementation via dynamic contrast-enhanced magnetic-resonance imaging. *Sci Rep* 2018;8:4151.
- Chen H, Brayman AA, Evan AP, Matula TJ. Preliminary observations on the spatial correlation between short-burst microbubble oscillations and vascular bioeffects. *Ultrasound Med Biol* 2012a;38:2151–2162.
- Chen H, Brayman AA, Kreider W, Bailey MR, Matula TJ. Observations of translation and jetting of ultrasound-activated microbubbles in mesenteric microvessels. *Ultrasound Med Biol* 2011;37:2139–2148.
- Chen H, Brayman AA, Matula TJ. Characteristic microvessel relaxation timescales associated with ultrasound-activated microbubbles. *Appl Phys Lett* 2012b;101:163704.
- Chen Q, Wang Q, Zhu J, Xiao Q, Zhang L. Reactive oxygen species: Key regulators in vascular health and diseases. *Br J Pharmacol* 2018;175:1279–1292.
- Cheng YC, (ed). *Biology and regulation of blood-tissue barriers*. New York: Springer-Verlag Inc; 2013.
- Chertok B, Langer R. Circulating magnetic microbubbles for localized real-time control of drug delivery by ultrasonography-guided magnetic targeting and ultrasound. *Theranostics* 2018;8:341–357.
- Christiansen JP, French BA, Klivanov AL, Kaul S, J.R. L. Targeted tissue transfection with ultrasound destruction of plasmid-bearing cationic microbubbles. *Ultrasound Med Biol* 2003;29:1759–1767.
- Cucullo L, Marchi N, Marroni M, Fazio V, Namura S, Janigro D. Blood-brain barrier damage induces release of alpha2-macroglobulin. *Mol Cell Proteomics* 2003;2:234–241.
- Cunha-Vaz JG. The blood-retinal barriers system. Basic concepts and clinical evaluation. *Exp Eye Res* 2004;78:715–721.
- Deng J, Huang Q, Wang F, Liu Y, Wang Z, Wang Z, Zhang Q, Lei B, Cheng Y. The role of caveolin-1 in blood-brain barrier disruption induced by focused ultrasound combined with microbubbles. *J Mol Neurosci* 2012;46:677–687.
- Di L, Kerns EH, (eds). *Blood-brain barrier in drug discovery: Optimizing brain exposure of CNS drugs and minimizing brain side effects for peripheral drugs*. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2015.
- Dietrich CF, Averkiou M, Nielsen MB, Barr RG, Burns PN, Calliada F, Cantisani V, Choi B, Chammas MC, Clevert DA, Claudon M, Correas JM, Cui XW, Cosgrove D, D'Onofrio M, Dong Y, Eisenbrey J, Fontanilla T, Gilja OH, Ignee A, Janssen C, Kono Y, Kudo M, Lassau N, Lyshchik A, Franca Meloni M, Moriyasu F, Nolsoe C, Piscaglia F, Radzina M, Saftoiu A, Sidhu PS, Sporea I, Schreiber-Dietrich D, Sirlin CB, Stanczak M, Weskott HP, Wilson SR, Willmann JK, Kim TK, Jang HJ, Vezeridis A, Westerway S. How to perform contrast-enhanced ultrasound (CEUS). *Ultrasound Int Open* 2018;4:E2–E15.
- Dimcevski G, Kotopoulos S, Bjanec T, Hoem D, Schjott J, Gjertsen BT, Biermann M, Molven A, Sorbye H, McCormack E, Postema M, Gilja OH. A human clinical trial using ultrasound and microbubbles to enhance gemcitabine treatment of inoperable pancreatic cancer. *J Control Release* 2016;243:172–181.
- Doinikov AA, Bouakaz A. Acoustic microstreaming around a gas bubble. *J Acoust Soc Am* 2010a;127:703–709.
- Doinikov AA, Bouakaz A. Theoretical investigation of shear stress generated by a contrast microbubble on the cell membrane as a mechanism of sonoporation. *J Acoust Soc Am* 2010b;128:11–19.
- Erlichman DB, Weiss A, Koenigsberg M, Stein MW. Contrast enhanced ultrasound: A review of radiology applications. *Clin Imaging* 2019;60:209–215.
- Escoffre JM, Bouakaz A, (eds). *Therapeutic ultrasound*. New York: Springer International Publishing AG; 2016.
- Escoffre JM, Bouakaz A. Mini-review—Biophysical mechanisms of cell membrane sonoporation: Knowns and unknowns. *Langmuir* 2019;35:10151–10165.
- Frank PG, Woodman SE, Park DS, Lisanti MP. Caveolin, caveolae, and endothelial cell function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1161–1168.
- Gao Y, Gao S, Zhao B, Zhao Y, Hua X, Tan K, Liu Z. Vascular effects of microbubble-enhanced, pulsed, focused ultrasound on liver blood perfusion. *Ultrasound Med Biol* 2012;38:91–98.
- Guvener N, Appold L, de Lorenzi F, Golombek SK, Rizzo LY, Lammers T, Kiessling F. Recent advances in ultrasound-based diagnosis and therapy with micro- and nanometer-sized formulations. *Methods* 2017;130:4–13.
- Hallow DM, Mahajan AD, Prausnitz MR. Ultrasonically targeted delivery into endothelial and smooth muscle cells in *ex vivo* arteries. *J Control Release* 2007;118:285–293.
- Helfield B, Chen X, Watkins SC, Villanueva FS. Biophysical insight into mechanisms of sonoporation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016;113:9983–9989.
- Hu X, Kheirloom A, Mahakian LM, Beegle JR, Kruse DE, Lam KS, Ferrara KW. Insonation of targeted microbubbles produces regions of reduced blood flow within tumor vasculature. *Invest Radiol* 2012;47:398–405.
- Hwang JH, Brayman AA, Reidy MA, Matula TJ, Kimmey MB, Crum LA. Vascular effects induced by combined 1-MHz ultrasound and microbubble contrast agent treatments *in vivo*. *Ultrasound Med Biol* 2005;31:553–564.
- Hwang JH, Tu J, Brayman AA, Matula TJ, Crum LA. Correlation between inertial cavitation dose and endothelial cell damage *in vivo*. *Ultrasound Med Biol* 2006;32:1611–1619.
- Jordão JF, Thévenot E, Markham-Coultes K, Scarcelli T, Weng YQ, Xhima K, O'Reilly M, Huang Y, McLaurin J, Hynynen K, Aubert I. Amyloid- β plaque reduction, endogenous antibody delivery and glial activation by brain-targeted, transcranial focused ultrasound. *Exp Neurol* 2013;248:16–29.
- Juang EK, De Cock I, Keravnou C, Gallagher MK, Keller SB, Zheng Y, Averkiou M. Engineered 3D microvascular networks for the study of ultrasound-microbubble-mediated drug delivery. *Langmuir* 2019;35:10128–10138.
- Juffermans LJM, Kamp O, Dijkman PA, Visser CA, Musters RJ. Low-intensity ultrasound-exposed microbubbles provoke local hyperpolarization of the cell membrane via activation of BK(Ca) channels. *Ultrasound Med Biol* 2008;34:502–508.
- Juffermans LJM, Meijering BDM, Henning RH, Deelman LE. Ultrasound and microbubble-targeted delivery of small interfering RNA into primary endothelial cells is more effective than delivery of plasmid DNA. *Ultrasound Med Biol* 2014;40:532–540.
- Juffermans LJM, van Dijk A, Jongenelen CAM, Drukarch B, Reijkerk A, de Vrees HE, Kamp O, Musters RJP. Ultrasound and microbubble-induced intra- and intercellular bioeffects in primary endothelial cells. *Ultrasound Med Biol* 2009;35:1917–1927.
- Keravnou CP, De Cock I, Lentacker I, Izamis ML, Averkiou MA. Microvascular injury and perfusion changes induced by ultrasound and microbubbles in a machine-perfused pig liver. *Ultrasound Med Biol* 2016;42:2676–2686.
- Kodama T, Tomita Y, Koshiyama K, Blomley MJ. Transfection effect of microbubbles on cells in superposed ultrasound waves and behavior of cavitation bubble. *Ultrasound Med Biol* 2006;32:905–914.
- Kolosnjaj-Tabi J, Gibot L, Fourquaux I, Golzio M, Rols MP. Electric field-responsive nanoparticles and electric fields: Physical, chemical, biological mechanisms and therapeutic prospects. *Adv Drug Deliv Rev* 2018;138:56–67.
- Kono Y, Steinbach GC, Peterson T, Schmid-Schonbein GW, Mattrey RF. Mechanism of parenchymal enhancement of the liver with a microbubble-based US contrast medium: An intravital microscopy study in rats. *Radiology* 2002;224:253–257.
- Kooiman K, Emmer M, Foppen-Harteveld M, van Wamel A, de Jong N. Increasing the endothelial layer permeability through

- ultrasound-activated microbubbles. *IEEE Trans Biomed Eng* 2010;57:29–32.
- Kooiman K, Foppen-Harteveld M, van der Steen AFW, de Jong N. Sonoporation of endothelial cells by vibrating targeted microbubbles. *J Control Release* 2011;154:35–41.
- Kooiman K, van der Steen AF, de Jong N. Role of intracellular calcium and reactive oxygen species in microbubble-mediated alterations of endothelial layer permeability. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control* 2013;60:1811–1815.
- Kooiman K, Vos HJ, Versluis M, de Jong N. Acoustic behavior of microbubbles and implications for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2014;72:28–48.
- Kotopoulos S, Dimcevski G, Gilja OH, Hoem D, Postema M. Treatment of human pancreatic cancer using combined ultrasound, microbubbles, and gemcitabine: A clinical case study. *Med Phys* 2013;40:072902.
- Kou L, Bhutia YD, Yao Q, He Z, Sun J, Ganapathy V. Transporter-guided delivery of nanoparticles to improve drug permeation across cellular barriers and drug exposure to selective cell types. *Front Pharmacol* 2018;9:27.
- Kudo N, Okada K, Yamamoto K. Sonoporation by single-shot pulsed ultrasound with microbubbles adjacent to cells. *Biophys J* 2009;96:4866–4876.
- Kutova OM, Guryev EL, Sokolova EA, Alzeibak R, Balalaeva IV. Targeted delivery to tumors: Multidirectional strategies to improve treatment efficiency. *Cancer (Basel)* 2019;11:68.
- Lammertink BH, Bos C, Deckers R, Storm G, Moonen CT, Escoffre JM. Sonochemotherapy: From bench to bedside. *Front Pharmacol* 2015;6:138.
- Leinenga G, Götz J. Scanning ultrasound removes amyloid- β and restores memory in an Alzheimer's disease mouse model. *Sci Transl Med* 2015;7:278ra33.
- Lélu S, Afadzi M, Berg S, Aslund AKO, Torp SH, Sattler W, Davies CL. Primary porcine brain endothelial cells as *in vitro* model to study effects of ultrasound and microbubbles on blood-brain barrier function. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control* 2017;64:281–290.
- Leung KS, Chen X, Zhong W, Yu AC, Lee CY. Microbubble-mediated sonoporation amplified lipid peroxidation of Jurkat cells. *Chem Phys Lipids* 2014;180:53–60.
- Li T, Liu G, Li J, Wang X, Liu Q, Liu Z, Du W. Mechanisms of prostate permeability triggered by microbubble-mediated acoustic cavitation. *Cell Biochem Biophys* 2012;64:147–153.
- Lin CY, Tseng HC, Shiu HR, Wu MF, Chou CY, Lin WL. Ultrasound sonication with microbubbles disrupts blood vessels and enhances tumor treatments of anticancer nanodrug. *Int J Nanomedicine* 2012;7:2143–2152.
- Liu Y, Yi S, Zhang J, Fang Z, Zhou F, Jia W, Liu Z, Ye G. Effect of microbubble-enhanced ultrasound on prostate permeability: A potential therapeutic method for prostate disease. *Urology* 2013;81:921e1–927e1.
- Mainprize T, Lipsman N, Huang Y, Meng Y, Bethune A, Ironside S, Heyn C, Alkins R, Trudeau M, Sahgal A, Perry J, Hynynen K. Blood-brain barrier opening in primary brain tumors with non-invasive MR-guided focused ultrasound: A clinical safety and feasibility study. *Sci Rep* 2019;9:321.
- Marty B, Larrat B, Van Landeghem M, Robic C, Robert P, Port M, Le Bihan D, Pémot M, Tanter M, Lethimonnier F, Mériaux S. Dynamic study of blood-brain barrier closure after its disruption using ultrasound: A quantitative analysis. *J Cereb Blood Flow Metab* 2012;32:1948–1958.
- Mason OR, Davidson BP, Sheeran P, Muller M, Hodovan JM, Sutton J, Powers J, Lindner JR. Augmentation of tissue perfusion in patients with peripheral artery disease using microbubble cavitation. *JACC Cardiovasc Imaging* 2020;13:641–651.
- McMahon D, Bendayan R, Hynynen K. Acute effects of focused ultrasound-induced increases in blood-brain barrier permeability on rat microvascular transcriptome. *Sci Rep* 2017;7:45657.
- Meijering BDM, Henning RH, van Gilst WH, Gavrilovic I, van Wamel A, Deelman LE. Optimization of ultrasound and microbubbles targeted gene delivery to cultured primary endothelial cells. *J Drug Target* 2007;15:664–671.
- Meijering BDM, Juffermans LJM, van Wamel A, Henning RH, Zuhorn IS, Emmer M, Versteilen AMG, Paulus WJ, van Gilst WH, Kooiman K, de Jong N, Deelman LE, Kamp O. Ultrasound and microbubble-targeted delivery of macromolecules is regulated by induction of endocytosis and pore formation. *Circ Res* 2009;104:679–687.
- Nixdorff U, Schmidt A, Morant T, Stilianakis N, Voigt JU, Flachskampf FA, Daniel WG, Garlich CD. Dose-dependent disintegration of human endothelial monolayers by contrast echocardiography. *Life Sciences* 2005;77:1493–1501.
- Ohl CD, Arora M, Ikink R, de Jong N, Versluis M, Delius M, Lohse D. Sonoporation from jetting cavitation bubbles. *Biophys J* 2006;91:4285–4295.
- Osipchuk Y, Cahalan M. Cell-to-cell spread of calcium spreads mediated ATP receptors in mast cells. *Nature* 1992;359:241–244.
- Paefgen V, Doleschel D, Kiessling F. Evolution of contrast agents for ultrasound imaging and ultrasound-mediated drug delivery. *Front Pharmacol* 2015;6:197.
- Park J, Fan Z, Kumon RE, El-Sayed MEH, Deng CX. Modulation of intracellular Ca²⁺ concentration in brain microvascular endothelial cells *in vitro* by acoustic cavitation. *Ultrasound Med Biol* 2010;36:1176–1187.
- Park J, Zhang Y, Vykhodtseva N, Akula JD, McDannold NJ. Targeted and reversible blood-retinal barrier disruption via focused ultrasound and microbubbles. *PLoS One* 2012;7:e42754.
- Park J, Zhenzhen F, Deng CX. Effects of shear stress cultivation on cell membrane disruption and intracellular calcium concentration in sonoporation of endothelial cells. *J Biomech* 2011;44:164–169.
- Poon C, McMahon D, Hynynen K. Noninvasive and targeted delivery of therapeutics to the brain using focused ultrasound. *Neuropharmacology* 2017;120:20–37.
- Postema M, van Wamel A, ten Cate FJ, de Jong N. High-speed photography during ultrasound illustrates potential therapeutic applications of microbubbles. *Med Phys* 2005;32:3707–3711.
- Price PM, Mahmoud WE, Al-Ghamdi AA, Bronstein LM. Magnetic drug delivery: Where the field is going. *Front Chem* 2018;6:619.
- Price RJ, Skyba DA, Kaul S, Skalak TC. Delivery of colloidal particles and red blood cells to tissue through microvessel ruptures created by targeted microbubble destruction with ultrasound. *Circulation* 1998;98:1264–1267.
- Qin J, Wang TY, Willmann JK. Sonoporation: Applications for cancer therapy. *Adv Exp Med Biol* 2016;880:263–291.
- Qin P, Han T, Yu ACH, Xu L. Mechanistic understanding the bioeffects of ultrasound-driven microbubbles to enhance macromolecule delivery. *J Control Release* 2018;272:169–181.
- Qiu Y, Luo Y, Zhang Y, Cui W, Zhang D, Wu J, Zhang J, Tu J. The correlation between acoustic cavitation and sonoporation involved in ultrasound-mediated DNA transfection with polyethylenimine (PEI) *in vitro*. *J Control Release* 2010;145:40–48.
- Raymond SB, Skoch J, Hynynen K, Bacskai BJ. Multiphoton imaging of ultrasound/Optison mediated cerebrovascular effects *in vivo*. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007;27:393–403.
- Rix A, Palmowski M, Gremse F, Palmowski K, Lederle W, Kiessling F, Bzyl J. Influence of repetitive contrast agent injections on functional and molecular ultrasound measurements. *Ultrasound Med Biol* 2014;40:2468–2475.
- Roovers S, Segers T, Lajoinie G, Deprez J, Versluis M, De Smedt SC, Lentacker I. The role of ultrasound-driven microbubble dynamics in drug delivery: From microbubble fundamentals to clinical translation. *Langmuir* 2019;35:10173–10191.
- Sanches PG, Rossin R, Bohmer M, Tiemann K, Grull H. Real-time imaging and kinetics measurements of focused ultrasound-induced extravasation in skeletal muscle using SPECT/CT. *J Control Release* 2013;168:262–270.
- Sasaki N, Bos C, Escoffre JM, Storm G, Moonen CT. Development of a tumor tissue-mimicking model with endothelial cell layer and collagen gel for evaluating drug penetration. *Int J Pharmaceutics* 2015;482:118–122.

- Schneider M, Broillet A, Tardy I, Pochon S, Bussat P, Bettinger T, Helbert A, Costa M, Tranquart F. Use of intravital microscopy to study the microvascular behavior of microbubble-based ultrasound contrast agents. *Microcirculation* 2012;19:245–259.
- Sena CM, Leandro A, Azul A, Seça R, Perry G. Vascular oxidative stress: Impact and therapeutic approaches. *Front Physiol* 2018;9:1668.
- Sennoga CA, Kanbar E, Auboire L, Dujardin PA, Fouan D, Escoffre JM, Bouakaz A. Microbubble-mediated ultrasound drug-delivery and therapeutic monitoring. *Expert Opin Drug Deliv* 2017;14:1031–1043.
- Sercombe L, Veerati T, Moheimani F, Wu SY, Sood AK, Hua S. Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. *Front Pharmacol* 2015;6:286.
- Shamout FE, Pouliopoulos AN, Lee P, Bonaccorsi S, Towhidi L, Krams R, Choi JJ. Enhancement of non-invasive trans-membrane drug delivery using ultrasound and microbubbles during physiologically relevant flow. *Ultrasound Med Biol* 2015;41:2335–2448.
- Sheikov N, McDannold N, Jolesz F, Zhang YZ, Tam K, Hynynen K. Cellular mechanisms of the blood-brain barrier opening induced by ultrasound in presence of microbubbles. *Ultrasound Med Biol* 2004;30:979–989.
- Sheikov N, McDannold N, Jolesz F, Zhang YZ, Tam K, Hynynen K. Brain arterioles show more active vesicular transport of blood-borne tracer molecules than capillaries and venules after focused ultrasound-evoked opening of the blood-brain barrier. *Ultrasound Med Biol* 2006;32:1399–1409.
- Sheikov N, McDannold N, Sharma S, Hynynen K. Effect of focused ultrasound applied with an ultrasound contrast agent on the tight junctional integrity of the brain microvascular endothelium. *Ultrasound Med Biol* 2008;34:1039–1104.
- Skachkov I, Luan Y, van der Steen AF, de Jong N, Kooiman K. Targeted microbubble mediated sonoporation of endothelial cells *in vivo*. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control* 2014;61:1661–1667.
- 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* 2002;39:726–731.
- Stieger SM, Caskey CF, Adamson RH, Qin S, Curry FR, Wisner ER, Ferrara KW. Enhancement of vascular permeability with low-frequency contrast-enhanced ultrasound in the chorioallantoic membrane model. *Radiology* 2007;243:112–121.
- Suzuki R, Klivanov AL. Co-administration of microbubbles and drugs in ultrasound-assisted drug delivery: Comparison with drug-carrying particles. *Adv Exp Med Biol* 2016;880:205–220.
- Szade A, Grochot-Przeczek A, Florczyk U, Jozkowicz A, Dulak J. Cellular and molecular mechanisms of inflammation-induced angiogenesis. *IUBMB Life* 2015;67:145–159.
- Tran TA, Le Guennec JY, Bougnoux P, Tranquart F, Bouakaz A. Characterization of cell membrane response to ultrasound activated microbubbles. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control* 2008;55:43–44.
- Tran TA, Roger S, Le Guennec JY, Tranquart F, Bouakaz A. Effect of ultrasound-activated microbubbles on the cell electrophysiological properties. *Ultrasound Med Biol* 2007;33:158–163.
- van Rooij T, Skachkov I, Beekers I, Lattwein KR, Voornveld JD, Kokhuis TJA, Bera D, Luan Y, van der Steen AFW, de Jong N, Kooiman K. Viability of endothelial cells after ultrasound-mediated sonoporation: Influence of targeting, oscillation, and displacement of microbubbles. *J Control Release* 2016;238:197–211.
- van Wamel A, Bouakaz A, Versluis M, de Jong N. Micromanipulation of endothelial cells: Ultrasound-microbubble-cell interaction. *Ultrasound Med Biol* 2004;30:1255–1258.
- van Wamel A, Kooiman K, Hartevelde M, Emmer M, ten Cate FJ, Versluis M, de Jong N. Vibrating microbubbles poking individual cells: Drug transfer into cells via sonoporation. *J Control Release* 2006;112:149–155.
- VanBavel E. Effects of shear stress on endothelial cells: Possible relevance for ultrasound applications. *Prog Biophys Mol Biol* 2007;93:374–383.
- Virgintino D, Robertson D, Errede M, Benaglio V, Tauer U, Roncali L, Bertossi M. Expression of caveolin-1 in human brain microvessels. *Neuroscience* 2002;115:145–152.
- Wei DH, Zhang XL, Wang R, Zeng JF, Zhang K, Yang J, Li S, Lin XL, Jiang ZS, Wang GX, Wang Z. Oxidized lipoprotein(a) increases endothelial cell monolayer permeability via ROS generation. *Lipids* 2013;48:579–586.
- Weinberg RA. *The biology of cancer*. 2nd ed. New York: Garland Science; 2014.
- Wong-Ekkabut J, Xu Z, Triampo W, Tang IM, Tieleman DP, Monticelli L. Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: A molecular dynamics study. *Biophys J* 2007;93:4225–4236.
- Wood SC, Antony S, Brown RP, Chen J, Gordon EA, Hitchins VM, Zhang Q, Liu Y, Maruvada S, Harris GR. Effects of ultrasound and ultrasound contrast agent on vascular tissue. *Cardiovasc Ultrasound* 2012;10:29.
- Wu J. Theoretical study on shear stress generated by microstreaming surrounding contrast agents attached to living cells. *Ultrasound Med Biol* 2002;28:125–129.
- Wu J, Nyborg WL. Ultrasound, cavitation bubbles and their interaction with cells. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60:1103–1116.
- Xia CY, Zhang Z, Xue YX, Wang P, Liu YH. Mechanisms of the increase in the permeability of the blood–tumor barrier obtained by combining low-frequency ultrasound irradiation with small-dose bradykinin. *J Neurooncol* 2009;94:41–50.
- Yusko EC, Asbury CL. Force is a signal that cells cannot ignore. *Mol Biol Cell* 2017;25:3717–3725.

3. Synthèse

Cette revue fait état de nos connaissances sur la perméabilisation des cellules et des barrières endothéliales par sonoporation et les conséquences de cette dernière sur la dynamique vasculaire.

De plus, ces études *in vitro* ont mis en évidence que la sonoporation des cellules endothéliales induit plusieurs conséquences intracellulaires parmi lesquelles : l'activation de la signalisation calcique, la production d'espèces réactives de l'oxygène et la réorganisation du cytosquelette. Ces différents processus biologiques participent de manière directe ou indirecte à la perméabilisation des cellules et des barrières endothéliales *in vitro*. En effet, les travaux *in vitro* ont fait état de la **formation transitoire de pores membranaires** à la surface de la membrane plasmique des cellules endothéliales après sonoporation, augmentant de ce fait leur perméabilité aux molécules non perméantes. Cette méthode stimule également les **voies d'endocytose** dépendantes des clathrines et cavéolines, de la **transcytose**, mais aussi de la **macropinocytose**, permettant ainsi la délivrance de molécules de haut poids moléculaire et de nanoparticules. La sonoporation induit une **déstabilisation réversible des jonctions serrées**, qui abaissent la résistance transendothéliale, facilitant ainsi le passage intercellulaire de macromolécules.

Les études *in vivo* ont confirmé partiellement les observations *in vitro*. En effet, la sonoporation augmente le passage paracellulaire de molécules exogènes (*e.g.*, bleu d'Evans, dextrans fluorescents, nanoparticules *etc.*) par **déstabilisation des jonctions serrées** (*i.e.*, claudine 5 et ZO-1). Cette méthode stimule également des voies de transports intracellulaires telles que l'**endocytose** dépendante des cavéolines mais aussi transcellulaires tels que la **transcytose** ou encore la **formation de canaux cytoplasmiques**. Ces travaux ont mis en évidence que l'induction d'une ou de plusieurs de ces voies de transport sont dépendantes des propriétés physico-chimiques et pharmacologiques des molécules utilisées pour les explorer et des protocoles ultrasonores utilisés (*i.e.*, paramètres ultrasonores et paramètres liés aux microbulles). Si la majorité des études mécanistiques *in vivo* a été réalisée sur la BHE, de nombreuses études ont démontré que la sonoporation augmente la perméabilité native des barrières hémato-tumorale, -musculaire, -placentaire et -rétienne, améliorant ainsi la biodisponibilité des molécules thérapeutiques dans les tissus cibles. La délivrance sûre et efficace de molécules d'intérêt par sonoporation repose sur l'optimisation des **paramètres acoustiques** (*i.e.*, pression acoustique, fréquence de répétition des impulsions, rapport cyclique, *etc.*), des **paramètres liées aux microbulles** (*i.e.*, propriétés physico-chimiques et pharmacologiques des microbulles, dose, nature et voie d'administration, *etc.*) **des propriétés pharmacologiques** (*i.e.*, pharmacocinétique, pharmacodynamie) et des **molécules thérapeutiques** (*i.e.*, molécules chimiothérapeutiques, antibiotiques, anticorps, acides nucléiques *etc.*).

Enfin, les effets de la sonoporation sur la vasomotricité et l'hémodynamique des vaisseaux sanguins ont été étudiés dans les tissus cérébraux, musculaires, hépatiques sains et tumoraux. Une **vasoconstriction** suivie immédiatement d'une **vasodilatation** des vaisseaux sonoporés sont observées. Cette modification de la vasomotricité provoque à son tour une **altération transitoire de la perfusion sanguine** des vaisseaux sonoporés. L'intensité et la réversibilité de ces perturbations vasculaires sont dépendantes des paramètres ultrasonores et de ceux liés aux microbulles.

En conclusion, les cellules endothéliales qui forment la paroi des vaisseaux sanguins sont les premières cibles de la sonoporation. Cette méthode physique induit une perméabilisation transitoire des barrières endothéliales qui améliore l'extravasation des molécules thérapeutiques et donc leurs biodistributions tissulaires. Grâce à cette biodisponibilité augmentée, l'efficacité thérapeutique de ces molécules est accrue. Malgré la présence systématique d'étapes préliminaires visant à déterminer l'innocuité primaire du protocole (*i.e.*, absence de microhémorragie, d'extravasation d'érythrocyte, et de dommage tissulaire), de nombreuses études démontrent que les effets biologiques après la sonoporation dépendent en grande partie des propriétés morphologiques et fonctionnelles des vaisseaux ciblés, des paramètres acoustiques et des propriétés physico-chimiques et pharmacologiques des microbulles et des molécules à délivrer. L'utilisation rationnelle de la sonoporation en clinique nécessite le développement et la validation de protocoles thérapeutiques sûrs et efficaces. La mise au point de ces protocoles requiert également : (i) l'étude de la cinétique spatiotemporelle de la perméabilisation des barrières endothéliales ; (ii) l'identification des acteurs cellulaires et moléculaires spécifiques de l'ouverture et de la fermeture des barrières endothéliales ; et (iii) l'évaluation des conséquences vasculaires à court, à moyen et à long terme.

À ce jour, il reste en effet de nombreuses interrogations sur les causes et les conséquences de la perméabilisation de la BHE par sonoporation. Bien que de nombreuses études précliniques et quelques études cliniques démontrent que la sonoporation potentialise l'efficacité thérapeutique de molécules chimiothérapeutiques dans le traitement de tumeurs cérébrales, les conséquences neurophysiologiques de la perméabilisation de la BHE demeurent à ce jour peu connues.

Dans le chapitre suivant, nous proposons de parcourir la littérature traitant de l'innocuité de la sonoporation, et de découvrir les principaux résultats et écueils de l'utilisation de cette technique dans le cadre de la perméabilisation de la BHE.

Partie I

État de l'art

Chapitre 3

Explorations de l'innocuité de la perméabilisation de la BHE



Chapitre 3.	Explorations de l'innocuité de la perméabilisation de la BHE.....	47
1.	Approches macroscopiques.....	47
a)	Imagerie par émission de positon et par résonance magnétique nucléaire	47
(1)	Principe	47
(2)	Résultats.....	51
b)	Tests comportementaux.....	54
(1)	Principe	54
(2)	Résultats.....	55
2.	Approches histologiques	56
(1)	Principe	56
(2)	Résultats.....	59
3.	Approches moléculaires	61
a)	Transcriptomique	61
(1)	Principe	61
(2)	Résultats.....	64
b)	Métabolomique	68
(1)	Principe	68
(2)	Résultats.....	76
4.	Synthèse.....	76

Chapitre 3. Explorations de l'innocuité de la perméabilisation de la BHE

L'innocuité de la délivrance de molécules thérapeutiques à travers la BHE par sonoporation a été évaluée à différents niveaux d'étude. Après avoir introduit brièvement le principe de la méthode exploratoire décrite, nous présenterons les résultats des études du niveau macroscopique, incluant les études comportementales et d'imageries, jusqu'au niveau tissulaire puis moléculaire, incluant les études de transcriptomique et de métabolomique. Dans ces paragraphes, nous nous attarderons également sur les conditions expérimentales utilisées, notamment sur les dispositifs ultrasonores, les paramètres acoustiques et sur le protocole d'anesthésie des animaux.

1. Approches macroscopiques

a) Imagerie par émission de positon et par résonance magnétique nucléaire

(1) Principe

L'**imagerie tomographique par émission de positon (TEP)** est un type d'imagerie fonctionnelle et moléculaire qui repose sur l'utilisation d'isotopes radioactifs à demi-vie courte, comme le ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O et le ^{18}F (Basu *et al.*, 2014; Vodovar *et al.*, 2019). Il est ensuite incorporé à une molécule dite « précurseur » par réaction chimique de radiomarquage. Cette molécule radiomarquée, ou radiotraceur, est injectée dans la circulation sanguine avant la procédure d'imagerie (Tableau 6).

Tableau 6 : Radiomarqueurs utilisés en clinique et en pré-clinique pour le diagnostic par tomographie par émission de positon. D'après (Vodovar *et al.*, 2019).

Radiomarqueurs	Cibles	Diagnostics
[^{18}F] Fluorodesoxyglucose	Métabolisme du glucose	Diagnostic, classification, suivi thérapeutique des tumeurs Etude de l'activité neuronale
[^{18}F] DPA-714	Protéine de translocation mitochondriale	Evaluation de l'inflammation
[^{18}F] Fluorocholine	Métabolisme de la choline	Détection des lésions métastatiques
[^{18}F] Fluoroéthyl-L tyrosine	Métabolisme de la tyrosine	Diagnostic et stadification des gliomes
[^{18}F] Fluordopa	Métabolisme de la dopamine	Diagnostic de la maladie de Parkinson
[^{18}F] Florbétabène	Plaques β -amyloïdes	Diagnostic de la maladie d'Alzheimer ou d'autres troubles cognitifs
[^{11}C] Flumazénil	Récepteurs GABA-A	Localisation des foyers épileptogènes

L'élément radioactif présent dans le radiotraceur subit une désintégration radioactive de type β^+ avec émission de positon. C'est une désintégration isobarique où le proton est converti en neutron. Un positon et un neutrino sont simultanément libérés. Le positon chargé positivement s'annihile avec les électrons négatifs des autres noyaux présents dans le milieu. Ainsi, l'annihilation de ces particules conduit à l'émission de deux photons γ dans la même direction mais de sens opposés. Ces particules photoniques sont détectées par le détecteur TEP par coïncidence (Figure 8). Ces détecteurs TEP sont généralement couplés à un système de scanner à rayons X (RX) et parfois même, à une imagerie par résonance magnétique (IRM), afin de superposer cette imagerie anatomique avec l'imagerie TEP.

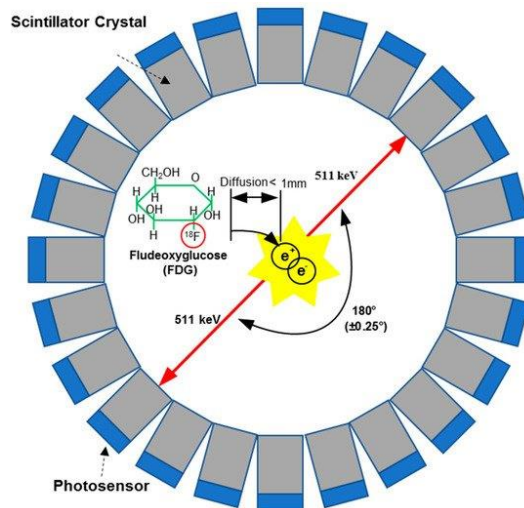


Figure 8 : Principe de la tomographie par émission de position. D'après (Jiang *et al.*, 2019).

L'avantage de cette technique est l'apport d'une imagerie fonctionnelle et moléculaire, ainsi que la possibilité de quantifier de manière précise la radioactivité et donc indirectement l'activité biologique (*e.g.*, métabolisme énergétique, inflammation, *etc.*) d'un tissu ou d'un organe. Malheureusement, l'imagerie TEP souffre d'une faible résolution spatiale, qui fait l'objet d'une constante amélioration à travers le développement technologique de ces bases matérielles.

L'**imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM)** est une modalité d'imagerie qui repose sur le principe de la résonance des spins nucléaires des protons ^1H . Deux principales modalités d'imagerie sont distinguées : l'imagerie IRM anatomique et l'imagerie IRM fonctionnelle ; auxquelles s'ajoutent l'utilisation de produit de contraste généralement à base de gadolinium.

Dans un champ magnétique nul, les atomes possèdent un moment magnétique de spin nucléaire qui s'oriente dans n'importe quelle direction de l'espace. Lorsqu'ils sont placés dans un champ magnétique constant de forte intensité, le moment magnétique des noyaux tend à s'aligner avec l'axe du champ magnétique, appelé axe longitudinal (z). En s'orientant selon le champ magnétique, les spins effectuent un mouvement de précession à une fréquence caractéristique proportionnelle à l'intensité du champ magnétique et au rapport gyromagnétique de l'atome considéré. Cette fréquence est appelée fréquence de Larmor. Afin d'obtenir un signal RMN, une onde électromagnétique radiofréquence (RF) à la même fréquence que celle de Larmor est émise pendant une courte période. En fonction de la durée et de l'amplitude de cette onde excitatrice, le moment magnétique nucléaire bascule pour s'orienter selon l'onde RF. L'aimantation est décomposée en une composante transversale et une composante longitudinale. Lorsque l'excitation est terminée, le moment magnétique longitudinal retourne à l'équilibre autour de l'axe longitudinal imposé par le champ magnétique. C'est la relaxation T1. De plus, lors de l'excitation RF à 90° , une aimantation transverse apparaît et décroît rapidement. C'est la relaxation T2. En réalité, cette relaxation est liée à la présence de champs magnétiques locaux d'origine moléculaire qui s'ajoutent au champ magnétique IRM (B_0). De plus, le champ magnétique artificiel produit par l'appareillage IRM est inhomogène d'un point de vue microscopique. Ces deux effets, s'ils ne sont pas compensés, correspondent à la relaxation T2* qui peut être mise à profit pour l'imagerie IRM.

Ces retours à l'équilibre s'accompagnent d'une émission d'énergie sous la forme d'ondes radiofréquences (FID) qui constituent le signal de résonance magnétique nucléaire. Ces relaxations des moments magnétiques transverses et longitudinaux sont caractérisés par des temps de relaxation T1 et T2 et sont à la base du contraste lors de la formation de l'image IRM (pondération). La formation d'une image à partir de ce phénomène physique est possible grâce à l'application de gradients de champ magnétique dans les trois dimensions. Ces gradients de champ magnétique s'ajoutent au champ magnétique intense (B_0) et permettent la localisation spatiale du signal RMN. Selon leur direction, ces gradients sont utilisés pour encoder les voxels (*i.e.*, équivalents aux pixels à trois dimensions) de la future image. En effet, la variation du champ magnétique selon un gradient définit une nouvelle fréquence de résonance pour les noyaux présents dans le champ magnétique graduel. Le gradient suivant le champ magnétique produit par l'appareil IRM sélectionne un plan de coupe. De même, deux électro-aimants suivant les plan x et y permettent respectivement de coder les colonnes (codage en fréquence) et les lignes (codage en phase) de l'image (Figure 9).

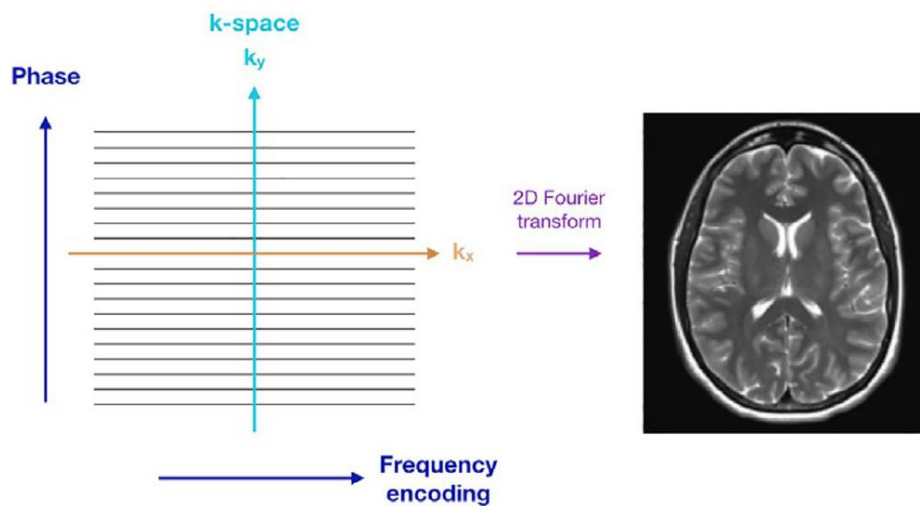


Figure 9 : Codage de l'espace en trois dimensions pour la formation d'une imagerie par résonance magnétique nucléaire. D'après (Yousaf *et al.*, 2018).

Pour produire une image, il est nécessaire de construire une séquence IRM qui contrôle l'émission des ondes RF, l'application des gradients selon les axes z, x et y, la période de répétition des ondes RF (TR) et le temps d'écho (TE). Ces séquences sont définies par le choix du tissu à visualiser, ainsi que par le type d'examen désiré. Le contraste de l'image est obtenu en paramétrant les séquences d'excitation des noyaux par l'ajustement du TR et du TE (qui conditionneront la pondération T1 ou T2). À titre d'exemple, si les TR et TE sont courts, les clichés IRM seront pondérés en T1 ; à l'inverse si les TR et TE sont longs, les clichés IRM seront pondérés en T2. Les images IRM peuvent également être pondérées en densité de protons, dans ce cas le TR est long et le TE est court. Ces séquences constituent la base de l'imagerie IRM anatomique. La pondération T1 affiche les liquides en hyposignal (*i.e.*, zones noires) alors que la pondération T2 les affiche en hypersignal (*i.e.*, zones blanches). La séquence de base est appelée séquence écho de spin (Figure 10).

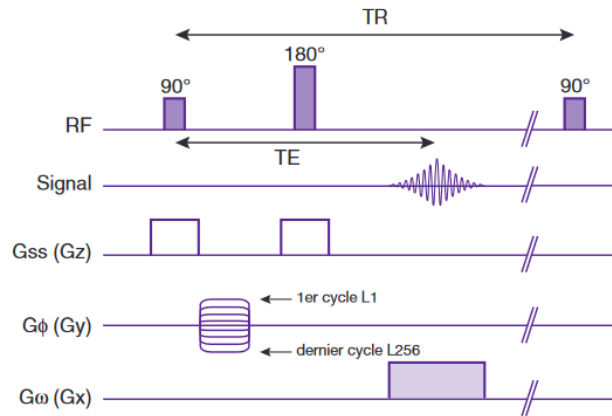


Figure 10 : Chronogramme d'une séquence de type écho de spin. D'après (Kastler and Vetter, 2018).

La séquence écho de spin induit des décalages de phase à cause du gradient de fréquence codant les colonnes. Ce phénomène diminue l'intensité du signal RMN. Pour éviter ce phénomène, un gradient de fréquence bipolaire (divisé en deux gradients de même amplitude mais de signes opposés) est appliqué. Ces gradients de fréquences bipolaires sont à la base de la séquence écho de gradient et permettent d'établir des séquences particulières exploitant la pondération transverse $T2^*$ (Figure 11). Pour accentuer la décroissance de l'aimantation transverse des spins, une excitation RF unique est imposée au milieu.

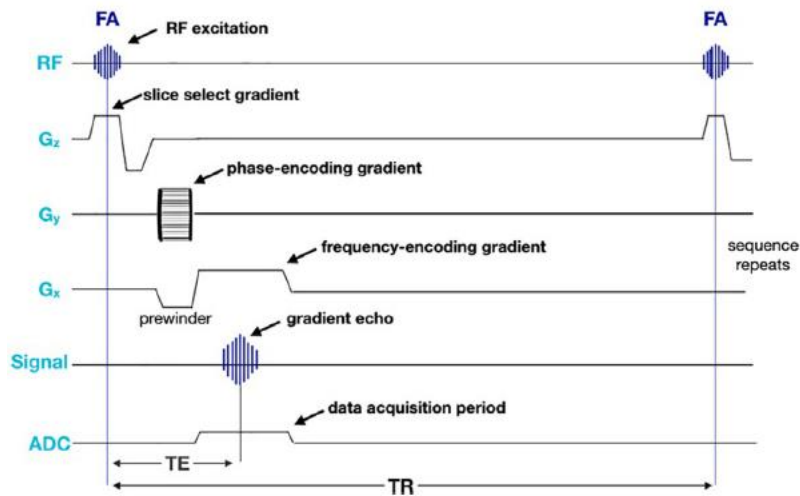


Figure 11 : Chronogramme d'une séquence de type écho de gradient. D'après (Yousaf *et al.*, 2018).

L'imagerie IRM fonctionnelle exploite les propriétés de la relaxation $T2^*$ exacerbées par l'utilisation d'une séquence écho de gradient (Chavhan *et al.*, 2009). L'exploitation du temps de relaxation $T2^*$ reflète la susceptibilité magnétique du milieu dans le but de contraster une image. C'est notamment ce phénomène qui est utilisée pour l'imagerie *Blood-Oxygen-Level Dependent* (BOLD). Le temps de la relaxation $T2^*$ est sensible au niveau d'oxygénation des globules rouges dans le sang à cause de la nature paramagnétique de la désoxyhémoglobine causant un déphasage des spins. L'activité neuronale est directement corrélée à l'augmentation locale du flux sanguin. En effet, les neurones sont d'importants consommateurs de O_2 induisant une augmentation locale du débit sanguin artériel pour combler leurs besoins. De ce fait, le rapport entre l'oxyhémoglobine et la désoxyhémoglobine est

modifié, allongeant le temps de relaxation T2*. Cet allongement du temps de relaxation T2* permet de contraster l'image afin de mettre en évidence indirectement la zone consommatrice d'O₂.

En se basant sur la susceptibilité magnétique au sein des milieux biologiques, de nouvelles techniques ont été développées. L'une de ces méthodes est appelée *Susceptibility-Weighted Imaging* (SWI). Elle utilise les données de phase acquises lors d'une imagerie IRM. En effet, ces données dépendent des différences de susceptibilité magnétique entre les différents tissus et liquides biologiques. À l'aide de ces différences, la visualisation des structures vasculaires, des microhémorragies, des thromboses ou des calcifications est rendu possible (Haller *et al.*, 2021).

Enfin, le contraste de l'image peut être accentué en utilisant un **produit de contraste paramagnétique** généralement à base de sels de gadolinium. L'agent de contraste raccourcit les temps de relaxation T1 et T2. De ce fait, le contraste sera réhaussé en pondération T1 et sera diminué en pondération T2. La variation du contraste est relativement marquée lorsque le gadolinium est confiné dans la circulation sanguine, du fait de l'instauration d'un gradient de susceptibilité entre le compartiment vasculaire et tissulaire. L'intégrité de la BHE peut être détectée et quantifiée par **IRM de contraste**. En effet, les agents de contraste ne passent pas naturellement la BHE physiologiquement intacte. Lors de la perméabilisation de la BHE, ces agents sont extravasés au sein du tissu nerveux. L'augmentation du contraste entre les vaisseaux sanguins et le tissu nerveux est imagé et quantifié lors de l'imagerie IRM pondérée en T1 (Ku *et al.*, 2018).

(2) Résultats

Sinharay *et al.*, ont étudié l'impact de la perméabilisation de la BHE de l'hippocampe droit et du cortex frontal gauche par sonoporation chez le rat grâce à l'**imagerie TEP [¹⁸F] DPA-714** (Sinharay *et al.*, 2019). Les paramètres acoustiques sont : fréquence (f) 0,548 MHz ; rapport cyclique – *Duty Cycle* (DC) 1% ; fréquence de répétition des pulsations – *Pulse Repetition Frequency* (PRF) 0,5 à 0,6 Hz ; Pic de pression négative – *Peak Negative Pressure* (PNP) 0,144 MPa. L'index mécanique (IM), ou *mechanical index* (MI) en anglais, défini dans la partie Matériel et Méthodes (pp. 91) est de 0,20. La pression acoustique est augmentée de 0,8 kPa/pulsation. Les animaux sont anesthésiés par inhalation d'isoflurane avec 100% O₂ (1 à 3,5%). Après injection de microbulles Optison® (100 µL à 5 – 8 x 10⁷ MB/mL), les structures cérébrales sont exposées aux ultrasons pendant 120 secondes. Puis ces structures ont été visualisées par l'imagerie TEP [¹⁸F] DPA-714. Ce radio-ligand marque la protéine de translocation mitochondriale (TSPO) et met en évidence la neuroinflammation. Leurs résultats ont montré une augmentation non-significative de la liaison du [¹⁸F] DPA-714 dans les zones sonoporées par rapport aux zones contrôles (Figure 12A, B, C). Ces résultats sont confirmés par l'analyse immunohistopathologique des tissus cérébraux. En effet, cette analyse a montré une augmentation non-significative des marquages astrocytaires et microgliaux dans le cortex frontal gauche en comparaison avec le cortex controlatéral. L'ensemble des résultats témoigne que la perméabilisation de la BHE par sonoporation n'induit pas de neuroinflammation dans les conditions expérimentales utilisées.

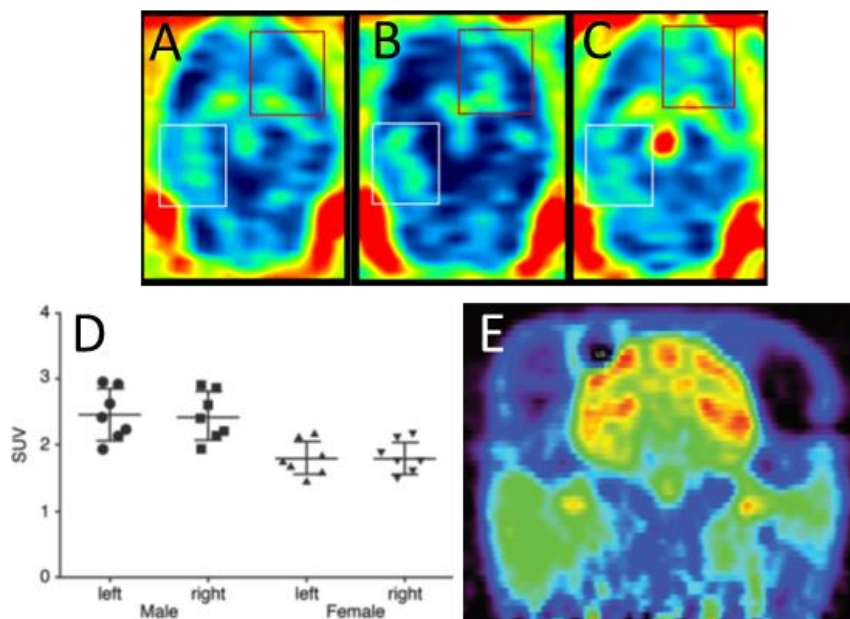


Figure 12 : Evaluation de la neuroinflammation par imagerie TEP du $[^{18}\text{F}]$ DPA-714 (A, B, C) et du métabolisme du glucose par imagerie TEP du $[^{18}\text{F}]$ FDG (D, E). Adapté d'après (Horodyckid *et al.*, 2017; Sinharay *et al.*, 2019).

Yang *et al.*, ont réalisé une étude d'**imagerie fonctionnelle PET au $[^{18}\text{F}]$ -FDG** chez le rat (Yang *et al.*, 2014) après perméabilisation de la BHE par sonoporation (f 1 MHz ; DC 5% ; PRF 1 Hz ; PNP de 0,7 MPa ; pendant 60 s ; 300 $\mu\text{L}/\text{kg}$ SonoVue[®]). Les animaux sont anesthésiés par inhalation gazeuse d'isoflurane dans de l'oxygène à 2 L/min. Leurs résultats ont montré une diminution de l'absorption de glucose immédiatement après la sonoporation dans l'hémisphère cérébral droit. Cette diminution a été associée à la sous-expression du récepteur GLUT1 responsable du transport du glucose du compartiment sanguin vers le compartiment cérébral.

Liu *et al.*, ont analysé l'innocuité de la perméabilisation de la BHE par sonoporation (f 1,5 MHz ; BL 10 ms ; PRF 1 Hz ; PNP de 0,78 à 4,9 MPa pendant 30 s ; 25 $\mu\text{L}/\text{kg}$ de SonoVue[®]) chez le rat craniectomisé par **imagerie IRM SWI** (Liu *et al.*, 2008). Les animaux ont été anesthésiés par injection de kétamine et de xylazine. Les auteurs ont mis en évidence que l'imagerie IRM SWI est plus sensible que l'imagerie IRM T1 et T2 pour la détection d'hémorragies induites par l'ouverture de la BHE. L'augmentation de la pression acoustique de 0,78 à 1,1 MPa induit une perméabilisation transitoire de la BHE sans provoquer d'hémorragies intracérébrales. En revanche, une ouverture irréversible de la BHE associée à de sévères hémorragies est observée lorsque la pression acoustique est augmentée de 1,9 MPa à 4,9 MPa. Ces résultats sont confirmés par l'analyse anatomopathologique des tissus cérébraux.

Deux études ont exploré les conséquences de la perméabilisation de la BHE par sonoporation sur des primates non-humains (PNH).

Horodyckid *et al.*, ont étudié l'innocuité de leur protocole ultrasonore (f 1 MHz ; longueur de la pulsation – *Burst Length* – BL 25 ms ; PRF 1 Hz ; pression acoustique de 0,6 à 0,8 MPa ; 100 $\mu\text{L}/\text{kg}$ SonoVue[®]) chez trois primates non-humains par diverses méthodes d'analyse : imagerie, électrophysiologie, comportement et histologie (Horodyckid *et al.*, 2017). Les primates sont

anesthésiés par une injection de kétamine et de xylazine. Le maintien de l’anesthésie est assuré par une injection en continue de propofol. Un transducteur ultrasonore a été implanté dans le crâne de ces primates pour cibler le cortex moteur. Chaque primate a été exposé à 7 reprises aux ultrasons après une injection en intraveineuse de microbulles. L’IRM *Fluid Attenuated Inversion Recovery* (FLAIR) montre un hypersignal jusqu’à 4 heures après l’insonification dans le cortex moteur située sous la zone d’implantation du transducteur, témoignant de la perméabilisation de la BHE (Figure 13). De plus, l’imagerie TEP [¹⁸F] FDG ne montre pas d’augmentation du métabolisme du glucose dans la région ciblée, démontrant ainsi l’absence d’une activation neuronale (Figure 12D et E). Aucun signe épileptique ou de trouble de la conduction nerveuse n’a été observé sur les enregistrements d’électroencéphalographie (EEG) et lors de l’évaluation des potentiels somatosensoriels évoqués (SSEP). L’analyse des tests comportementaux des sujets n’a révélé aucune différence avant et après la perméabilisation répétée de la BHE. L’étude histopathologique des tissus cérébraux ne montre pas d’hémorragies ni de pétéchies. Malgré un faible effectif de sujets, cette analyse multimodale des conséquences physiologiques d’un protocole de perméabilisation répétée de la BHE du cortex moteur atteste de l’innocuité de ce protocole.

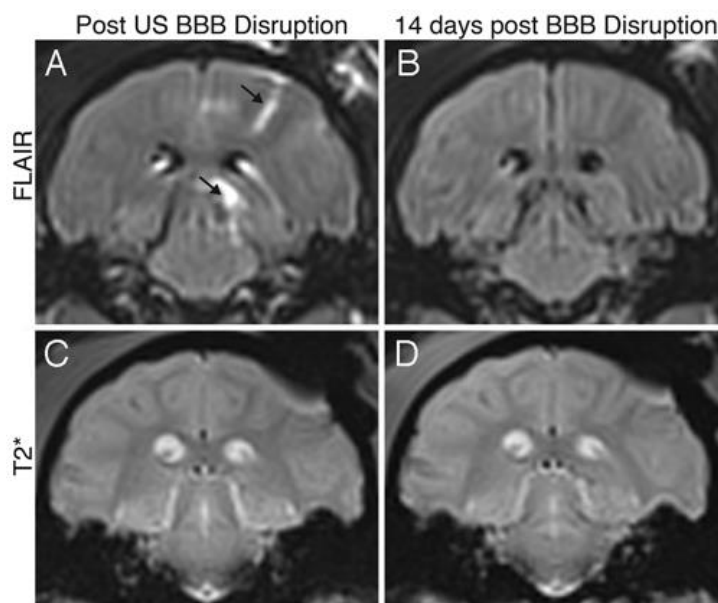


Figure 13 : Imagerie par résonance magnétique nucléaire contrastée T2* et *Fluid Attenuated Inversion Recovery* (FLAIR) montrant la zone de l’ouverture de la BHE et l’absence d’œdèmes ou d’hémorragies dans la zone perméabilisée. L’acquisition est réalisée immédiatement (A, C) et 14 jours après la sonoporation (B, D). D’après (Horodyckid *et al.*, 2017).

Les études d’imagerie anatomique ne révèlent pas de dommages tissulaires, d’hémorragies, ni d’œdèmes suite à la perméabilisation de la BHE par sonoporation. De plus, l’imagerie fonctionnelle ne démontre pas la présence d’une neuroinflammation ou d’une activation du métabolisme glucidique après la sonoporation. Dans la partie suivante, nous allons aborder les résultats des tests comportementaux chez les rongeurs et chez les PNH.

b) Tests comportementaux

(1) Principe

Les tests comportementaux sont des procédés expérimentaux appartenant aux neurosciences comportementales, permettant d'évaluer indirectement les **performances motrices** (coordination, équilibre, mobilité, *etc.*) et **cognitives** (mémoire, anxiété, dépression, *etc.*) d'individus mimant une maladie ou un trouble neurologique (Arakawa and Iguchi, 2018). Historiquement, les modèles animaux de prédilection pour les tests comportementaux sont les rongeurs. Cependant, un certain nombre de tests a été adapté pour l'application aux autres espèces telles que le poisson-zèbre ou les PNH. Ces évaluations comportementales sont réalisées sur la base d'observations de critères physiques et/ou temporels lors d'un test comportemental, explorant une fonctionnalité motrice et/ou cognitive (Tableau 7). Ces observations sont généralement effectuées à partir d'enregistrements vidéo, permettant de ne pas influencer la réponse comportementale des animaux par la simple présence des expérimentateurs.

Le protocole expérimental de ces tests comportementaux est généralement organisé de la manière suivante : préalablement aux expérimentations (chirurgie, administration de molécules, *etc.*), les animaux sont entraînés au test comportemental qu'ils devront accomplir (habituation). Cette habituation correspond à la performance basale de l'animal. Après les expérimentations, les animaux sont soumis de manière répétée, à plus ou moins long terme, aux mêmes tests.

Tableau 7 : Tests comportementaux utilisés chez les rongeurs pour évaluer les fonctions motrices et cognitives.

Tests	Fonctions	Exemples de paramètres observés
Open field, Elevated T Maze	Activité locomotrice, anxiété, habituation	Temps d'exploration, temps passé au centre ou à la périphérie de l' <i>open-field</i> , comportement d'éviction, délai avant la toilette, <i>etc.</i>
Préférence de place	Anxiété, renforcement	Temps passé dans les compartiments
Rotarod	Coordination motrice, équilibre, ataxie	Temps passé sur la roue du dispositif
Analyse de la marche (<i>gait analysis</i>)	Coordination motrice, analyse de déplacement, ataxie, équilibre	Analyse informatique du déplacement des membres antérieurs et postérieurs (espace, séquence)
Test de l'escalier	Motricité fine du membre antérieur, motivation	Délai avant de prendre la pellet, performance, nombre d'essais avant de récupérer la pellet
Labyrinthe de Morris	Apprentissage, mémoire spatiale	Temps d'exploration, nombre d'essai et/ou d'abandon
Test de la nage forcée	Dépression, abandon	Temps avant l'abandon
Sursaut acoustique et prépulse inhibiteur	Mémoire associative, audition, renforcement	Amplitude et latence de la réaction de sursaut
Plaque chaude, choc électrique, pression et/ou repliement de la queue	Douleur	Délai avant la réaction de douleur
Cage d'auto-administration	Addiction, récompense, prise de décision, mémoire associative, renforcement	Temps avant l'auto-administration, fréquence d'auto-administration

Les tests comportementaux des animaux de laboratoire sont soumis à de nombreux biais tels que ceux causés par l'intermédiaire de l'expérimentateur (biais expérimentateur), de facteurs environnementaux (hébergement des animaux, condition d'hébergement, *etc.*) ou par le modèle lui-même. De plus, la variabilité des résultats observés durant ces tests nécessite l'utilisation d'un plus grand nombre d'animaux, ce qui pose des problèmes logistiques, économiques et éthiques.

(2) Résultats

Olumolade *et al.*, ont examiné les conséquences au long terme d'un protocole répété de perméabilisation de la BHE par sonoporation (f 1,5 MHz ; PNP 0,45 MPa ; BL 0,333 ms, PRF 10 Hz ; 1 μ L/g Definity®) sur le comportement et la motricité de la souris. Les auteurs ont ciblé le noyau caudé-putamen gauche (Olumolade *et al.*, 2016). Les animaux sont anesthésiés par inhalation d'isoflurane (1,5%) et sont traités : soit deux fois par semaine pendant 5 mois ; soit une fois par mois pendant 6 mois. Après confirmation de la perméabilisation de la BHE par IRM de contraste, les tests comportementaux suivants ont été réalisés : (i) le **test du rotarod** pour évaluer la motricité générale et la coordination, et (ii) le test de l'***open-field*** pour évaluer l'anxiété des animaux. Les résultats ont montré que la perméabilisation de la BHE par sonoporation ne modifie pas l'activité motrice et n'induit pas de comportement anxieux chez les animaux, quel que soit le protocole ultrasonore utilisé (Figure 14). De plus, l'analyse histologique des tissus cérébraux ne montre pas d'altérations morphologiques, ni la présence d'hémorragies.

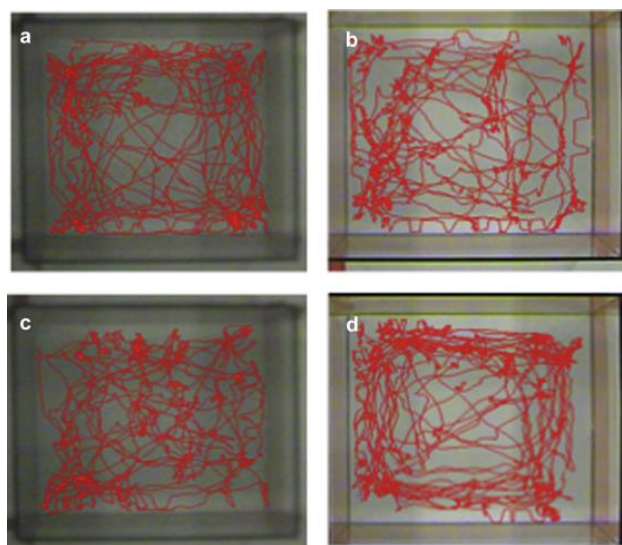


Figure 14 : Evaluation du thigmotactisme des souris pendant le test de l'*open-field*. La locomotion et l'anxiété des animaux sont évaluées chez la souris dont la BHE du striatum a été perméabilisée (a, b) et chez la souris contrôle (c, d). D'après (Olumolade *et al.*, 2016).

Tsai *et al.*, ont examiné les effets de la perméabilisation de la BHE par sonoporation (f 0,4 MHz ; PRF 1 Hz ; BL 10 ms ; IM de 0,33 – 0,47, 0,8 et 1,4) chez le rat par des approches comportementales et histologiques (Tsai *et al.*, 2018). Après l'injection intraveineuse de microbulles (de 150 à 400 μ L/kg SonoVue®) et sous anesthésie gazeuse (isoflurane 3%), les ganglions de la base sont exposés aux ultrasons pendant 120 s. L'**activité et la coordination motrice**, les **changements comportementaux**, les **réflexes sensorimoteurs** et la température corporelle des animaux sont évalués avant et après la procédure. Les données expérimentales ont mis en évidence que la perméabilisation répétée et sévère

de la BHE (jusqu'à 3 fois tous les deux jours ; 0,4 μL MB/kg ; IM 1,4) provoque une ataxie (*i.e.*, perturbation de l'équilibre et de la coordination motrice) et une hypoactivité globale de l'animal à court terme. Ce protocole cause également des dommages au tissu cérébral (*i.e.*, apoptose des cellules cérébrales) et provoque une activation des cellules gliales. Ces conséquences neuropathologiques et comportementales ne sont pas observées lorsqu'une faible dose de microbulles (0,15 $\mu\text{L}/\text{kg}$) et des IM faibles (0,33 – 0,47) et modérés (0,8) sont utilisés.

Downs et al., ont étudié les conséquences neurologiques au long terme (4 à 20 mois) de la perméabilisation de la BHE par sonoporation (f 0,5 MHz ; BL 10 ms ; PRF 2 Hz ; PNP de 200 à 400 kPa ; pendant 2 min ; $2,5 \times 10^8$ MBs/kg *microbulle non précisée*) des noyaux caudé-putamen des ganglions de la base chez le PNH (Downs *et al.*, 2015). Les animaux sont anesthésiés par un mélange de kétamine et d'atropine. Les auteurs ont tout d'abord démontré par imagerie IRM de contraste en pondération T2 et SWI que leur protocole ultrasonore était efficace (*i.e.*, perméabilisation de BHE dans 99% des cas) et sûr (*i.e.*, absence d'œdèmes ou d'hémorragies). Cependant, deux sujets ont présenté des œdèmes cérébraux, qui se sont résorbés dans la semaine suivant la perméabilisation de la BHE par sonoporation. De plus, aucun changement de la fréquence cardiaque et respiratoire, de la saturation en oxygène et de la tension artérielle n'a été observé avant, pendant et après la procédure, confirmant l'innocuité de leur protocole. Les auteurs ont ensuite évalué les potentiels effets neurologiques de la technique à travers des **tests cognitifs quantitatifs** évaluant les **fonctions visuelle, motivationnelle et motrice**. Les tests comportementaux évaluent le temps de réaction, le taux d'erreur, la motivation et la prise de décision lors de l'affichage de lignes horizontales et verticales sur un écran. Ces lignes sont conditionnées et associées à l'obtention d'une récompense, plus ou moins importante en fonction de l'orientation de la ligne. Les résultats montrent un temps de réaction qui est augmenté le jour suivant l'ouverture de la BHE. Cette augmentation revient à la normale 4 à 5 jours après la procédure. Le seuil de discrimination visuo-moteur n'est pas affecté. L'ensemble de ces données confirme l'innocuité de leur protocole de perméabilisation de la BHE par sonoporation chez le PNH.

Les approches comportementales n'ont pas révélé de perturbations majeures des performances motrices et cognitives des animaux après l'utilisation d'un protocole rationnel de sonoporation. Cependant, lors de l'emploi d'un protocole ultrasonore répété et sévère (i.e., index mécanique 1,4 ; sonoporation au jour 1 et 3), les résultats des études comportementales ont montré un phénomène d'ataxie et d'hypoactivité chez les rongeurs, qui se résolvait 3 jours après la sonoporation. Les études d'imagerie anatomique et fonctionnelle, ainsi que les tests comportementaux ont généralement été corrélés à des investigations histologiques. En effet, l'observation de conséquences macroscopiques de la sonoporation est liée à l'apparition de dommages histologiques. Après avoir introduit le principe de l'histologie, nous allons maintenant parcourir les études des conséquences histologiques de la sonoporation.

2. Approches histologiques

(1) Principe

L'histologie est la discipline scientifique qui étudie les tissus biologiques. Elle explore l'organisation, la morphologie ainsi que la structure des tissus dans un organisme. Un tissu est le niveau

d'organisation intermédiaire entre la cellule et l'organe. Il s'agit d'un ensemble de cellules regroupées, liées entre elles par des jonctions d'adhérence, de communication et par des jonctions serrées, qui exerce un rôle de soutien (*e.g.*, tissu conjonctif) et/ou un rôle fonctionnel bien défini (*e.g.*, tissus nerveux, pancréatique, *etc.*). Du prélèvement à l'interprétation des lames histologiques, l'histologie met en œuvre de nombreux équipements et techniques.

La première étape pour l'étude d'un tissu est le prélèvement de l'échantillon biologique (Tableau 8). Pour les tissus de provenance animale, on distingue plusieurs méthodes : les frottis, les biopsies, les résections et les ponctions. Une fois prélevés, les tissus sont préparés et conservés. Plusieurs options sont disponibles : la congélation rapide (avec ou sans cryoprotecteur) et/ou la fixation par un produit chimique (formol, paraformaldéhyde, *etc.*). La fixation est l'étape clé de l'étude histologique. Elle a pour but de stabiliser le tissu pour éviter son autolyse, et de ponter les protéines par liaison covalente. Sous l'action d'un produit de fixation, les structures cellulaires et tissulaires sont figées dans un état proche de celui vivant.

Tableau 8 : Modalités de prélèvement des échantillons histologique.

Méthode de prélèvement	Description
Frottis	Prélèvement à l'aide d'un écouvillon stérile, d'une petite brosse ou d'une petite spatule (frottis nasopharyngé pour dépistage de la COVID).
Biopsie	Prélèvement de très petite taille d'un tissu lors d'opération ou de diagnostic endoscopique.
Résection	Ablation intégrale d'un organe lors d'une opération (tumeur, prévention, <i>etc.</i>).
Ponction	Prélèvement d'un liquide (lombaire, pleural, ascitique, péricardique, <i>etc.</i>)

Lorsque les échantillons ont été préparés, il est possible de les immerger dans des milieux d'inclusion. Ces milieux maintiennent et durcissent les tissus pour leur coupe. On distingue trois milieux d'inclusion : l'*Optimal Cutting Temperature Compound* (OCT), la paraffine, et la résine. Ils conditionnent *in fine* l'épaisseur des coupes. Ces coupes d'échantillon sont déposées sur lames pour subir différents traitements de coloration (Tableau 9) ou d'immunohistochimie. Les colorations histologiques reposent sur l'interaction chimique d'une molécule avec les composants spécifiques de la cellule (noyaux, cytoplasmes, mitochondries, *etc.*). Les composants cellulaires basiques se lient à des molécules qui sont acides (et inversement). Ces colorants peuvent être utilisés en même temps pour mettre en évidence plusieurs structures cellulaires.

Tableau 9 : Exemples de colorations simples et spécifiques utilisées en histologie et en anatomopathologie.

Coloration	Composants	Structures colorées
HES	Hématoxyline Eosine Safran	Noyau, cytoplasme et collagène
Trichrome de Masson	Hématoxyline de Weigert Fuschine Biebrich Acide écarlate Vert brillant	Fibre musculaire, collagène, gamètes et neurofibrilles
PAP	Hématoxyline de Harris Orange G Eosine	Noyau, cytoplasme, kératine et épithélium
PAS	Acide periodique Réactif de Schiff	Membrane plasmique, mucus, glycogène, glycoprotéines et polysaccharides
Nissl	Violet de crésyl Bleu de méthylène Thionine	Neurone, ribosome et réticulum endoplasmique rugueux

Les colorations sont réalisées selon deux méthodes : la méthode progressive ou la méthode régressive. Lors de la méthode progressive, l'intensité de la coloration est contrôlée par l'immersion de l'échantillon dans un agent atténuant (*e.g.*, eau distillée acidifiée ou basifiée). Lors de la méthode régressive, la structure est délibérément surteintée. L'excès de colorant est ensuite clarifié avec une solution aqueuse acide ou basique (*e.g.*, eau acidifiée, eau ammoniacquée, *etc.*). L'observation des lames colorées met en évidence l'organisation globale d'un tissu et ses caractéristiques histopathologiques à travers la différenciation de ses éléments structurels par la coloration (localisation, couleur et intensité).

L'autre application histologique est l'immunomarquage reposant sur l'utilisation d'anticorps dirigés contre des molécules spécifiques au sein d'un tissu. La révélation de ce marquage spécifique peut être réalisée de différentes manières : soit par immunofluorescence, soit par immunohistochimie. L'immunomarquage est composé de 6 étapes. La première, qui a déjà été abordée, est la fixation. Après avoir fixé les tissus, il est nécessaire de perméabiliser les cellules. Pour cela, des agents détergents sont utilisés. On peut citer le Triton, le Tween, la saponine ou le dodécylsulfate de sodium (SDS). Il faut ensuite bloquer les sites antigéniques non spécifiques à l'aide d'une solution riche en protéine. Il est possible d'utiliser l'albumine sérique bovine, l'ovalbumine, le sérum de veau foetal, *etc.* Après toutes ces étapes, l'anticorps primaire est incubé sur la coupe histologique. Cet anticorps met en jeu la reconnaissance spécifique anticorps/antigène pour marquer spécifiquement une molécule sur et/ou dans la cellule. Lorsque la molécule d'intérêt est marquée, il est nécessaire de la révéler. Pour ce faire, un anticorps secondaire est utilisé. Il est : soit couplé à un fluorophore ; soit couplé à l'avidine ; ou alors couplé à une enzyme. Le fluorophore lié à un anticorps secondaire, ou associé à la streptavidine mettra indirectement en évidence l'antigène ciblé lors de l'observation au microscope à fluorescence. Ce mode opératoire amplifie le signal et réduit le volume d'anticorps nécessaire. Une fois ces traitements réalisés, il est nécessaire de protéger les tissus de l'environnement, et de protéger la fluorescence de la photodégradation (*fading*). Pour cela, il faut apposer un vernis protecteur entre la lame et la lamelle. Cette opération garantit la conservation et l'archivage sur le long terme des échantillons histologiques.

(2) Résultats

Baseri *et al.*, ont examiné les conséquences neurologiques de la perméabilisation de la BHE par sonoporation (f 1,525 MHz ; BL 20 ms ; PRF 10 Hz ; PNP de 0,15 à 0,98 MPa pendant 30 s ; 0,05 µL/kg Definity®) chez la souris saine par **histologie conventionnelle** (Baseri *et al.*, 2010). Les animaux ont été anesthésiés par inhalation d'isoflurane (1,5% à 2,0%) avec supplémentation d'oxygène à raison de 0,8 L/min. Le seuil de pression acoustique utilisé dans cette étude pour la perméabilisation de la BHE dans l'hippocampe est compris entre 0,15 et 0,30 MPa. Une analyse histologique des tissus cérébraux après leur coloration avec un mélange d'hématoxyline et d'éosine a été réalisée 30 min et 5 h après perméabilisation de la BHE. Sans surprise, l'augmentation de la pression acoustique de 0,15 à 0,98 MPa, et notamment à partir de 0,45 MPa, induit la perméabilisation de la BHE associée à des hémorragies sévères et à des microvacuolisations (Figure 15).

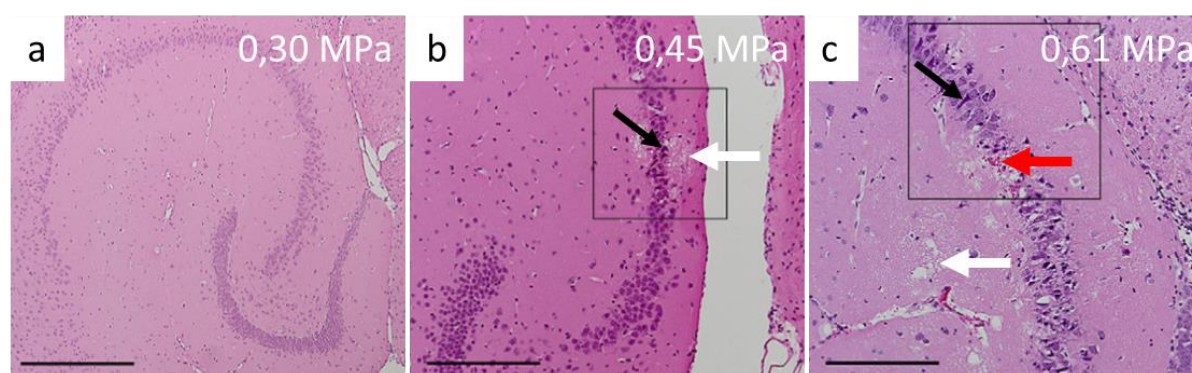


Figure 15 : Evaluation histologique par coloration à l'hématoxyline et à l'éosine après la perméabilisation de la BHE de l'hippocampe chez la souris, à trois pressions acoustiques (0,30 en a ; 0,45 en b ; 0,61 MPa en c). Les résultats montrent la présence de neurones pyramidaux endommagés (flèches noires), de vacuoles (flèches blanches) et de l'extravasation d'érythrocytes (flèches rouges). Modifié d'après (Baseri *et al.*, 2010).

Aryal *et al.*, ont exploré les effets secondaires d'une délivrance répétée d'une formulation liposomale de la doxorubicine (5,67 mg/kg) par sonoporation (f 0,69 MHz ; BL 10 ms ; PRF 1 Hz ; PNP 0,55 – 0,81 MPa pendant 60 s ; 10 µL/kg Definity®) dans le tissu cérébral chez le rat sain (Aryal *et al.*, 2015). Les animaux sont anesthésiés grâce à un mélange de kétamine et de xylazine. Le tissu cérébral a été exposé aux ultrasons au sein de 5 à 20 aires cérébrales à raison de 3 sessions hebdomadaires. Soixante-dix jours après la première session de traitement, une analyse histologique des tissus cérébraux a été réalisée par **coloration hématoxyline/éosine**. Cet examen histologique a montré la présence de dommages tissulaires qui se présentent sous la forme de petites cicatrices et de kystes, constitués de macrophages périphériques infiltrants et d'astrocytes activés. La présence anormale d'un grand nombre de cellules gliales est également observée autour de ces cicatrices. De plus, la concentration en doxorubicine est plus élevée dans le cas où la molécule est injectée avant la sonoporation.

Alonso *et al.*, ont étudié les conséquences neurophysiologiques de la perméabilisation de la BHE du cortex moteur par sonoporation (f 1 MHz ; BL 10 ms ; PRF 1 Hz ; PNP 2,5 MPa pendant 60 s ; 0,1 mL/kg SonoVue®) chez le rat sain en explorant les **marqueurs histologiques spécifiques de l'inflammation** (Alonso *et al.*, 2011). Les animaux sont anesthésiés par inhalation gazeuse (isoflurane

1,5%). Dans cette étude, le devenir de l'albumine sérique après ouverture de la BHE et l'activation des acteurs cellulaires responsables de son nettoyage sont plus particulièrement examinés (Figure 16). La présence de l'albumine dans le cerveau conduit à une neurotoxicité et doit être rapidement nettoyée pour prévenir les dommages neuronaux. Une solution de bleu d'Evans est injectée par voie intraveineuse afin de marquer l'albumine sérique. Les analyses immunohistochimiques du tissu cérébral ont révélé que l'activation de la microglie (cellules dont le marquage immunofluorescent est positif pour les protéines Iba1 et CD163) joue un rôle dans l'élimination de l'albumine. Elles ont également révélé que l'albumine est détectée dans les cellules astrocytaires (cellules positives pour les protéines GFAP et S100 β) et dans les cellules périvasculaires exprimant le marqueur endothélial EN4. Cette étude est la première à mettre en évidence un mécanisme de nettoyage de l'albumine consécutif à la perméabilisation de la BHE par sonoporation.

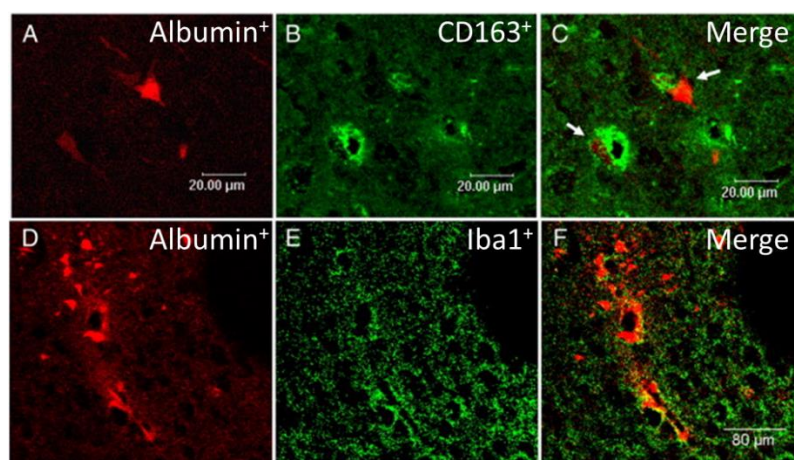


Figure 16 : Marquages immunofluorescents dirigés contre la protéine CD163 (b) et la protéine Iba1 (e), respectivement spécifiques du récepteur impliqué dans le nettoyage de l'albumine (a et d) et des cellules microgliales. Modifié d'après (Alonso *et al.*, 2011).

McDannold *et al.*, ont analysé par histologie l'innocuité au long terme de la perméabilisation de la BHE du thalamus chez le lapin, en recherchant **les marqueurs de l'ischémie et de l'apoptose** (hématoxyline/éosine, vanadium fuchsine toluidine, *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling* – TUNEL) (f 1,63 MHz ; BL 100 ms ; PRF 1 Hz ; PNP de 0,7 à 1,0 MPa pendant 20 s ; 50 μ L/kg Optison®) (McDannold *et al.*, 2005). Les animaux ont été anesthésiés par un mélange de kétamine et de xylazine. Les résultats ont mis en évidence des dommages tissulaires (*e.g.*, microhémorragies) et la présence de quelques neurones ischémiques et/ou apoptotiques dans la région cérébrale où la BHE est perméabilisée, et ce, quel que soit le délai après la sonoporation. Soixante-douze heures après l'ouverture de la BHE, de nombreuses microhémorragies sont détectées dans le parenchyme cérébral et une gliose est observée aux abords des microhémorragies. Aucun de ces dommages tissulaires ne sont visualisés 4 semaines après la sonoporation, montrant la réversibilité de ces lésions.

Les études histologiques ont permis de confirmer que l'amplitude et l'étendue des dommages tissulaires étaient corrélées à l'utilisation d'un protocole sévère de sonoporation. De plus, les études d'immunofluorescence ont permis d'élucider le phénomène de nettoyage de l'albumine extravasée par les cellules microgliales. Bien que les dommages tissulaires donnent une indication sur la sévérité du

protocole acoustique utilisé lors de la sonoporation, de nombreuses questions demeurent sur la mécanistique moléculaire et cellulaire derrière la perméabilisation de la BHE. Après avoir parcouru les études macroscopiques et histologiques, nous allons aborder les études explorant les conséquences neurologiques de la perméabilisation de la BHE par sonoporation par des approches dites « omiques ».

3. Approches moléculaires

a) Transcriptomique

(1) Principe

Le transcriptome est l'ensemble des molécules d'acide ribonucléique (ARN) issus de la transcription du génome (*i.e.*, ARN messenger, ARN transfert, ARN ribosomiaux, *etc.*). Sa discipline d'étude est la **transcriptomique**. Elle regroupe un ensemble de techniques de séquençage pour l'analyse quantitative et qualitative des ARNs en comparant les transcriptomes entre différentes conditions expérimentales. La quantification et la qualification du transcriptome dans un tissu donné et dans des conditions données identifient les gènes actifs, déterminent les mécanismes de régulation d'expression génique et définissent les voies et processus biologiques associées à l'expression différentielle des gènes. L'ensemble de ces informations vont constituer un profil d'expression transcriptomique. Cette discipline repose sur l'utilisation de deux technologies dominantes qui a permis la révolution des analyses géniques quantitatives et qualitatives des organismes vivants. Ces nouvelles techniques englobent les **puces à ADN** (*microarray*) et les **séquençages de nouvelle génération NGS** (*RNAseq*) (Tableau 10).

Les étapes préliminaires à l'utilisation de ces technologies sont l'**extraction** et la **purification** de l'ARN. Elles sont généralement faites à partir de kits commerciaux contenant des colonnes de silice. Les ARN messagers sont isolés de l'ARN total grâce à l'hybridation de queue polyA. Les ARN sont ensuite **rétrotranscrits** en acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc) pour être fragmenté et constituer les banques pour le séquençage *RNAseq*.

Les **puces à ADN** (*microarray*) sont constituées de courts oligomères fixés sur une lame en verre. Une puce ne contient qu'une quantité limitée de gènes. La détection des gènes repose sur la création de sondes moléculaires spécifiques aux séquences géniques recherchées. Les ADNc des gènes contenus dans un échantillon biologique s'hybrident de manière complémentaire aux sondes présentes sur la lame de la puce à ADN. La présence de deux fluorophores ou de deux éléments radiomarqués permet la quantification relative de l'abondance des gènes recherchés. Cette technique est rapide à mettre en œuvre et facile du point de vue technique, mais elle nécessite la conception spécifique de sondes basées sur le génome de l'espèce cible. Elle nécessite également une plus grande quantité de matériel biologique pour être fiable et reproductible.

Tableau 10 : Comparaison des deux principales méthodes d'étude du transcriptome. D'après (Govindarajan *et al.*, 2012; Kukurba and Montgomery, 2015).

Paramètres	RNAseq (séquençage des ARN)	Microarray (puce à ADN)
Débit	1 jour à 1 semaine par séquençage	1 à 2 jours par séquençage
Quantité ARN minimum	Environ 1 ng	Environ 1 µg
Précision de la quantification	Haute	Basse
Connaissances préalables	Aucune	Nécessite un génome ou un transcriptome de référence pour établir les sondes
Précision du séquençage	Environ 90% (limitée par la couverture*)	Environ 90% (limitée par la précision de la détection de la fluorescence)
Résolution des séquences	Peut détecter le polymorphisme nucléotidique (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> – SNP) et l'épissage (dans la limite de la précision de séquençage)	Des matrices spécialisées peuvent détecter les variants d'épissage si les sondes moléculaires sont correctement élaborées et en fonction de leur hybridation
Sensibilité	1 transcrit par million (limitée par la couverture)	1 transcrit par millier (limitée à la détection de la fluorescence)
Plage dynamique†	100 000 pour 1 (limitée par la couverture)	1 000 pour 1 (limité par la saturation de la fluorescence)
Reproductibilité	>99%	>99%
Traitement des données	Lourd	Relativement aisé
Tarif par échantillon	De 300 à 1000 \$	De 100 à 200 \$

*La couverture représente le nombre de lecture pour couvrir l'intégralité d'un gène ; †la plage dynamique est le ratio entre la plus petite et la plus grande valeur de taille de gène.

À l'inverse des puces à ADN, le **séquençage du transcriptome**, appelé ***RNAseq***, identifie les séquences nucléiques du transcriptome à un instant donné. Il est basé sur les NGS. Ces techniques regroupent les séquenceurs modernes de type : Illumina®, Roche 454®, Ion torrent®, et SOLiD®. Ces technologies ont trois étapes communes : (i) la **préparation de banques** qui correspond à la fragmentation aléatoire des échantillons d'ADNc. Ces fragments sont ensuite liés à de **petites séquences spécifiques**, appelées adaptateurs (adaptation) ; (ii) l'**amplification clonale ou PCR** de la banque ; et (iii) le **séquençage** dont la technique dépend du séquenceur choisi. Nous nous attarderons sur le fonctionnement du séquençage Illumina® (Figure 17).

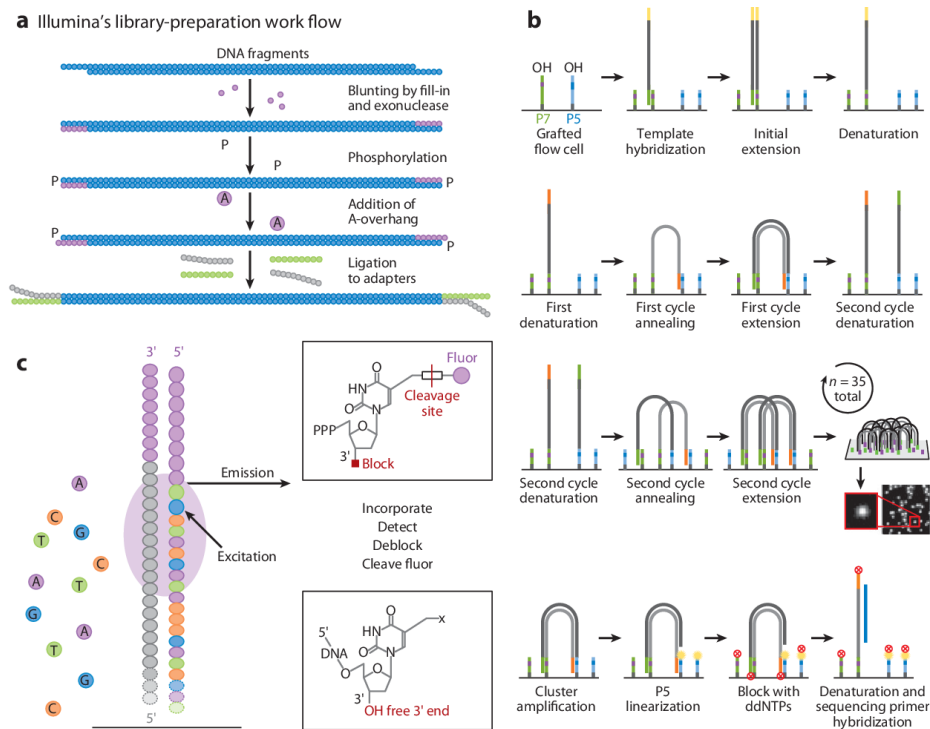


Figure 17 : Principe de séquençage du dispositif Illumina. En a, préparation de la librairie : fragmentation de l'ADNc et liaison des adaptateurs ; en b, hybridation des fragments et amplification en cluster ; en c, séquençage des clusters. D'après (Mardis, 2013).

Les **séquences ADN de la banque** sont liées à des adaptateurs fixés sur une **cellule de séquençage** (Figure 17a). Ces **adaptateurs** s'hybrident aux **séquences complémentaires** (Figure 17b). Une première **amplification** grâce à la synthèse du brin ancré a lieu (Figure 17b). Le fragment initial est dénaturé, et un pont entre les adaptateurs de deux séquences se forme (Figure 17b). Une seconde **amplification** a lieu pour générer des **clusters simples brins sens et antisens** (Figure 17b). Les brins antisens sont retirés en clivant et en rinçant les plaques. Finalement, ces opérations sont **renouvelées plusieurs fois** pour obtenir des **clusters denses**.

Lorsque ces clusters sont suffisamment denses, le séquençage des simples brins est entrepris (Figure 17c). Les bases couplées à un fluorophore et bloquées à l'extrémité 3' terminale, les amorces et l'ADN polymérase sont ajoutées à la cellule de séquençage. L'ADN polymérase ne peut allonger la séquence que d'une seule base à la fois et dans le sens 5'-3'. De ce fait, une seule base complémentaire peut être incorporée et l'élongation est bloquée à cause de l'extrémité 3' terminale bloquante de la base. Le fluorophore de la base qui vient d'être liée est ensuite excité par un laser. La fluorescence émise en retour est lue par un capteur CCD (*Charge-Coupled Device*) et correspond à la base complémentaire ajoutée. Finalement, l'extrémité 3' terminale bloquante et le fluorophore sont chimiquement retirés, libérant l'extrémité 3'-OH de la base, et autorisant un autre cycle d'élongation. Ainsi, les clusters de brins sont séquençés et correspondent aux lectures du transcriptome.

Ces méthodes d'étude engendrent la production d'une importante quantité de données qu'il faut ensuite traiter par des méthodes bio-informatiques. Le *workflow* est généralement le suivant : le contrôle qualité ; l'alignement des lectures (ou *reads*) ; le comptage du nombre de lectures ; et les

calculs statistiques de l'expression différentielle. L'alignement des structures est l'étape la plus importante et la plus gourmande en ressource informatique. Elle fait correspondre l'ensemble des séquences lues par le séquenceur (appelée *reads*) avec un génome de référence. Du fait de la fragmentation aléatoire de l'ADNc au moment de la réalisation de la banque, les séquences lues par le séquenceur doivent en théorie se recouper et recouvrir l'ensemble du génome. Si un ARN transcrit a été séquencé entièrement, il sera entièrement recouvert par les *reads*, et ce plusieurs fois. Ensuite, les *reads* alignés sont comptabilisés en partant du principe que le nombre de *reads* provenant d'un gène est proportionnel à l'abondance de son ARNm dans la cellule. Enfin, les statistiques différentielles peuvent être réalisées. Dans un premier temps, le nombre de *reads* est normalisé par rapport au nombre total de *reads* du *RNAseq*, au nombre de *reads* pour un gène donné et à sa taille (RPKM – *Reads Per Kilobase Million*; FPKM – *Fragment Per Kilobase Million*). Les statistiques sont ensuite réalisées sur ces valeurs. Le test statistique le plus commun et le plus utilisé pour l'étude de l'expression différentielle est basé sur la loi de Poisson (Sun *et al.*, 2017). Lorsque l'expression différentielle des gènes est déterminée, les gènes sont resitués au sein des voies, des processus et des mécanismes biologiques pour l'interprétation biologique.

(2) Résultats

McMahon *et al.*, ont exploré les effets de la perméabilisation de la BHE de l'hippocampe par sonoporation (f 551 kHz ; BL 10 ms ; PRF 1 Hz ; PNP 0.19 MPa ; pendant 120 s ; 20 µL/kg Definity®) chez le rat sain par des approches de transcriptomique (McMahon *et al.*, 2017). Les animaux sont anesthésiés par inhalation gazeuse d'isoflurane à 5% avec un débit d'air à 1 L/min. Après la procédure, les microvaisseaux sanguins sont disséqués à l'aide d'une technique par laser. La présence des cellules endothéliales dans les microdissections est vérifiée par une approche de RT-PCR ciblée sur les ARNm spécifiques de ce type cellulaire. Après extraction et RT-PCR des ARNm des échantillons, une analyse transcriptomique sur **puce à ADN** est entreprise. Les résultats mettent en évidence la surexpression transitoire des gènes associés à l'immunité et au chimiotactisme (*Sele*, *Cxcl1*, *Ccl3*, *Ccl2*) 6 h après la sonoporation de la BHE. Cependant, le niveau d'expression de ces marqueurs revient rapidement à leur état basal 24 h après la perméabilisation de la BHE par sonoporation. Ces résultats témoignent d'une activation aigüe de l'immunité dans les heures qui suivent la procédure. De plus, les marqueurs inflammatoires persistent jusqu'à 6 h après la sonoporation (*C3*, *Ccl6*, *Gfap* et *Itgb2*). Les analyses de l'enrichissement des processus biologiques (*Gene Set Enrichment Analysis* – GSEA) mettent en évidence un enrichissement de la « réponse inflammatoire chronique » et de la « réponse inflammatoire à un stimulus antigénique ». Les auteurs observent également une diminution de l'expression des transporteurs de la BHE, notamment ceux des familles des transporteurs ABC et des transporteurs SLC (*Abcb1a*, *Abca9*, *Slc22a8*, *Slc22a8* et *Slc6a13*) dans les heures qui suivent la perméabilisation de la BHE par sonoporation. Cependant, leur niveau d'expression retourne à leur niveau basal 24 h après la sonoporation. Après l'analyse GSEA, les processus biologiques enrichis sont associés aux transporteurs transmembranaires des xénobiotiques, des acides aminés et des acides carboxyliques. Ils révèlent une augmentation de l'expression des gènes associés à l'angiogenèse (*Serpine1*, *Ccl2*, *Egr3* et *Mmp9*) 6 h après la sonoporation. Les processus biologiques associés à ces gènes dérégulés sont : la régulation

positive de l'angiogenèse, du développement vasculaire, de la morphogénèse des vaisseaux sanguins, et de la migration des cellules endothéliales vasculaires.

Enfin, cette analyse transcriptomique révèle que la perméabilisation de la BHE induit une **inflammation microvasculaire** rapidement résolue au bout de 24 h après la sonoporation. L'ensemble de ces données démontre également que l'ouverture de la BHE par sonoporation induit une **inflammation neurovasculaire transitoire** et des **perturbations réversibles des processus de transports transmembranaires et de l'angiogenèse**. Nous pouvons regretter que cette étude n'ait pas examiné les conséquences biologiques sur des temps plus courts (inférieurs à 6 h) et plus longs (supérieurs à 24 h), afin de déterminer les acteurs précoces de l'ouverture de la BHE et de ceux responsables de la restauration de sa perméabilité native. De plus, cette étude aurait pu être étendue aux autres types cellulaires qui composent la BHE. En effet, il est maintenant connu que les neurones, les astrocytes et les cellules endothéliales forment une unité neurovasculaire qui va mettre en place des réponses biologiques communes (voire synergiques) face à une déstabilisation de son intégrité.

Kovacs *et al.*, ont examiné les conséquences neurophysiologiques de l'ouverture de la BHE par sonoporation (f 589 kHz ; BL 10 ms ; DC 1% ; PNP 0,3 MPa pendant 120 s ; 100 µL Optison® ; 5 à 8 x 10⁸ MB/mL) chez le rat par des techniques de biologie moléculaire (ELISA et qRT-PCR) ciblant des **marqueurs de la réponse inflammatoire** (Kovacs *et al.*, 2017). Les animaux sont anesthésiés par inhalation gazeuse d'isoflurane (1,5% à 3%) sans supplémentation. L'analyse du tissu cérébral est réalisée 5 min, 30 min, 2 h, 6 h, 12 h et 24 h après la sonoporation. Les principaux résultats de cette analyse sont les suivants : (i) une surexpression de la protéine du choc thermique (HSP70), concomitante avec une réponse inflammatoire aiguë, caractérisée par l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL1 α , IL1 β , IL18, IFN γ et TNF α . Ces changements biologiques durent jusqu'à 24 h après la sonoporation ; (ii) une augmentation du niveau des chimiokines et des facteurs trophiques, ainsi que des changements dans l'expression génique induite par l'activation de la voie NF κ B associée à une **neuroinflammation stérile** ; (iii) une augmentation du nombre de cellules apoptotiques et du nombre de cellules positives à ICAM (molécule d'adhérence des cellules vasculaires) et l'induction d'une gliose (astrocyte et microglie) jusqu'à 24 h après la sonoporation. La présence croissante de la protéine ICAM suite à un dommage tissulaire peut provenir d'une **libération transitoire de *Danger Associated Molecular Pattern* (DAMP)**, qui altère le métabolisme physiologique des cellules de l'unité neurovasculaire ; (iv) et une infiltration des macrophages CD68 positifs dans la zone ciblée par les ultrasons et une augmentation de quantité d'albumine sérique dans le parenchyme cérébral, qui est nettoyée 24 h après la sonoporation.

Cette étude met en lumière la présence d'une neuroinflammation stérile induite par la perméabilisation de la BHE par sonoporation. Cependant, contrairement aux travaux de McMahon *et al.*, le pic négatif de pression n'est pas ajusté par détection *in vivo* de la cavitation des microbulles lors de la procédure. L'ajustement de la pression en temps réel réduit les phénomènes de cavitation inertielle des microbulles impliquant la réduction des contraintes biomécaniques sur le tissu sonoporé et par conséquent des effets biologiques délétères.

McMahon et Hynynen ont évalué ensuite l'impact de trois protocoles ultrasonores sur le tissu cérébral après la perméabilisation de la BHE par sonoporation (f 551.5 kHz ; PRF 1 Hz ; BL 10 ms ; pendant 120 s) chez le rat (McMahon and Hynynen, 2017). Les animaux sont anesthésiés par inhalation gazeuse d'isoflurane (1 à 2% dans de l'air à un débit de 1 L/min). Le protocole 1 consiste à administrer la dose de microbulles Definity® préconisée pour le diagnostic clinique et à contrôler la pression acoustique délivrée par détection de la cavitation *in vivo*. Le protocole 2 vise à injecter 10 fois la dose clinique de microbulles préconisée pour le diagnostic avant l'application d'une pression acoustique fixe de 0,29 MPa. Finalement, le protocole 3 consiste à injecter 10 fois la dose de microbulles préconisée pour le diagnostic et à contrôler la pression acoustique par détection de la cavitation *in vivo*. La perméabilisation de la BHE et les dommages tissulaires (*e.g.*, œdèmes, hémorragies) sont évalués *in-vivo* par IRM et *post-mortem* par histologie (coloration hématoxyline/éosine). Les données expérimentales montrent que la perméabilité de la BHE face à un agent de contraste IRM après sonoporation augmente avec la concentration de microbulles injectées dans la circulation sanguine. Les auteurs ont également réalisé **une qRT-PCR ciblée sur les gènes de l'inflammation et de l'apoptose** sur le tissu cérébral 6 h et 4 jours après la sonoporation. Des œdèmes ont été observés chez 75% et 50% des sujets ayant respectivement subi les protocoles 2 et 3. L'analyse par qRT-PCR des gènes impliqués dans l'inflammation met en évidence que la dose de microbulles influence l'expression des gènes pro-inflammatoires après la sonoporation. En effet, à faible dose (dose clinique), les gènes associés à l'inflammation (principalement NFκB) ne sont pas impactés 6 h après la sonoporation. En revanche, à haute dose (10 fois la dose clinique), l'expression de ces gènes est augmentée pour les protocoles 2 et 3. La surexpression des gènes associés à l'inflammation n'est plus perceptible 4 jours après la sonoporation. Les protocoles 2 et 3 partagent les mêmes gènes surexprimés et présentent donc un même profil d'expression génique. De plus, l'expression de gènes antiapoptotiques et pro-inflammatoires impliqués dans l'immunité (MCP1, *Toll-Like Receptor* – TLR1, TNF) est également modifiée lors de l'utilisation des protocoles 2 et 3. Les auteurs corrélaient positivement la perméabilité de la BHE vis-à-vis d'un agent de contraste IRM aux changements observés dans l'expression des gènes associés à l'inflammation. Enfin, la présence de lésions tissulaires est uniquement décelée dans les régions cérébrales soumises au protocole 2.

McMahon et al., ont examiné les effets de différentes formulations de microbulles de gaz (Definity®, BG8774 et MSB4) sur l'efficacité et l'innocuité de l'ouverture de la BHE de différentes structures cérébrales (*i.e.*, cortex, striatum, hippocampe) par sonoporation (f 580 kHz ; PRF 0,17 à 1 Hz ; BL 10 ms, pendant 130 à 660 s) chez le rat (McMahon *et al.*, 2020). Les animaux sont anesthésiés par inhalation gazeuse d'isoflurane (1,5 à 2% dans de l'oxygène à un débit de 1 L/min). La perméabilisation de la BHE et les conséquences tissulaires de cette dernière sont évaluées par **IRM de contraste** et par **transcriptomique** 4 h après la procédure. Les résultats ont montré qu'une **réponse inflammatoire** était observée quel que soit le type de microbulles utilisé. Une corrélation positive entre la perméabilité de la BHE et l'expression différentielle des gènes associés à l'inflammation a été établie (*Ccl2*, *Cxcl1*, *Fas*, *Icam1*, *Il1b*, *Il6*, *Itga5*, *Serpine1*, *Selp*, *Timp1*, *Tnf*, *Hmox1*). Cette corrélation est dépendante de la composition des microbulles. En effet, la distribution en taille de ces dernières joue un rôle important dans l'expression différentielle des gènes codant plusieurs médiateurs pro-inflammatoires.

Ji *et al.*, ont évalué l'expression des **médiateurs et acteurs de l'inflammation** lors de l'ouverture de la BHE du striatum gauche chez la souris (f 1,5 MHz ; PRF 2 Hz ; BL 10 ms ; PNP estimée à 490 kPa ; 0,1 μ L/g Definity®) (Ji *et al.*, 2021). La durée d'exposition aux ultrasons dépend du groupe expérimental (faible, moyen, sévère). En effet, l'exposition est réalisée jusqu'à ce qu'une métrique appelée « dose de cavitation » atteignent la valeur choisie pour le groupe. Cette métrique reflète le volume de la BHE perméabilisée. Les animaux sont anesthésiés par inhalation d'isoflurane (1,5% à 2%) dans de l'oxygène (0,8 L/min). La pression acoustique est rétro-contrôlée par un détecteur de la cavitation des microbulles *in vivo*. L'expression des **médiateurs** et des **acteurs de l'inflammation** a été évaluée par **microarray** à 3 points temporels (*i.e.*, 6 h, 24 h et 72 h). Les résultats montrent une augmentation significative jusqu'à 24 h de l'expression des gènes codant pour des **cytokines** et des **récepteurs pro-inflammatoires**. Après 72 h, l'expression de ces gènes revient à l'état basal. Leurs résultats montrent également une fermeture de la BHE au bout de 72 h dans le groupe à faible exposition (*i.e.*, temps d'exposition d'environ 30 secondes), bien que très peu de signal IRM du gadolinium ne soit observé 48 h après la sonoporation.

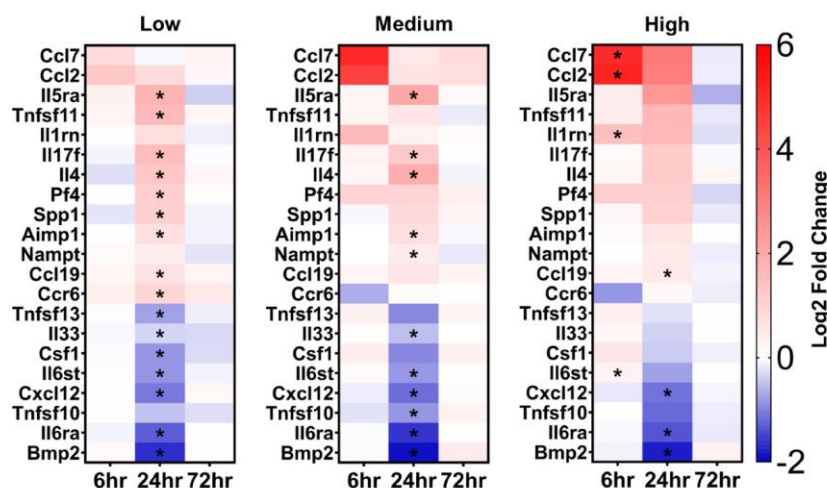


Figure 18 : Expression différentielle des gènes codant pour les cytokines et les récepteurs pro-inflammatoires entre le striatum gauche et le striatum controlatéral après sonoporation. L'échelle de couleur correspond au logarithme base 2 de l'accroissement (*fold-change*). La significativité ajustée par test *post-hoc* est représentée sous la forme d'un astérisque correspondant à *q-value* inférieure à 0,05. D'après (Ji *et al.*, 2021).

La coloration hématoxyline/éosine des coupes coronales de cerveaux 72 h après la sonoporation montre l'extravasation d'érythrocytes au niveau du corps calleux, alors qu'aucune extravasation n'est remarquée 6 h après la procédure. Les auteurs concluent que le nombre et le degré de changement dans l'expression des gènes codant pour les médiateurs et les acteurs de l'inflammation sont directement corrélés avec le volume de la BHE qui a été perméabilisée. De plus, ils soulignent l'importance de monitorer la cavitation pour contrôler l'ouverture de la BHE par sonoporation afin de moduler et de limiter l'inflammation causée par cette procédure.

Les études de l'expression génique des médiateurs et des acteurs de l'immunité et de l'inflammation ont apporté la preuve que plusieurs gènes codant pour des cytokines et des chimiokines, ainsi que pour les récepteurs de l'immunité et de l'inflammation étaient surexprimés dans les heures suivant la sonoporation. De plus, les résultats ont montré que les gènes impliqués dans

l'angiogenèse étaient également surexprimés. À l'inverse, les gènes codant pour les transporteurs moléculaires à la surface des cellules sont sous-exprimés après la sonoporation. Ces études ont également insisté sur le fait que l'importance de la réponse inflammatoire était corrélée à la dose de microbulles injectée et au protocole acoustique utilisé.

b) Métabolomique

(1) Principe

La **métabolomique** correspond à l'un des derniers niveaux exploratoires possibles parmi les sciences dites « omiques », et est celui qui se rapproche le plus de l'observation d'un phénotype donné. La métabolomique est la discipline qui s'intéresse aux petites molécules (appelées **métabolites**) issues du métabolisme cellulaire des organismes vivants. Cette approche prometteuse et puissante donne un profil moléculaire (ou profil métabolique) composé des métabolites et de leurs caractéristiques (*e.g.*, concentration, intensité, *etc.*). Ce profil est appelé **métabolome**. Le métabolome reflète directement l'**activité métabolique** sous-jacente de l'organisme étudié. En effet, la métabolomique à travers l'exploration des compartiments biologiques d'un organisme (**matrices**) reflète d'un point de vue métabolique, ce qui s'y est passé et ce qui est en train de s'y passer.

La métabolomique repose sur une plateforme matérielle analytique équipée en général de deux types de spectromètres (Tableau 11) : la **spectrométrie de masse** (MS), généralement couplée à une **chromatographie liquide ou gazeuse haute performance** (HPLC-MS ou GC-MS) ; et la **spectroscopie par résonance magnétique nucléaire** (du proton ^1H et/ou du carbone ^{13}C). Cette complémentarité multiplateforme tend à couvrir l'ensemble d'un métabolome. Il existe cependant beaucoup de modalités analytiques, mais nous nous attarderons principalement sur la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide et sur la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton ^1H .

Tableau II : Avantages et inconvénients des plateformes analytiques les plus communes en métabolomique.

Plateforme	Avantages	Inconvénients
Spectroscopie par RMN	Robustesse et reproductibilité Non sélectif « Non destructrice » Quantification absolue	Recouvrement spectral (1D) Sensibilité
Spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide haute performance	Sensibilité Nombre de composés	Stabilité, Reproductibilité Quantification relative

Le **workflow métabolomique** suit généralement toujours la même séquence (Wu and Li, 2016) (Figure 19). La première étape est d'identifier la **question biologique**. Ensuite, il faut établir le **plan expérimental**, déterminer les matrices d'intérêts, leur **prélèvement**, prévoir la **conservation des échantillons**, et enfin mettre au point les **techniques d'extractions** des métabolites.

Lorsque ces bases sont posées, il faut commencer le prélèvement des échantillons biologiques. La méthode de prélèvement est dépendante de la matrice à explorer. La phase pré-analytique correspond à l'extraction des métabolites et intervient après le prélèvement des échantillons. Selon le type

d'échantillons collectés, une étape de lyophilisation est nécessaire, comme c'est le cas par exemple pour les tissus biologiques (cerveau, muscle, *etc.*). La lyophilisation permet de retirer l'eau d'un substrat préalablement congelé. L'extraction des métabolites est généralement chimique et est basée sur l'utilisation de solvants (*i.e.*, acétonitrile, méthanol, chloroforme). Lorsque les métabolites sont extraits des matrices, le solvant d'extraction est évaporé. Les résidus secs sont : soit conservés au congélateur à -80°C ; soit resuspendus dans le solvant en adéquation avec la plateforme analytique choisie (*e.g.*, acétonitrile ou méthanol pour la spectrométrie de masse, tampon phosphate et eau lourde pour la spectroscopie par RMN).

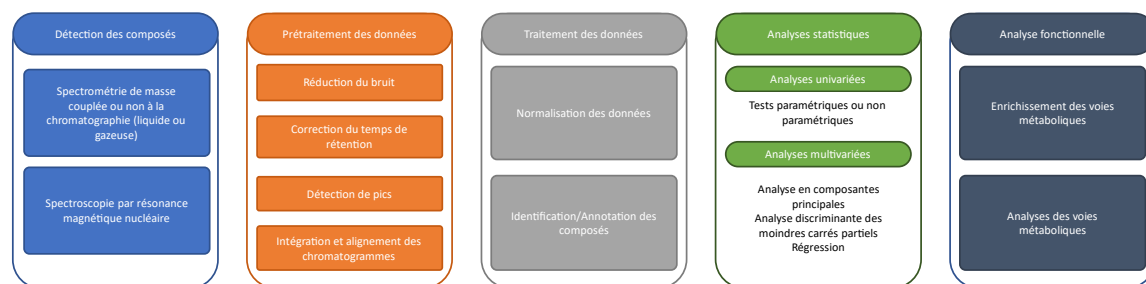


Figure 19 : Etapes standards (*workflow*) de traitements des échantillons métaboliques recueillis lors d'une étude métabolomique.

Le profilage métabolique des échantillons peut être envisagé selon deux approches : une approche ciblée ou une approche non ciblée. La **métabolomique ciblée** quantifie de manière précise plusieurs métabolites dans une matrice. Il est nécessaire de connaître la structure des métabolites cibles. Elle suit les changements de la concentration des métabolites d'une même voie métabolique dans plusieurs conditions expérimentales (*e.g.*, dérivés de l'acide arachidonique, dérivés du tryptophane). Dans le cadre d'une analyse métabolomique par spectrométrie de masse couplée à une chromatographie, si l'extraction des métabolites s'accompagne de l'ajout d'étalons internes, une quantification absolue est possible (dans la limite de détection des métabolites imposée par la méthode). En effet, ces étalons permettent d'établir une gamme standard pour la quantification précise et absolue de métabolites. Cette approche ciblée peut être complétée par une approche **métabolomique non ciblée**. Cette approche non ciblée identifie et liste tous les métabolites (dans la limite de détection), puis les quantifie de manière relative. En effet, l'intensité d'un fragment ionisé de la molécule correspond à un pourcentage de l'intensité maximale du spectre. Les données métaboliques issues de cette approche sont comparées entre les différents échantillons et les différentes conditions sans annotation préalable des ions. L'approche non ciblée est moins précise et moins sensible que l'approche ciblée, mais leur capacité de profilage est bien supérieure car elle prend en compte la variation de l'intensité de l'ensemble des ions. Il est à noter que la spectroscopie par RMN peut également faire intervenir une approche ciblée, bien que l'introduction d'un étalon chimique tel que le triméthylsilylpropionate (TSP) permet d'avoir *de facto* une quantification absolue de tous les métabolites visibles.

Les échantillons extraits et resuspendus sont ensuite analysés en spectrométrie de masse et/ou spectroscopie par RMN. La **spectrométrie de masse** est précédée d'une **chromatographie liquide ou gazeuse** (Figure 20). La chromatographie liquide est une technique de séparation où la phase mobile est un solvant. La phase mobile entraîne l'échantillon à travers une colonne solide de silice (appelé phase stationnaire). Le liquide sous haute pression est poussé de force par des pompes dans une

colonne dont les particules sont extrêmement fines et rapprochées. Les colonnes séparent les différentes molécules issues d'un mélange complexe en fonction de leur affinité pour la colonne et/ou pour le solvant. Plus le solvant est polaire, plus il entraîne les molécules polaires. Les molécules les moins polaires restent donc accrochées à la colonne. Au fur et à mesure de la modification des proportions de solvants dans la colonne, l'éluant entraîne d'autres molécules en fonction de leur affinité pour celui-ci. Selon la nature des molécules à étudier, différents types de colonnes sont utilisés. On distingue les colonnes à phase inverse (RP) et les colonnes à interactions hydrophiles (HILIC). Par exemple, les colonnes HILIC séparent efficacement les métabolites polaires. À l'inverse, les colonnes à phase inverse sont pertinentes pour la séparation des métabolites apolaires. Les analytes sortant des colonnes de séparation sont ensuite dirigés vers le spectromètre de masse.

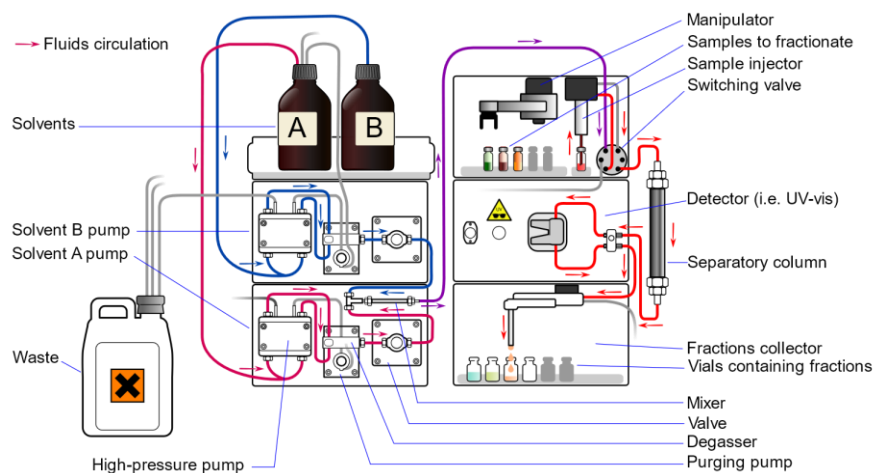


Figure 20 : Schéma de principe du dispositif de chromatographie en phase liquide. D'après (Norena-Caro, 2017).

Le spectromètre de masse est généralement composé de quatre éléments liés les uns aux autres (Figure 21). Le premier élément est le système d'introduction des analytes, par lequel le composé entre dans le spectromètre de masse. Le second est la source d'ionisation. Ce dispositif vaporise les analytes, leur confère une charge positive ou négative, et les fragmente en ions. Le troisième est l'analyseur qui sépare les ions en fonction de leur masse/charge (m/z). Le quatrième est un détecteur déterminant l'abondance des ions provenant de l'analyseur (plus les ions sont nombreux, plus le courant est intense). Finalement, le signal issu du détecteur est amplifié et adapté pour les traitements informatiques.

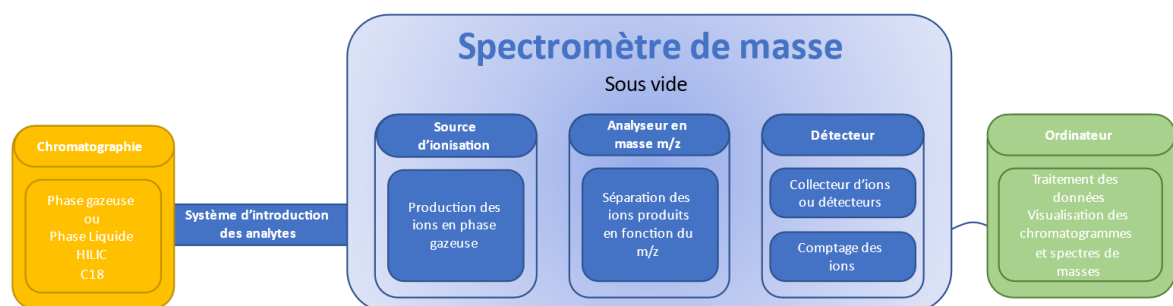


Figure 21 : Schéma de principe d'un spectromètre de masse. Schéma personnel.

L'ensemble matériel du spectromètre RMN par rapport à la spectrométrie de masse est relativement plus simple, bien qu'il soit plus encombrant (Figure 22). Il est composé d'un électroaimant

supraconducteur contenu dans une cuve qui le réfrigère et l'isole de l'environnement extérieur. Ce type d'électroaimant génère des champs magnétiques intenses (jusqu'à 22 teslas). Un canal circulaire (canon de *shim*) contient une sonde électronique. Les échantillons sont glissés à l'intérieur de cette sonde à l'aide d'un passeur robotisé. La sonde contient les bobines radiofréquences émettrice/réceptrice permettant le basculement des spins et la réception des signaux. Les bobines d'excitation et de détection étant couplées, il est nécessaire de les isoler électriquement lors de l'excitation (tension de l'ordre du kV pour les bobines excitatrices contre une tension maximum admissible de quelque μV pour les bobines de détection). Les séquences d'impulsions incluent généralement un délai entre la fin de l'excitation et le début de la détection pour protéger ces bobines.

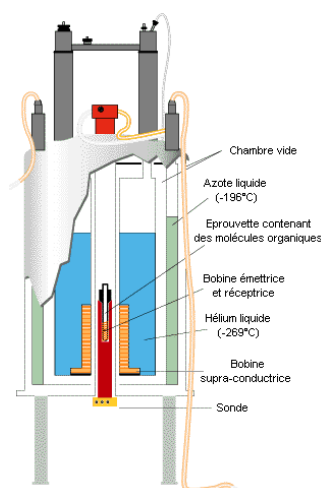


Figure 22 : Schéma d'organisation d'un spectromètre par résonance magnétique nucléaire. D'après (Aroulanda and Billault, 2019)

La **spectrométrie d'absorption par résonance magnétique nucléaire** exploite le phénomène de résonance magnétique nucléaire du proton ^1H . Dans un champ magnétique nul, les spins des noyaux nucléaires prennent n'importe quelle orientation dans l'espace. Lors de l'application d'un champ magnétique intense et uniforme, les noyaux nucléaires de spins non nuls des molécules contenues dans un mélange complexe s'orientent en suivant la direction du champ magnétique IRM (B_0). Les noyaux précessent dans le champ magnétique jusqu'à atteindre une position d'équilibre. Ces noyaux sont ensuite excités par une onde RF, qui fait basculer le spin des noyaux nucléaires suivant l'angle souhaité. La fréquence de résonance d'un noyau est proche de la fréquence de Larmor et est dépendante uniquement du champ magnétique et de la constante gyromagnétique du noyau étudié.

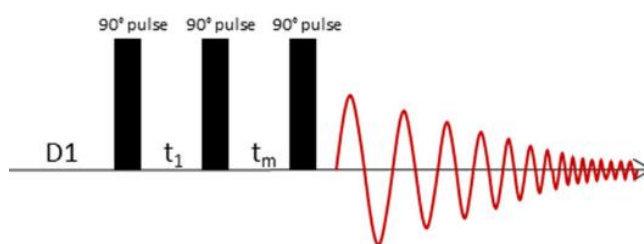


Figure 23 : Séquence d'excitation Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy (NOESY). D'après (Gogiashvili *et al.*, 2019). La séquence NOESY commence par une impulsion de présaturation du signal de l'eau pendant le temps de relaxation (D1). La première impulsion à 90° produit uniquement le basculement transverse du moment magnétique des métabolites, puisque le signal de l'eau a été saturé. Il est suivi d'un

court intervalle t_1 qui est appelé temps de commutation (très court, 2 à 4 μs). La seconde impulsion à 90° fait basculer l'aimantation à 180° selon l'axe z (longitudinal). Pendant le temps t_m après la deuxième impulsion à 90° , la présaturation est réitérée pour saturer à nouveau le signal de l'eau. Le moment magnétique des métabolites n'est pas affecté par cette saturation car il est basculé à 180° . Enfin, la troisième impulsion à 90° fait pivoter l'aimantation des métabolites vers le plan transverse. Pendant le temps d'acquisition, l'aimantation transverse est échantillonnée.

Les séquences d'excitation régissent le comportement des noyaux nucléaires ainsi que la réponse qu'ils génèrent (Figure 23). Ainsi, l'aimantation des noyaux bascule selon un angle déterminé par la durée et l'amplitude de l'excitation RF. Immédiatement après l'arrêt de cette impulsion RF, l'aimantation revient à son état initial. En revenant à cet état, la précession du spin nucléaire induit des courants dans la bobine de détection, permettant de récupérer le signal RMN. Ce signal est appelé *Free Induction Decay* (FID) et représente les relaxations (*i.e.*, retour à l'équilibre) de l'ensemble des noyaux étudiés en fonction du temps.

La fréquence de résonance des noyaux diffère selon plusieurs facteurs. En effet, la nature et la conformation d'une molécule, ainsi que les nombres d'atomes voisins et de liaisons chimiques dans celle-ci, *etc.*, induisent des modifications de la fréquence de résonance propre d'un atome. Le signal FID correspond à la variation d'un signal électrique au cours du temps. La FID comprend la fréquence de résonance, l'amplitude du signal et la décroissance du signal (T_2/T_2^*).

Il s'en suit un certain nombre d'étape de prétraitement du signal. Les étapes de *zero-filling* et d'apodisation (comme le lissage exponentiel LB) sont réalisées pour améliorer la résolution et réduire le bruit de fond du signal FID. L'étape suivante pour l'exploitation des spectres RMN est la transposition du domaine temporel vers le domaine fréquentiel par transformation de Fourier. Toutes les fréquences d'oscillations contenues dans la FID sont extraites et positionnées sur un axe de fréquence qui sera appelé spectre RMN (Figure 24). En exprimant les fréquences de résonance contenue dans la FID par rapport à la fréquence de résonance d'une référence et au champ magnétique B_0 généré par le spectromètre, le déplacement chimique exprimé en ppm, est déterminé. Le déplacement chimique permet de s'affranchir de la puissance de l'aimant du spectromètre et permet d'avoir une échelle « standardisée ». Cette étape rend alors possible la comparaison des spectres RMN obtenus sur des spectromètres RMN ayant des champs magnétiques différents, ou ayant une électronique d'acquisition différente.

Les spectres RMN bruts après transformation de Fourier subissent d'autres processus d'amélioration du signal. Ces post-traitements consistent en une étape de correction de phase et de correction de la ligne de base pour une meilleure exploitation et quantification spectrale. Lorsque ces traitements sont réalisés, l'interprétation des informations spectrales est possible.

Au sein d'une molécule, la fréquence de résonance des protons ^1H est influencée par son environnement chimique (atomes électronégatifs, type de liaison, autres protons, *etc.*). Cette variation de fréquence est exprimée sous la forme d'un déplacement chimique. En effet, la densité d'électrons liée aux atomes voisins du proton étudié modifie le champ magnétique local. Sous l'effet du champ magnétique du spectroscopie RMN, les électrons présents dans l'environnement du proton considéré, engendrent un champ magnétique local qui s'oppose ou s'additionne au champ imposé B_0 , mettant en

évidence le phénomène de blindage ou de déblindage et modifiant ainsi le déplacement chimique de chacun des groupements moléculaires.

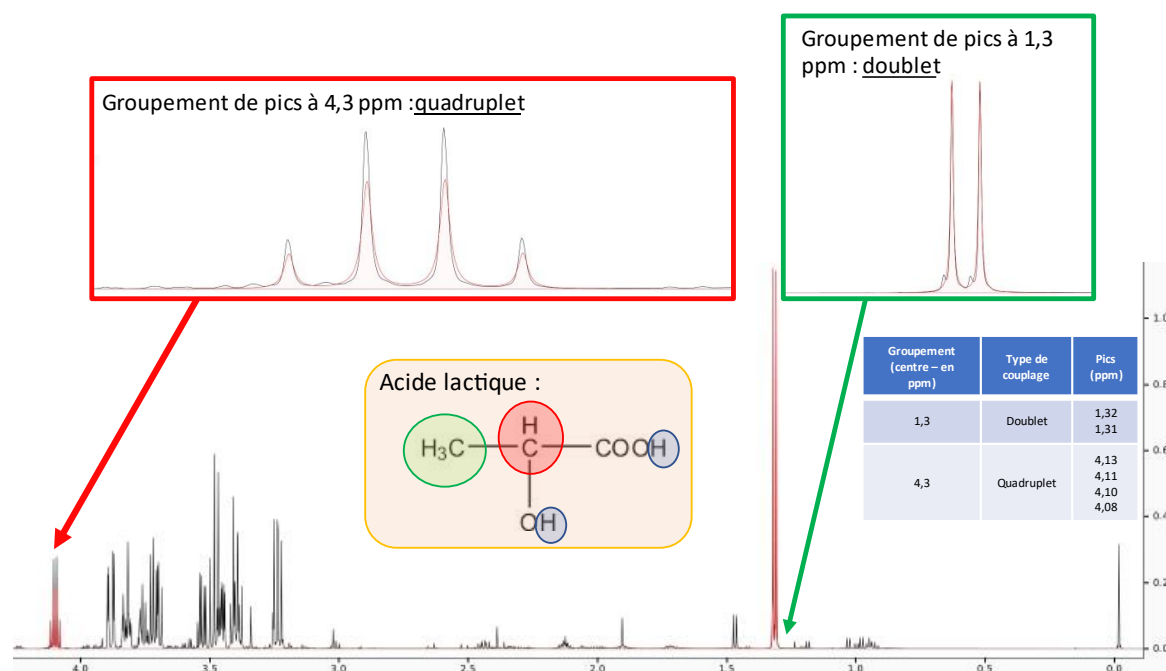


Figure 24 : Exemple de spectre RMN obtenu après traitement des données FID à partir du sérum de rat. L'analyse des pics RMN permet d'identifier les métabolites à partir du déplacement chimique et de leur couplage. À pH 7,2, l'acide lactique (CH₃-CHOH-COOH) s'ionise pour donner du lactate (CH₃-CHOH-COO⁻). Par conséquent, le groupement carboxylique (-COOH) est déprotoné et n'apparaît pas sur le signal RMN. À pH acide, le proton du groupement carboxylique est fortement déblindé du fait de la présence des atomes d'oxygène. Le pic de résonance de ce proton aurait alors un grand déplacement chimique. De plus, le proton du groupe hydroxyle (-OH) est échangé avec le D₂O et n'apparaît également pas sur le signal RMN.

De plus, il est fréquent d'observer la multiplicité d'un pic de résonance sur un spectre RMN. La multiplicité des pics renseigne sur le couplage spin-spin de deux protons non équivalents et correspond à l'interaction entre les spins nucléaires. Ces protons créent réciproquement un champ magnétique local qui modifie très légèrement le champ ressenti. Les groupements de protons apparaîtront sous forme d'un signal représentant un ou plusieurs pics (singulet, doublet, triplet, *etc.*) en fonction du nombre de protons (spins) voisins. La constante de couplage, exprimée en Hz, reflète l'écart entre deux pics au sein du signal RMN et renseigne sur le voisinage du proton. Les protons isochrones, résonnant à la même fréquence, sont caractérisés par le même déplacement chimique. Ainsi, pour une molécule dont les protons sont chimiquement équivalents (*i.e.*, correspond aux protons ayant le même voisinage électronique et subissant les mêmes modifications du champ magnétique local), l'intensité du signal est proportionnelle au nombre de protons (*e.g.*, le TSP a 9 protons équivalents). De ce fait, il est possible d'intégrer les pics de résonance en fonction du nombre de protons présent dans la molécule étudiée. En introduisant une molécule de référence de concentration connue, on peut aisément déterminer la concentration des métabolites en fonction du nombre de proton.

À l'image de la majorité des sciences 'omiques', les méthodes d'analyses métabolomiques génèrent une importante quantité de données : tridimensionnelles pour la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide ; et bidimensionnelles pour la spectroscopie par RMN.

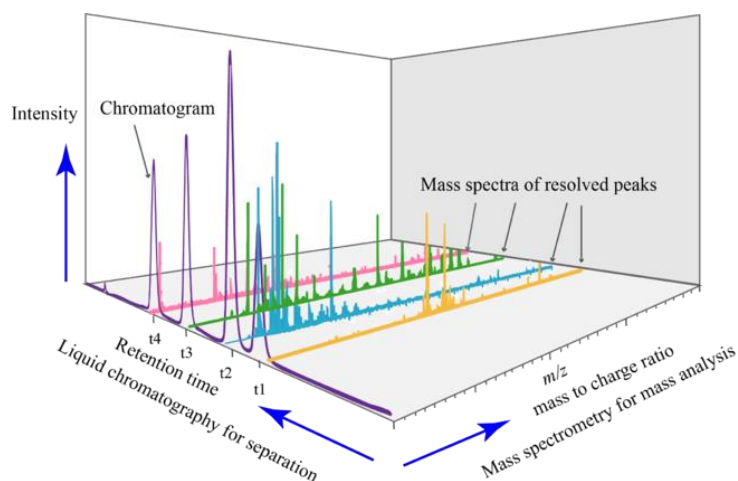


Figure 25 : Données tridimensionnelles issues de la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie. D'après (Norena-Caro, 2017).

En effet, les données issues de la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide sont constituées de trois dimensions (Figure 25) : le temps de rétention dans la colonne chromatographique, le spectre de masse correspondant au temps de rétention, et l'intensité totale des pics du spectre de masse.

L'identification des métabolites dans un mélange complexe analysé par les plateformes analytiques de spectrométrie de masse et par résonance magnétique, fait intervenir un grand nombre d'algorithmes bio-informatiques. En effet, ces processus informatiques sélectionnent les temps de rétention des pics chromatographiques et identifient la masse des fragments en spectrométrie de masse pour former des couples temps de rétention/masse sur charge. Ces couples sont confrontés à une base de données afin d'identifier les métabolites.

De la même manière, toujours à l'aide d'algorithmes bio-informatiques, les spectres RMN sont déconvolués afin de les reconstruire et de déterminer les déplacements chimiques des pics RMN. À l'issue de ce traitement, les pics déterminés sont confrontés à une base de données et permettent d'annoter les molécules présentes dans un spectre RMN.

Ces traitements informatiques sont réalisés à l'aide des logiciels propriétaires (*e.g.*, **ChenomX NMR Suite**, Chenomx Inc., Edmonton, Canada ; **Xcalibur™ Software**, Thermofisher Scientific, Waltham, MA, Etats-Unis) mais également grâce à des outils et plateformes libres et parfois *open-source* (*e.g.*, **ASICS**, **XCMS**, **Workflow4metabolomics**) (Smith *et al.*, 2006; Tautenhahn *et al.*, 2008; Benton *et al.*, 2010; Giacomoni *et al.*, 2015; Guitton *et al.*, 2017; Tardivel *et al.*, 2017; Lefort *et al.*, 2019).

Lorsque les métabolites sont identifiés et quantifiés, un ensemble d'analyses statistiques est réalisé (Tableau 12). Du fait de l'importante quantité de données (nombreuses variables, nombreux individus, plusieurs temps expérimentaux) qui est générée, les approches statistiques multivariées sont privilégiées. Elles incluent des méthodes non supervisées, c'est-à-dire sans connaissance *a priori* de l'appartenance des échantillons à un groupe ; ou à l'inverse des méthodes supervisées qui infèrent

l'appartenance des échantillons à leur groupe respectif. Ces méthodes seront détaillées dans la partie Matériels et Méthodes (pp. 108).

Tableau I2 : Méthodes statistiques typiques pour l'étude des données métabolomiques.

Analyses univariées	Analyses multivariées	
	Non-supervisées	Supervisées
Paramétriques : test t, analyse de la variance (ANOVA), Chi ² , etc.	Analyse en composante principale (ACP), clusterisation hiérarchique, réseaux neuronaux non supervisés, analyse de corrélation	Analyse de régression des moindres carrés partiels, analyses discriminantes, réseaux neuronaux, analyse de régression, arbre de régression
Non paramétriques : Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, test de Dunn, etc.		

Le choix dans l'utilisation de ces méthodes statistiques est principalement conditionné par la question scientifique. Par exemple, la recherche d'un biomarqueur spécifique d'une maladie faisant intervenir une cohorte de patients malades *versus* une cohorte de patients non malades fait appel à des méthodes statistiques multivariées supervisées (*e.g.*, PLS-DA, OPLS-DA, *etc.*). Également, le suivi temporel de l'évolution d'un marqueur au cours du temps au sein d'une population suivie fait plutôt intervenir des statistiques univariées pour mettre en évidence des différences significatives entre les groupes temporels.

Ainsi, les métabolites pertinents qui vont être sélectionnés dépendent de la méthode statistique utilisée (pour revue, Madsen *et al.*, 2010). En effet, les méthodes multivariées supervisées reposent sur l'établissement de modèles statistiques qui prédisent l'appartenance des échantillons à un groupe spécifique. Pour ce faire, ces modèles se basent sur les métabolites qui expliquent les profils métaboliques. Ces métabolites sont caractérisés par une valeur appelée « importance des variables dans la projection » (*variable importance in projection – VIP*). Si la valeur VIP d'un métabolite est supérieure à 1 et si sa variation n'est pas négligeable (*i.e.*, $\log_2[\textit{fold-change}] > 1$), il sera utilisé pour les analyses futures (courbes ROC – *Receiver Operating Characteristic*, analyses de voies métaboliques, *etc.*). De plus, les analyses univariées mettent en évidence les métabolites qui varient significativement entre deux groupes expérimentaux. Ce sont ces métabolites qui sont utilisés lors de l'étude des voies métaboliques dérégulées.

La **recontextualisation des données métabolomiques** autour de la problématique biologique intervient lors de l'analyse des voies métaboliques. L'intérêt de ces analyses réside dans la possibilité de resituer les métabolites au sein du métabolisme d'un être vivant, et d'évaluer les différents liens, réactions ou processus pouvant expliquer un phénotype. Ces méthodes d'analyse utilisent des bases de données (*e.g.*, *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*, *Human Metabolome Database*, *Reactome*, *etc.*) (Kanehisa and Goto, 2000; Wishart *et al.*, 2018; Gillespie *et al.*, 2022) qui établissent les liens réactionnels entre les métabolites, ainsi que les entrées, les sorties et les liaisons métaboliques entre les voies du métabolisme.

(2) Résultats

À ce jour, aucune étude ne s'est intéressée aux conséquences métaboliques dans les compartiments centraux et périphériques suite à la perméabilisation de la BHE par sonoporation.

4. Synthèse

Lors de l'utilisation rationnelle d'un protocole acoustique, les conséquences neurophysiologiques de la perméabilisation de la BHE par sonoporation ont été suivies par IRM et par imagerie TEP. Les chercheurs monitorent la perméabilité de la BHE par IRM de contraste. Cette imagerie évalue en temps réel l'étendue et le volume de la BHE qui est perméabilisée par sonoporation. De plus, des approches d'imagerie TEP du $[^{18}\text{F}]$ FDG et du $[^{18}\text{F}]$ DPA-714 ont respectivement évalué le métabolisme énergétique et la neuroinflammation après la sonoporation. Ces approches n'ont rapporté aucune modification du métabolisme cérébral ou aucune induction d'une neuroinflammation. De plus, les études comportementales n'ont pas mis en évidence de changement dans les performances motrices et cognitives lors des tests imposés aux animaux (rongeurs et PNH) après la sonoporation. Les études histologiques ont décrit, à de rares occasions, l'extravasation non délétère d'érythrocytes et des glioses éparses, notamment lors de l'utilisation d'un protocole sévère et répété de sonoporation. De même, aucune désorganisation vasculaire n'a été observée. D'autres études de transcriptomique ciblées sur les médiateurs de l'inflammation et de l'immunité ont mis en évidence une forte modulation de l'expression des gènes codant pour les médiateurs et les acteurs pro-inflammatoires après la perméabilisation de la BHE par sonoporation. En outre, ces études ont également mis en évidence l'augmentation de la transcription des gènes relatifs à l'angiogenèse, ainsi que la diminution de l'expression des transporteurs moléculaires de la BHE.

La majorité des études ont eu recours à un **dispositif de rétrocontrôle de la pression acoustique délivrée par détection de la cavitation *in vivo*** des microbulles. La technologie de ce dispositif est basée sur la mesure acoustique des harmoniques générées par les microbulles lors de la sonoporation. Par un système de rétrocontrôle, le dispositif contrôle en temps réel la pression acoustique générée par le transducteur, garantissant l'absence de cavitation des microbulles. En effet, il est connu que la cavitation inertielle des microbulles engendre des effets biologiques délétères pour les vaisseaux sanguins et les tissus environnants.

Il est également à noter que les études précliniques ont fait appel à **des protocoles d'anesthésie différents** (chimique ou gazeux). En effet, la plupart des études décrites utilisent l'isoflurane comme anesthésiant principal, avec ou sans adjonction d'oxygène ou d'air. Il a largement été démontré que les gaz inhalés influent sur les **paramètres pharmacocinétiques des microbulles**. Une partie des effets biologiques observés lors de la sonoporation pourraient être modulée uniquement par le choix de l'anesthésie, ainsi que par le choix du gaz adjuvant ou simplement utilisé en supplémentation (Itani and Mattrey, 2012; McDannold *et al.*, 2017).

D'une manière générale, la majorité des études s'accordent à dire que l'innocuité de la sonoporation repose sur la **conception d'un protocole acoustique rationnel** et de son **optimisation**. La détermination des paramètres acoustiques optimaux est requise pour induire l'ouverture de la BHE de

manière fiable, réversible et reproductible sans induire d'hémorragies massives, d'œdèmes ou de dommages tissulaires.

De plus, certaines études se sont penchées sur l'influence des microbulles sur les conséquences physiologiques de la sonoporation. Ces études mettent en exergue l'importance de la **dose administrée**, de la **nature**, de la **fonctionnalisation** et de la **taille** de ces agents de contraste. Une partie des conséquences physiologiques est évaluée par l'**index mécanique**. Bien que cet index soit indiqué dans le cadre de l'imagerie diagnostique ultrasonore, il ne suffit plus pour garantir la sécurité de la sonoporation car il ne prend pas en compte les **phénomènes biologiques qui sont induits par la cavitation des microbulles**. C'est pourquoi il est nécessaire de connaître les effets biologiques de la sonoporation pour pouvoir établir un protocole sûr et efficace afin de perméabiliser transitoirement les barrières endothéliales.

En outre, la sonoporation demeure le cœur d'un certain nombre d'études cliniques humaines à travers le monde. Ces études visent à démontrer l'**efficacité** et l'**innocuité de la perméabilisation de la BHE** par sonoporation dans le cadre d'**affections neurologiques**, telles que la **sclérose latérale amyotrophique**, la **maladie d'Alzheimer**, ou la **démence liée à la maladie de Parkinson** (Lipsman *et al.*, 2018; Abrahao *et al.*, 2019; Gasca-Salas *et al.*, 2021). De plus, la **délivrance de médicaments par sonoporation** est actuellement en phase de test clinique. En effet, elle présente un grand potentiel pour améliorer l'**efficacité** et la **tolérance** des **traitements chimiothérapeutiques** dans le cadre des **glioblastomes** profonds (pour revue, Brighi *et al.*, 2022).

Partie I

État de l'art

Chapitre 4

Problématique



Chapitre 4. Problématique

Comme nous venons de le voir, l'innocuité de la perméabilisation de la BHE par sonoporation a été principalement étudiée et validée par des études précliniques d'imageries anatomiques et fonctionnelles, de comportements, d'anatomopathologies et de biologies moléculaires.

Les études d'imageries anatomiques et fonctionnelles au niveau de la zone cérébrale se sont arrêtées à l'absence d'hémorragies, d'œdèmes ou de dommages tissulaires pour définir l'innocuité de la sonoporation. De nombreuses études ont apporté la preuve histologique que la procédure provoquait, en de rare occasion et lors de l'utilisation d'un protocole acoustique sévère (*i.e.*, IM supérieur 1,4 ; dose de microbulles 10 fois supérieure à la dose clinique pour le diagnostic), l'extravasation d'érythrocytes, une surexpression de la GFAP astrocytaire et des dommages neuronaux. D'autres travaux ont également montré l'apparition ponctuelle d'effets secondaires comportementaux après la sonoporation, notamment chez le PNH. De plus, plusieurs études exploitant les techniques de biologie moléculaire ont montré l'induction d'une inflammation transitoire des vaisseaux et du tissu cérébral après la procédure. En effet, ces travaux de recherches ont particulièrement ciblé leurs approches expérimentales sur l'expression génique des médiateurs et des effecteurs de l'inflammation, de l'immunité, de l'angiogenèse, et des transporteurs de la BHE.

En outre, l'ensemble de ces études met en œuvre des approches longitudinales précoces, présentant les effets quasi immédiats de la sonoporation (*i.e.*, temps expérimentaux compris entre 5 min et 4 jours après la sonoporation). À notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée aux conséquences biologiques plus de 4 jours après la procédure. De plus, aucune étude à ce jour n'a analysé les conséquences de cette perméabilisation sur les autres fonctions neurophysiologiques telles que la neurotransmission.

Dans ce contexte, nous émettons l'hypothèse que la perméabilisation de la BHE par sonoporation pourrait induire une neuroinflammation et moduler la neurotransmission, neutralisant ainsi l'efficacité des molécules thérapeutiques, et causant potentiellement des effets indésirables graves annulant le bénéfice de cette méthode.

Ce travail de thèse a pour objectif d'étudier les conséquences neurophysiologiques de la perméabilisation de la BHE par sonoporation à court (3 h après la procédure), à moyen (48 h) et à long terme (1 semaine). Nous explorerons dans un premier temps les conséquences neurophysiologiques par une étude histologique des tissus cérébraux afin d'explorer les éventuels changements cytoarchitecturaux, et d'étudier les marqueurs de la neuroinflammation et de la neurotransmission. Puis nous déterminerons au niveau transcriptomique, puis métabolomique les conséquences biologiques de la perméabilisation de la BHE par sonoporation.

Pour atteindre ces objectifs, nous avons mis au point un modèle animal de la perméabilisation de la BHE par sonoporation du noyau caudé putamen chez le rat sain. Le noyau caudé putamen est l'un des principaux noyaux des ganglions de la base, et constitue avec le noyau accumbens la structure fonctionnelle appelée striatum (Herrero *et al.*, 2002). Cette structure possède plusieurs neurotransmissions et régule un grand nombre de processus cognitifs (striatum ventral) et moteurs

(striatum dorsal) chez les mammifères. En effet, cette structure cérébrale fonctionnelle est l'une des principales structures impliquées dans plusieurs maladies neurodégénératives telles que les maladies de Parkinson et d'Huntington (Bloem *et al.*, 2021; Pan and Feigin, 2021). Elle prend donc tout son intérêt car elle est la cible potentielle de nouvelles stratégies thérapeutiques, comme par exemple la délivrance de gènes thérapeutiques ou de cellules souches réparatrices des voies dopaminergiques (Gaillard and Jaber, 2011).

Partie II

Matériel et méthodes

Chapitre 1

Matériel et dispositifs ultrasonores



II.	Matériel et méthodes	85
Chapitre 1.	Matériel et dispositifs ultrasonores	85
1.	Dispositif ultrasonore	85
2.	Banc de mesures ultrasonores	85
3.	Caractérisation du transducteur ultrasonore	85
a)	Sensibilité du transducteur	85
b)	Profils en deux dimensions du faisceau généré par le transducteur	86

II. Matériel et méthodes

Chapitre 1. Matériel et dispositifs ultrasonores

1. Dispositif ultrasonore

Un transducteur mono-élément d'une fréquence centrale de 1 MHz, d'un diamètre de 49 mm et d'une distance focale de 49 mm a été utilisé dans le cadre de cette thèse. Le signal électrique est généré par un générateur de fonction arbitraire 33220A (Agilent Technologies Inc. ; Santa Clara ; CA ; Etats-Unis) qui est amplifié par un amplificateur de puissance RF AAP-0.2-6-D (ADECE ; Vallauris ; France). Un adaptateur rempli d'eau dégazée est fixé sur la tête du transducteur afin de contrôler la profondeur de pénétration du faisceau ultrasonore dans le tissu lors de la perméabilisation *in vivo* de la BHE.

2. Banc de mesures ultrasonores

La caractérisation du transducteur (sensibilité, profil 2D) est réalisée dans une cuve remplie d'eau dégazée. Le champ acoustique est mesuré à l'aide d'un hydrophone à capsule HGL-0200 (ONDA Corporation ; Sunnyvale ; CA ; Etats-Unis). L'hydrophone est connecté à son préamplificateur AG-2010 (ONDA Corporation ; Sunnyvale ; CA ; Etats-Unis) augmentant le signal de +20 dB. L'ensemble est relié à l'oscilloscope TDS 3044B (Tektronix Inc ; Beaverton ; OR ; Etats-Unis) en liaison avec un ordinateur exécutant le logiciel MATLAB™ (Mathworks ; Natick ; MA ; Etats-Unis) qui permet l'acquisition des signaux. Le déplacement de l'hydrophone sur les trois axes X, Y et Z est assuré par un bras robotisé (OWIS ; Staufen im Breisgau ; Allemagne) relié au contrôleur de moteur DC-500 (OWIS ; Staufen im Breisgau ; Allemagne). L'axe X correspond à la dimension latérale ; l'axe Y correspond à l'élévation ; et l'axe Z correspond à la profondeur. Le banc de mesure est organisé de cette manière : la sortie du générateur de fonction arbitraire 33220A est connectée à l'entrée de l'amplificateur de puissance AAP-0.2-6-D, dont la sortie est reliée au transducteur. L'hydrophone HGL-0200 est relié à son préamplificateur AG-2010, lui-même relié à l'oscilloscope TDS 3044B. L'oscilloscope et le contrôleur de moteur DC 500 sont reliés à un ordinateur à travers leur interface respective.

3. Caractérisation du transducteur ultrasonore

a) Sensibilité du transducteur

L'hydrophone est placé au niveau du point focal du transducteur muni de son cône acoustique. Les ultrasons sont générés de manière pulsée. Les paramètres acoustiques sont : PRF 4 Hz, la longueur et la durée des pulsations 10 cycles, soit 10 μ s. L'amplitude du signal électrique au générateur est augmentée de 20 mVpp (mV pic-à-pic) jusqu'à 170 mVpp par pas de 10 mVpp. L'hydrophone mesure la pression acoustique développée par le transducteur sous la forme d'une tension électrique. Les signaux sont acquis *via* l'oscilloscope relié à un ordinateur exécutant le logiciel MATLAB™. Les fichiers MAT sont chargés dans le logiciel R grâce au package *R.matlab*. Les données sont formatées de manière à obtenir un tableau exprimant la valeur absolue du minimum de la tension en fonction de l'amplitude du signal électrique au générateur. La tension est convertie en pression acoustique par l'application d'un facteur de conversion donné par le fabricant lors de l'étalonnage du transducteur. Finalement, la courbe de sensibilité est tracée.

L'équation de la droite reliant la tension du générateur à la pression acoustique au point focal du transducteur est déterminée par régression linéaire.

b) Profils en deux dimensions du faisceau généré par le transducteur

Le banc de mesure pour établir les profils 2D du transducteur (en XY et en XZ) est le même que pour déterminer la sensibilité du transducteur. Les paramètres acoustiques sont également les mêmes, à l'exception de la pression acoustique. L'amplitude du signal électrique au générateur est réglée de manière à produire une pression acoustique de 0,6 MPa au point focal.

L'hydrophone est placé au niveau du point focal du transducteur muni de son cône adaptateur. Il est ensuite déplacé pour être au plus proche et au centre de la membrane du cône adaptateur. Les coordonnées affichées sur le contrôleur du moteur correspondront au point d'origine de la mesure. Un script exécuté sous le logiciel MATLAB™ fournit une interface de contrôle pour déterminer les profils 2D du faisceau acoustique généré par un transducteur. Il est nécessaire de renseigner le pas de déplacement du robot dans les axes X, Y et Z. Pour avoir une image de bonne qualité, le pas est de 0,25 mm dans tous les axes. Il est également nécessaire de spécifier la taille de l'image. Pour le profil XY, les dimensions de la fenêtre d'acquisition sont de 36 mm en latéral (axe X) par 36 mm en élévation (axe Y). Pour le profil XZ, les dimensions de la fenêtre d'acquisition sont de 32 mm en latéral (axe X) par 20 mm en profondeur (axe Z). L'exposition aux ultrasons, le balayage et la mesure de la pression acoustique sont lancés simultanément. Les matrices de données sont importées dans le logiciel R à l'aide du package *R.matlab*. À l'instar de la mesure de la sensibilité, les tensions mesurées par l'hydrophone sont converties en pression acoustique. Les cartes de distribution de la pression acoustique sont établies en fonction des coordonnées selon XY et selon XZ.

Partie II

Matériel et méthodes

Chapitre 2

Expérimentation animale



II.	Matériel et méthodes	85
Chapitre 2.	Expérimentation animale	89
1.	Hébergement des animaux	89
2.	Procédures communes	89
a)	Anesthésie	89
b)	Placement stéréotaxique	89
c)	Chirurgie préparatoire	89
d)	Ouverture acoustique de la BHE	90
e)	Procédure post-opératoire	90
f)	Sacrifice et perfusion des animaux	90
3.	Contrôle de la perméabilisation de la BHE	90
4.	Détermination des coordonnées et de la pression acoustique optimales pour la perméabilisation de la BHE dans le striatum	91
5.	Evaluation de la cinétique de fermeture de la BHE	91

Chapitre 2. Expérimentation animale

Les procédures ont été approuvées par le comité régional d'éthique en matière d'expérimentation animale de la région Centre Val-de-Loire (N° de saisine : 2018011016593068) en accord avec la directive européenne 2010/63/EU concernant l'expérimentation animale.

1. Hébergement des animaux

Les rats de la souche Sprague-Dawley (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) sont hébergés dans une animalerie disposant d'un cycle d'éclairage 12h/12h avec accès *ad libitum* à la nourriture et à l'eau. L'âge de ces rats à date de réception est de 7 semaines. Leur poids moyen après la semaine d'acclimatation réglementaire est de 340 g (\pm 12 g). Les rats sont aléatoirement répartis par groupe de 4 animaux au sein de chaque cage.

2. Procédures communes

a) Anesthésie

La salle d'expérimentation est préparée en l'absence des animaux. Un temps d'acclimatation est respecté pour diminuer le stress des animaux. Chaque rat est isolé et placé dans une boîte étanche pour recevoir l'induction de l'anesthésie par isoflurane (5%, 2 L/min O₂). Lorsque le rat est endormi, une injection intrapéritonéale d'un mélange de xylazine (7 mg/kg; Rompun®; Elanco; Cuxhaven; Allemagne) et de kétamine (70 mg/kg; Kétamine 1000®; Virbac; Carros; France) est réalisée. Durant la procédure d'anesthésie, une attention particulière est portée sur la ventilation et la fréquence cardiaque de chaque animal. Lorsque l'animal atteint une anesthésie profonde (test de pincement de la patte, test du réflexe palpébral), un cathéter caudal 24G est placé pour permettre l'injection intraveineuse des microbulles. La tête de chaque animal est rasée.

b) Placement stéréotaxique

L'animal est ensuite placé dans le cadre stéréotaxique modèle 963 (Kopf Instruments; Tujunga; CA; Etats-Unis). Ce cadre est composé de deux barres d'oreilles ainsi que d'une barre de gueule. Ces barres maintiennent la tête de l'animal immobile de manière reproductible. De plus, un bras orientable sur les trois axes (dorso-ventral, cranio-caudal et horizontal) autorise le déplacement du transducteur ultrasonore. Lorsque l'animal est placé, une solution de protection de la cornée est instillée (Ocrygel; TVM; Lempdes; France) sur chaque œil pour éviter leur assèchement. Un coussin chauffant est glissé entre le cadre stéréotaxique et l'animal pour maintenir sa température corporelle à 37°C. De plus, un pad absorbant les ultrasons est placé en dessous de la tête de l'animal.

c) Chirurgie préparatoire

La peau du crâne est incisée en Y à l'aide d'un scalpel, et les tissus sont écartés pour libérer le champ opératoire de manière à voir les sutures entre les os pariétaux et l'os frontal. En stéréotaxie, le point d'intersection entre les sutures sagittale et coronale délimite le bregma, qui est l'un des points de référence pour les coordonnées stéréotaxiques. Le transducteur muni de son cône adaptateur rempli

d'eau dégazée et d'un cône de centrage est placé au-dessus du bregma. Les axes étant dotés de verniers et de réglottes, les coordonnées initiales sont relevées et constituent le point de référence initial. Le cône de centrage est alors retiré. La zone opératoire est enduite de gel échographique pour assurer le couplage externe, et le transducteur est descendu de manière à respecter la profondeur déterminée pour atteindre notre structure d'intérêt.

d) Ouverture acoustique de la BHE

Un volume de 100 μL de microbulles Vevo MicroMarker[®] ($2,5 \times 10^8$ MBs/mL ; Fujifilm-Visualsonic ; Amsterdam ; Pays-Bas) est injecté par la voie intraveineuse préalablement posée au niveau de la veine caudale. Cette administration est suivie de l'injection d'un volume de 100 μL d'une solution de chlorure de sodium à 9 %. Immédiatement après l'injection des microbulles, la zone d'intérêt est exposée aux ultrasons pendant 30 secondes avec une fréquence de répétition des impulsions (PRF) de 1 Hz et 10 000 cycles par impulsion, ce qui équivaut à une durée d'impulsion (BL) de 10 ms. Le rapport cyclique (DC) est de 1%.

e) Procédure post-opératoire

La peau du crâne des animaux est aseptisée et recousue. Le cathéter caudal est retiré et un pansement est placé. Les animaux sont isolés jusqu'à leur réveil (si besoin) puis sont replacés dans leur cage respective. Le suivi post-opératoire est réalisé pendant toute la durée du protocole expérimental. Une attention particulière est portée aux variations du comportement des animaux (*i.e.*, ventilation, locomotion, appétit, toilette, agressivité, peur, *etc.*). Un suivi du poids corporel des animaux est également réalisé.

f) Sacrifice et perfusion des animaux

Tous les animaux sont sacrifiés par surdosage d'anesthésique (*i.e.*, 3 fois la dose normale). Une dissection cardio-thoracique est réalisée afin de donner l'accès au cœur de l'animal. Le ventricule cardiaque gauche est canulé et l'oreillette cardiaque droite est sectionnée. Un volume de 200 mL d'une solution de chlorure de sodium à 9% chauffée à 37°C est perfusée grâce à une pompe péristaltique dans le système circulatoire pour l'exsanguination. L'animal est décapité et le crâne est décortiqué. Le cerveau est retiré, et selon l'approche est : soit surgelé dans un mélange d'isopentane et de carboglace ; ou soit disséqué pour récupérer la région d'intérêt, le striatum. Pour l'approche histologique, les cerveaux sont introduits dans un godet en plastique puis conservés au congélateur à -80°C avant la coupe au cryostat.

3. Contrôle de la perméabilisation de la BHE

Le bleu d'Evans est l'un des colorants qui peut être injecté dans un organisme vivant pour évaluer l'intégrité d'une barrière endothéliale. D'un poids moléculaire de 961 Da, ce colorant a la capacité de se lier aux protéines et aux tissus. Il peut être détecté visuellement par observation au stéréoscope ou au microscope optique et à fluorescence. En effet, le bleu d'Evans est naturellement fluorescent (Saria and Lundberg, 1983). Sa longueur d'onde d'absorption est située entre 470 nm et 540 nm et sa longueur d'onde d'émission est située à 680 nm. Il est donc possible de le quantifier grâce à des techniques de

spectrophotométrie. Il ne traverse pas nativement les barrières endothéliales. Il doit se lier à l'albumine sérique qui traverse les barrières endothéliales ouvertes. De ce fait, sa liaison à l'albumine évalue la perméabilité vasculaire des macromolécules (poids moléculaire total de 69 kDa). Dans le cas de l'ouverture artificielle ou lésionnelle de la BHE, le colorant lié à l'albumine franchit la barrière et s'accumule dans le tissu pour visualiser la zone ouverte et/ou lésée. Le bleu d'Evans est préparé à 2% (masse/volume) en solution de chlorure de sodium à 9%. Cette solution est injectée par voie intraveineuse à raison de 5 mL/kg.

4. Détermination des coordonnées et de la pression acoustique optimales pour la perméabilisation de la BHE dans le striatum

Les coordonnées stéréotaxiques délimitant le striatum ont été déterminées à l'aide de l'atlas stéréotaxique de Paxinos et Watson (Paxinos and Watson, 2013). Les coordonnées retenues par rapport au bregma sont :

- Antéropostérieur (AP) : entre -0,5 et 0,5 mm ;
- Latéralité (L) : entre $\pm 1,5$ mm et ± 5 mm ;
- Profondeur (P) fixée à 5 mm.

À partir de ces coordonnées de base, plusieurs combinaisons (AP, L) ont été testées pour la perméabilisation de la BHE du striatum. La profondeur peut être ajustée en ajoutant ou pas des bagues dans l'adaptateur lors de l'installation du transducteur. Après l'exposition aux ultrasons, le bleu d'Evans est injecté par voie intraveineuse à raison de 5 mL/kg. Le bleu d'Evans donne une indication sur la localisation, l'étendue et l'intensité de la perméabilisation de la BHE. Une première série d'expérience a déterminé les coordonnées optimales pour cibler le centre de notre structure d'intérêt.

Lors d'une seconde série d'expérience, la pression acoustique optimale requise pour une perméabilisation transitoire de la BHE sans induire de dommages tissulaires a été déterminée. Pour cela, le striatum des rats est exposé aux ultrasons focalisés développant les pressions acoustiques suivantes : 0 MPa ; 0,6 MPa ; 0,8 MPa ; et 1,2 MPa. Les index mécaniques (IM), ou *mechanical index* (MI) en anglais (Equation 1), définis comme étant la pression acoustique (PNP) divisée par la racine carrée de la fréquence (f) sont respectivement de 0,6, 0,8 et 1,2. Une solution de bleu d'Evans est injectée par voie intraveineuse. Les animaux sont ensuite sacrifiés et perfusés par une solution de chlorure de sodium à 9%, 37°C et les cerveaux sont récupérés. Ils sont ensuite inspectés visuellement et par loupe binoculaire pour déceler d'éventuels dommages tissulaires ou hémorragies. Les cerveaux sont ensuite coupés en deux au niveau de l'extravasation du bleu d'Evans pour en évaluer la profondeur.

$$\text{Equation (1) : } IM = \frac{PNP \text{ (en MPa)}}{\sqrt{f} \text{ (en MHz)}}$$

5. Evaluation de la cinétique de fermeture de la BHE

La cinétique de fermeture de la BHE a également été évaluée en se basant sur les coordonnées stéréotaxiques et la pression acoustique optimale déterminées précédemment. Les animaux reçoivent

une injection par voie intraveineuse de bleu d'Evans 1 h, 3 h, 48 h et 1 semaine après l'exposition du striatum aux ultrasons. Le colorant circule pendant une heure avant le sacrifice. Les animaux sont sacrifiés et perfusés conformément à la procédure décrite précédemment. Les cerveaux entiers sont ensuite inspectés visuellement et par loupe binoculaire pour évaluer l'intensité et l'étendue de l'extravasation du bleu d'Evans.

Partie II

Matériel et méthodes

Chapitre 3

Transcriptomique



II.	Matériel et méthodes	85
Chapitre 3.	Transcriptomique.....	95
1.	Extraction des ARN totaux	95
2.	Séquençage des ARN messagers	95
3.	Traitement des données.....	95

Chapitre 3. Transcriptomique

1. Extraction des ARN totaux

Le tissu cérébral (striatum sonoporé) est broyé pendant 20 s à l'aide d'un homogénéiseur Minilys Personal (Bertin Instruments ; Montigny-le-Bretonneux ; France) dans des tubes contenant des billes en céramique de 1,4 mm et du TRIzol™ (ThermoFisher ; Waltham ; MA ; Etats-Unis). Les ARN totaux sont extraits avec le kit d'extraction ARN Direct-zol™ RNA Miniprep (Zymo Research ; Irvine ; CA ; Etats-Unis). Le contrôle de la qualité est assuré par un dosage au spectrophotomètre Qubit® (ThermoFisher) et au Nanodrop™ (ThermoFisher), ainsi que par une électrophorèse sur gel d'agarose (1% agarose, TBE 1X, 1 kB DNA ladder – NEB ; Ipswich ; MA ; Etats-Unis) mettant en évidence les ARN ribosomiaux 28S et 18S. Les échantillons ont ensuite été envoyés à la société Integragen (Evry ; France) pour le séquençage.

2. Séquençage des ARN messagers

Le séquençage du transcriptome a consisté en la réalisation d'une banque d'ADN orientée à partir des échantillons d'ARN totaux à l'aide du kit NEBNext® Ultra™ II mRNA-Seq (NEB ; Ipswich ; MA ; Etats-Unis). Les étapes clés de ce protocole sont : (i) la purification des ARNm contenant les queues poly A en utilisant des amorces poly dT attachées à des billes magnétiques. Les ARNm sont purifiés par affinité et sont ensuite fragmentés en utilisant des cations divalents à haute température pour obtenir approximativement des fragments de 300 pb ; (ii) la transcription inverse des ARNm pour synthétiser de l'ADNc double brins. Ces brins sont liés aux adaptateurs Illumina® ; et enfin (iii) l'amplification de cette librairie par PCR pour le séquençage. Le séquençage haut débit est réalisé sur un séquenceur HiSeq4000 (Illumina Inc. ; San Diego ; CA ; Etats-Unis) en lecture « *paired-end* » de 2 fois 75 nucléotides par échantillon. Le séquençage « *paired-end* » implique la lecture des deux extrémités 5' et 3' des fragments d'ADNc. Un *read* sera lu alors comme une paire. Cette méthode améliore la précision de l'alignement des *reads* et autorise la détection des inclusions et des délétions (SNP).

3. Traitement des données

Le traitement des données brutes est réalisé par la société Integragen. Le contrôle qualité des *reads* est effectué grâce au logiciel *FastQC*. Les séquences de *reads* sont alignées sur le génome de référence (*Rat genome rn6*) à l'aide du logiciel STAR (Dobin *et al.*, 2013). Les gènes détectés sont quantifiés et annotés durant l'alignement par le logiciel STAR à l'aide de la base de données *Ensembl Rnor 6.0.96*. Le comptage brut du nombre de *reads* pour un gène donné est réalisé par le logiciel *HTSeq tool* (Anders *et al.*, 2015). Ces comptages sont normalisés en fragments par kilobase million (FPKM). Seuls les gènes avec un FPKM supérieur à 0.1 ont été retenus pour les analyses futures.

L'analyse des données de séquençage est réalisée par la société Integragen à travers deux types d'analyses : des analyses multivariées non supervisées et des analyses statistiques univariées. Les résultats du comptage par *HTSeq* sont importés dans le logiciel R grâce au package *edgeR* (Robinson and Oshlack, 2010). Les données de comptage sont exprimées en logarithme base 2 du compte par

millions des séquences lues par le séquenceur en utilisant la normalisation « *trimmed mean of M-values* ». La matrice normalisée d'expression des 1 000 gènes les plus variants, en se basant sur l'écart-type, est utilisée pour classer les échantillons qui semblent partager un même profil d'expression génique. Des analyses en composantes principales (distance Euclidienne), un *clustering* hiérarchique (méthode de Ward) et un *clustering* par consensus (package R *ConsensusClusterPlus*) sont réalisés. Le *clustering* par consensus est une méthode non supervisée de découverte de classe (ou *cluster*) qui donne une valeur quantitative pour déterminer le nombre et l'appartenance des hypothétiques *clusters* au sein des données issues des expériences omiques (*RNAseq, microarray, etc.*). Cette méthode combine les résultats de plusieurs algorithmes de *clustering* pour trouver les clusters les mieux adaptés pour expliquer la variance des échantillons d'un jeu de données. La division par consensus des données est établie de 2 à 8 clusters en réalisant 1 000 itérations de rééchantillonnage (80% des gènes et 80% des échantillons) en se basant sur les dissimilarités de Pearson comme métrique de distance et sur la méthode de Ward pour l'analyse des liens. Les fonctions de distribution cumulative (CDF) des matrices de consensus sont utilisées pour déterminer le nombre optimal de *clusters* en considérant l'allure de la fonction et l'aire sous les courbes CDF (Monti *et al.*, 2003).

L'analyse de l'expression différentielle est réalisée grâce au package R *limma* (Ritchie *et al.*, 2015). Le package *limma* est une solution clé-en-main pour analyser les données d'un *RNAseq* issues d'expérimentations mobilisant peu d'échantillons. Il applique des algorithmes statistiques qui permettent l'adaptation de l'information (estimateur de la variance), la pondération quantitative (autorisant la variation de qualité au sein du jeu de données), la modélisation de la variance (rendre compte de l'hétérogénéité biologique et/ou technique) et le prétraitement des données (réduction du bruit). De plus, les données sont transformées grâce à l'algorithme *voom* (Law *et al.*, 2014). Cette transformation convertit les données de comptage (FPKM) en logarithme base 2 du comptage par million. Elle estime la relation entre la moyenne et la variance dans le jeu de données pour calculer un coefficient de pondération pour chaque observation. En effet, le comptage brut montre une augmentation de la variance en fonction de l'augmentation du nombre de comptage, alors que les logarithmes du comptage des *reads* tendent à diminuer leur moyenne et leur variance. En bref, elle permet de passer d'une distribution binomiale négative à une distribution normale autorisant l'utilisation de tests statistiques, tel que le test t de Student.

La classification des gènes dérégulés est réalisée à l'aide de R *via* l'utilisation de plusieurs packages R (*i.e.*, *biomaRt, biomart, GOplot, ReactomePA*) par confrontation à plusieurs bases de données (*i.e.*, *Gene Ontology, Reactome, Ensembl*). BiomaRt est une interface dont le but est de fournir toutes les informations connues sur un gène. Son interface est implémentée sur R et fait le lien entre les outils d'analyses bio-informatiques (Durinck *et al.*, 2005, 2009). Le projet *Gene Ontology* consiste à rassembler les gènes en classes (ou termes – *terms* en anglais) en fonction des relations qui existent entre eux (Gene Ontology Consortium, 2015; Walter *et al.*, 2015). Ces classes sont elles-mêmes regroupées en trois domaines biologiques : la fonction moléculaire (*molecular function*) décrivant l'activité au niveau moléculaire du produit génique ; le composant cellulaire (*cellular component*) représentant la localisation/compartiment cellulaire où s'exerce l'activité du produit génique ; et le processus biologique (*biological process*) qui comprend un ensemble de fonctions moléculaires

régissant une grande fonction biologique. La base de données *Ensembl* contient le génome des vertébrés. La base de données *Reactome* est une base de données gratuite, open-source, organisée et évaluée par les pairs, qui comprend les voies de signalisation cellulaire et métabolique (Jassal *et al.*, 2020; Howe *et al.*, 2021; Gillespie *et al.*, 2022). À partir de ces informations, une carte de réseau est réalisée avec le package *ReactomePA*, mettant en relation les gènes significativement dérégulés ($p\text{-value} < 0,05$; $q\text{-value} < 0,1$; $\log_2(\text{FC}) > 1$) avec les processus biologiques attenants aux gènes (Yu and He, 2016).

Partie II

Matériel et méthodes

Chapitre 4

Métabolomique



II.	Matériel et méthodes	85
	Chapitre 4. Métabolomique	101
1.	Prélèvements des matrices biologiques	101
2.	Traitements pré-analytiques	102
3.	Contrôle qualité	104
4.	Acquisition des données	104
	a) Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse	104
	b) Dosage des dérivés du tryptophane.....	105
	c) Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire.....	106
5.	Prétraitement des données.....	106
	a) Données de spectroscopie par RMN	106
	b) Données de HPLC-MS	106
6.	Traitements statistiques des données.....	107
	a) Calcul des coefficients de variation.....	107
	b) Fusion des données provenant des méthodes analytiques.....	107
	c) Normalisation	107
	d) Analyses multivariées	108
	e) Analyses univariées.....	108
	f) Analyses des voies métaboliques impactées.....	108

Chapitre 4. Métabolomique

1. Prélèvements des matrices biologiques

a) Striatum

Les cerveaux sont retirés de la boîte crânienne uniquement après la sonoporation. Les animaux sont sacrifiés et perfusés conformément aux procédures précédemment décrites (pp. 89). Les structures des cerveaux sont disséquées afin de récupérer le striatum ipsilatéral et controlatéral.

b) Liquide cérebrospinal

Le liquide cérebrospinal (LCS) est ponctionné uniquement après la sonoporation. La nuque du rat est rasée et dépilée. La zone est désinfectée par application d'une compresse imbibée d'alcool à 70°. La méthode décrite ici est inspirée des travaux de Ceaglio *et al.*, et Nirogi *et al.*, (Nirogi *et al.*, 2009; Ceaglio *et al.*, 2013). Sous anesthésie, le rat est placé dans le cadre stéréotaxique, où seulement les barres d'oreilles sont placées. Ainsi, la rotation de la tête autour de l'axe médiolatéral est autorisée. Le corps de l'animal doit être maintenu à l'horizontal, parallèle à la plaque du cadre stéréotaxique. La tête de l'animal est orientée selon un angle de 15° à 20° afin de dégager l'ouverture du foramen occipital de la vertèbre C1 (atlas). Elle est maintenue en place par la barre de gueule. Le site de prélèvement se trouve à l'intersection de la ligne formée par la protubérance occipitale et la colonne vertébrale, avec la ligne formée par les deux processus mastoïdes. Une aiguille papillon 27G munie d'un tube relié à une seringue de 1 mL est introduite perpendiculairement à l'horizontale afin d'atteindre la *cisterna magna*. Une légère dépression est produite par retrait du piston. Lors de l'introduction de l'aiguille, une résistance est ressentie jusqu'au perçage de la membrane méningée. À ce moment, la légère dépression permet l'aspiration du liquide cérebrospinal. Un volume de 200 µL de LCS est prélevé et constitue le volume limite maximum avant le sacrifice des animaux. Les échantillons de LCS sont conservés sur glace avant d'être centrifugés à 10 000 g pendant 15 minutes à 4°C. Enfin, le surnageant est transféré dans un tube Eppendorf propre pour être stocké à -80°C.

c) Sérum

Le sang est recueilli avant et après la sonoporation. Avant la procédure, le sang est prélevé au niveau de la veine caudale latérale en utilisant un cathéter 24G. Après la procédure, les animaux sont sacrifiés puis le sang est directement ponctionné dans l'oreillette droite. Il est nécessaire de conserver un sang veineux. Pour obtenir le sérum à partir du sang, il doit coaguler. Les échantillons de sang sont donc placés sur glace et le sang coagule *a minima* 30 minutes après le prélèvement. Ces échantillons coagulés sont ensuite centrifugés à 10 000 g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant (*i.e.*, le sérum) est transféré dans un tube Eppendorf propre pour être stocké au congélateur à -80°C.

d) Urine

Avant la procédure, les urines sont recueillies lorsque les rats sont vigiles. Les rats sont positionnés sur une paille préalablement recouverte de film plastique. Lorsque l'animal a fait ses besoins, les urines sont recueillies à l'aide d'une seringue et sont transvasées dans des tubes Eppendorf. Après la

procédure de perméabilisation de la BHE, les rats sont toujours anesthésiés. Un tube Eppendorf est placé de manière à recueillir les urines directement au niveau du pénis.

2. Traitements pré-analytiques

Le traitement pré-analytique correspond à la préparation des échantillons et à l'extraction de leurs métabolites. Selon la méthode analytique, les échantillons sont extraits et conditionnés de manière différente. Pour les expériences de spectrométrie par RMN, le tampon phosphate est préparé avec de l'eau lourde (D₂O) à une concentration de 0,2 M avec un pH de 7,4.

a) Striatum

Les échantillons de striatum sont lyophilisés (-150°C sous vide pendant 24 h) puis réduits mécaniquement en poudre.

En spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide (HPLC-MS), les poudres de tissus sont pesées de manière à obtenir une masse de 3 mg. Ces échantillons sont extraits à deux reprises. Un volume de 100 µL d'une solution contenant les étalons internes est ajouté pour rendre possible le dosage des dérivés du tryptophane. Un volume de 650 µL d'un mélange d'acétonitrile/eau (1:1) est adjoint au mélange précédent. Les échantillons sont agités à l'aide d'un vortex pendant 5 secondes puis sont agités pendant 30 minutes à 4°C sur plaque agitante. Après cette agitation, les échantillons sont centrifugés à 4 600 g à 4°C pendant 20 minutes. Le surnageant est prélevé puis est transvasé dans un flacon pour évaporation au SpeedVac (4 h à 35°C sous vide ; Thermofisher Scientific ; Waltham ; MA ; Etats-Unis). La seconde extraction intervient sur le culot restant après transvasement du surnageant dans un autre tube. Un volume de 750 µL d'un mélange d'acétonitrile/eau (1:1) est ajouté. Comme précédemment, les échantillons sont agités à l'aide d'un vortex, incubés sous agitation à 4°C puis centrifugés. Le surnageant est prélevé puis est évaporé avec la première extraction. Lorsque les solvants sont évaporés, les concentrats sont repris dans 200 µL d'un mélange d'acétonitrile/eau (9:1). Un volume de 100 µL est réservé pour la colonne HILIC, tandis que le volume de 100 µL restant est de nouveau évaporé puis est resuspendu dans un mélange méthanol/eau (1:9) pour la colonne C18.

En spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN), la masse restante de poudre est pesée. L'extraction des métabolites est adaptée du protocole décrit par Wu *et al.* (Wu *et al.*, 2008). Un volume de 400 µL de méthanol froid (-20°C) et 125 µL d'eau pure est ajouté aux échantillons. Ils sont ensuite agités à l'aide d'un vortex. Un volume de 400 µL de chloroforme dilué avec 275 µL d'eau pure est ajouté au mélange précédent. Le mélange est agité pendant 1 minute à l'aide d'un vortex. Les échantillons sont incubés pendant 10 minutes au congélateur à -20°C puis sont centrifugés à 15 000 g à 4°C pendant 10 minutes. La phase aqueuse est récupérée puis est évaporée au SpeedVac (2 h à 35°C sous vide). Après l'évaporation, les échantillons sont resuspendus dans 200 µL de tampon phosphate + D₂O et 10 µL d'acide triméthylsilylpropanoïque à 3,2 mM.

b) Liquide cérebrospinal

En HPLC-MS, 50 μL des échantillons sont prélevés auxquels sont ajoutés 100 μL d'une solution étalon pour le dosage des dérivés du tryptophane. Un volume de 300 μL de méthanol froid (-20°C) est ajouté aux mélanges précédents. Les échantillons sont agités pendant 5 secondes à l'aide d'un vortex, puis sont incubés pendant 30 minutes au congélateur à -20°C . Après l'incubation, les extractions sont centrifugées pendant 25 minutes à 5 000 g à 4°C . Le surnageant des échantillons est prélevé puis est évaporé au SpeedVac (3 h sous vide à 35°C). Pour la colonne HILIC, les concentrats sont repris dans 100 μL d'un mélange acétonitrile/eau (9:1). Pour la colonne C18, les concentrats sont repris dans 100 μL d'un mélange méthanol/eau (1:9).

En spectroscopie par RMN, les protéines des échantillons de LCS sont précipitées au méthanol froid (-20°C). Les échantillons de LCS sont dilués au demi par l'ajout de méthanol pour un volume final de 100 μL . Les échantillons sont agités à l'aide d'un vortex puis centrifugés pendant 10 minutes à 4 000 g à 4°C . Les surnageants sont récupérés et sont transvasés dans un tube à hémolyse pour séchage au SpeedVac (2 h sous vide à 35°C). Les échantillons sont resuspendus extemporanément dans 200 μL de tampon phosphate et 10 μL de TSP à 3,2 mM pour l'analyse au spectromètre par RMN.

c) Sérum

Les échantillons sont extraits selon une adaptation de la méthode Folch (Alshammari *et al.*, 2015) qui correspond à la précipitation des protéines et à l'extraction des lipides dans un mélange à 2 phases (aqueuse contenant les métabolites, et organique contenant les lipides) séparées par une couche de protéines précipitées.

En HPLC-MS, 50 μL des échantillons de sérum sont mélangés à 70 μL de méthanol froid (-20°C). Les échantillons sont ensuite vortexés pendant 30 secondes. Un volume de 60 μL de chloroforme est ajouté au milieu et est agité à l'aide d'un vortex pendant 1 minute. Cette étape est réalisée une nouvelle fois. Les échantillons sont ensuite incubés pendant 10 minutes à -20°C puis sont centrifugés à 12 000 g pendant 10 minutes à 4°C . La phase aqueuse est récupérée et transvasée dans un tube à hémolyse pour être concentrée au SpeedVac (2 h sous vide à 35°C). Pour la colonne HILIC, les concentrats sont resuspendus dans 100 μL d'un mélange acétonitrile/eau (9:1) contenant les étalons internes pour la quantification des dérivés du tryptophane. Pour la colonne C18, les concentrats sont resuspendus dans 100 μL d'un mélange méthanol/eau (1:9) contenant les étalons internes. Les échantillons resuspendus sont agités à l'aide d'un vortex puis centrifugés à 4 500 g à 4°C pendant 10 minutes. Le surnageant est transféré dans un vial doté d'un insert pour la colonne HILIC ; et sur plaque 96 puits pour la colonne C18.

En spectroscopie par RMN, un volume de 300 μL des échantillons de sérum est mélangé avec 400 μL de méthanol froid (-20°C). Les échantillons sont agités pendant exactement 30 secondes à l'aide d'un vortex. Un volume de 350 μL de chloroforme est ajouté au mélange précédent. Les échantillons sont ensuite agités pendant exactement 1 minute à l'aide d'un vortex. Un second volume de 350 μL de chloroforme est ajouté puis les échantillons sont une nouvelle fois agités pendant exactement 1 minute à l'aide d'un vortex. Les extractions sont incubées pendant 10 minutes au congélateur à -20°C . Les

tubes sont ensuite centrifugés à 12 000 g à 4°C pendant 10 minutes. La phase aqueuse est récupérée et est transvasée dans un tube à hémolyse pour être concentrée à l'aide d'un évaporateur SpeedVac (2 h sous vide à 35°C). Les échantillons sont ensuite resuspendus extemporanément dans 200 µL de tampon phosphate préparé dans du D₂O et 10 µL de TSP.

d) Urine

En HPLC-MS, les échantillons d'urine sont dilués au dixième pour un volume final de 100 µL. Pour la colonne HILIC, 10 µL de l'échantillon dilué sont ajoutés à 90 µL d'acétonitrile. Pour la colonne C18, 10 µL de l'échantillon dilué sont ajoutés à 90 µL d'eau distillée.

En spectroscopie par RMN, les échantillons d'urine sont dilués au quart pour un volume final de 200 µL. Les échantillons sont centrifugés pendant 10 minutes à 1 000 g à 4°C. Ensuite, 50 µL du surnageant sont dilués avec 150 µL de tampon phosphate D₂O et 8 µL de TSP à 3,2 mM. Les échantillons sont agités à l'aide d'un vortex et introduits dans des tubes RMN de 3 mm.

3. Contrôle qualité

La stabilité des instruments de mesure est évaluée en analysant les échantillons de contrôle qualité (QC). Ces QC sont obtenus en mélangeant une faible quantité de chaque échantillon à analyser. Ils subissent les mêmes étapes d'extraction des métabolites pour le type de matrice considéré. Ils sont injectés en début et en fin d'analyse et tous les 10 échantillons.

4. Acquisition des données

a) Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

La chromatographie liquide est réalisée sur un système UPLC Ultimate WPS-3000 (Dionex ; Sunnyvale ; CA ; Etats-Unis). Trois modalités sont effectuées : une chromatographie sur colonne Kinetex XB C18 (Phenomenex Incorporation ; Torrance ; CA ; Etats-Unis) suivie d'une ionisation par électro-ébulisaison (ESI) positive et négative ; et une chromatographie sur colonne Cortecs HILIC (Waters Corporation ; Milford ; MA ; Etats-Unis) suivie d'une ionisation par électro-ébulisaison positive.

Pour la chromatographie sur colonne C18 (150 mm x 2,10 mm x 1,7 µm, thermostatée à 55°C), un gradient échelonné est réalisé grâce à deux phases mobiles (Tableau 13). La première (A) correspond à de l'eau avec 0,1% (v/v) d'acide formique. La deuxième (B) correspond à du méthanol avec 0,1% (v/v) d'acide formique. Le débit de gradient dans la colonne est de 0,2 mL/min. La chromatographie est menée pendant 28 minutes pour les deux modes d'ionisation (positif et négatif).

Tableau 13 : Gradient des phases mobiles A et B de la chromatographie liquide sur colonne C18 pour l'analyse métabolique.

Temps (minutes)	Phase mobile A	Phase mobile B
	(Eau + acide formique 0,1%)	(Méthanol + acide formique 0,1%)
0	99,9%	0,1%
2	99,9%	0,1%
6	75%	25%
10	20%	80%
12	10%	90%
21	0,1%	99,9%
23	0,1%	99,9%
24	99,9%	0,1%
26	99,9%	0,1%

Pour la chromatographie sur colonne HILIC (150 mm x 2,10 mm x 1,6 µm, thermostatée à 55°C), un gradient échelonné est réalisé grâce à deux phases mobiles (Tableau 14). La première (A) correspond à de l'eau avec 10 mM de formiate d'ammonium. La deuxième (B) correspond à l'acétonitrile avec 10 mM de formiate d'ammonium. Le débit de gradient dans la colonne est de 0,2 mL/min. La chromatographie est menée pendant 22 minutes pour le mode d'ionisation positif.

Tableau 14 : Gradient des phases mobiles A et B de la chromatographie liquide sur colonne HILIC pour l'analyse métabolique.

Temps (minutes)	Phase mobile A	Phase mobile B
	(Eau + 10 mM formiate d'ammonium)	(Acétonitrile + 10 mM formiate d'ammonium)
0 – 8	5% – 18%	95% – 82%
8 – 15	18% – 25%	82% – 75%
15 – 20,5	25% – 75%	75% – 25%
20,5 – 22	75% – 97%	25% – 3%
22 – 23	97% – 5%	3% – 95%
23 – 27	5%	95%

Le passeur d'échantillons maintient les échantillons à 4°C. Le volume d'injection de chaque échantillon est de 5 µL pour la colonne C18 et 10 µL pour la colonne HILIC. À la sortie de la chromatographie, les molécules sont ionisées par un électronébulisateur. Dans les deux modes d'ionisation, les molécules sont soumises à un champ électrique de 3 000 V. Les paramètres de la source d'ionisation sont les suivants : la température des capillaires est de 325°C ; la température du réchauffeur est fixée à 350°C ; le flux de gaz gainant est fixé à 25 UA ; et le flux de gaz auxiliaire est fixé à 8 UA. Le gaz de dispersion est réglé sur 3 UA. La tension de la lentille électrostatique est définie à 100 V.

Les fragments ionisés sont analysés par un spectromètre de masse Q-Exacte doté d'un quadrupole et d'un orbitrap (Thermo Fisher Scientific ; Brême ; Allemagne). Une acquisition complète est lancée. Les masses mesurées sont comprises entre 58 et 870 m/z. La résolution de l'instrument de mesure est fixée sur 70 000 (m/z = 200) avec un gain automatique ciblé sur 1x10⁶ charges. Le temps maximum d'injection est de 250 ms.

b) Dosage des dérivés du tryptophane

Le dosage des dérivés du tryptophane a été réalisé dans les échantillon de striatum, de LCS, et de sérum (Lefevre *et al.*, 2019; Alarcán *et al.*, 2021). Les métabolites des échantillons sont séparés par

chromatographie liquide sur colonne C18. Le gradient de séparation dans la colonne est basé sur deux phases (Tableau 15) : phase A, eau et 0,5% (v/v) d'acide formique et phase B, méthanol et 0,5% (v/v) d'acide formique. Le débit dans la colonne est réglé à 0,4 mL/min. Un volume de 5 µL par échantillon est injecté dans le système de chromatographie. Les analytes sont ensuite dirigés vers un spectromètre de masse triple quadripôle XEVO-TQ-XS (Waters ; Milford ; MA ; Etats-Unis).

Tableau 15 : Gradient des phases mobiles A et B de la chromatographie liquide sur colonne C18 pour le dosage des dérivés du tryptophane.

Temps (minutes)	Phase A	Phase B
	(Eau + acide formique 0,5%)	(Méthanol + acide formique 0,5%)
0	95%	5%
2	90%	10%
4	85%	15%
6	70%	30%
8	60%	40%
9	55%	45%
9,5	0%	100%
11	0%	100%
11,5	95%	5%
13,5	95%	5%

c) Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire

Les échantillons de striatum, de LCS, de sérum et d'urine sont analysés par un spectromètre à résonance magnétique nucléaire du proton ^1H DRX-600 Avance III HD (Bruker ; Billerica ; MA ; Etats-Unis) équipé d'une cryo-sonde TCI (*Triple Resonance Inverse Cryoprobe*) et d'un gradient selon l'axe z. Les spectres sont acquis selon la séquence « *noesypr1d* » avec un temps de relaxation de 20 secondes. La FID par échantillon comprend 64 itérations (nombre de scans) et 8 *dummy scans* qui permettent la stabilisation de l'aimantation avant l'acquisition.

5. Prétraitement des données

a) Données de spectroscopie par RMN

Les *Free Induction Decay* (FID) ont été traitées avec le logiciel TopSpin 3.6.2 (Bruker ; Billerica ; MA ; Etats-Unis). Le prétraitement des données RMN a consisté en : (i) la correction de la phase d'ordre 0 puis d'ordre 1 ; (ii) la correction et le redressement de la ligne de base ; (iii) l'alignement des pics ; et (iv) la normalisation par rapport à la molécule de référence (TSP).

L'identification et la quantification des pics présents dans les spectres RMN ont été réalisées en déconvoluant et en reconstruisant le spectre à partir d'une bibliothèque de composés purs fournie par le package R *ASICS* (Tardivel *et al.*, 2017; Lefort *et al.*, 2019). Le *workflow* implémenté par *ASICS* quantifie 190 métabolites et renvoie une table de données contenant la quantification relative des métabolites identifiés dans les échantillons.

b) Données de HPLC-MS

La chimiothèque *Mass Spectroscopy Metabolite Library of Standards* (IROA Technologies ; Sea Girt ; NJ ; Etats-Unis) de 495 métabolites standards est utilisée pour construire une chimiothèque

maison dans les mêmes conditions d'analyse de nos échantillons. L'identification des métabolites se fait à partir de cette chimiothèque. Le logiciel Xcalibur 2.2 (Thermo Fisher Scientific ; San José ; CA ; Etats-Unis) permet la vérification de trois critères : (i) le temps de rétention du métabolite détecté doit se trouver entre 6 et 20 secondes autour de la référence standard ; (ii) la masse moléculaire mesurée du métabolite doit se trouver à 10 ppm de la référence standard ; (iii) et le ratio isotopique du métabolite doit correspondre à la référence standard. Lorsque ces trois critères sont remplis, l'intensité du métabolite est calculée en intégrant l'aire du pic chromatographique correspondant à celui-ci. Le logiciel génère un tableau de données contenant les métabolites ainsi que les intensités correspondantes dans chaque échantillon biologique.

Une courbe étalon est établie pour chaque étalon interne (EI) chimiquement marqué par un marqueur isotopique correspondant à un métabolite ciblé des dérivés du tryptophane. Le ratio des intensités entre un métabolite et son EI (de concentration connue) à partir du spectre de masse permet sa quantification absolue (dans la limite de détection imposée par l'appareillage) (Lefevre *et al.*, 2019).

6. Traitements statistiques des données

Les traitements bio-informatiques sont réalisés à l'aide du logiciel R 4.0.2 (Fondation pour le calcul statistique R ; Vienne ; Autriche).

a) Calcul des coefficients de variation

Le coefficient de variation (CV) est défini comme le rapport entre l'écart-type et la moyenne de l'intensité d'un métabolite, multiplié par 100 (Equation 2). Les coefficients de variation sont calculés pour tous les métabolites dans le jeu de données (*i.e.*, dans chaque matrice biologique). Les métabolites dont le CV est supérieur à 30% dans les QC sont retirés du jeu de données.

$$\text{Equation (2) : } CV(\%) = \frac{\text{Ecart-type}}{\text{Moyenne}} \times 100$$

b) Fusion des données provenant des méthodes analytiques

Chaque métabolite identifié à partir des différentes plateformes et modalités analytiques a été associé avec son identifiant unique. Ces identifiants sont accessibles dans les bases de données en ligne comme *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG), *Human Metabolome DataBase* (HMDB), et *PubChem* (Kanehisa and Goto, 2000; Wishart *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2021). La redondance de l'information est filtrée en prenant le plus petit coefficient de variation entre toutes les modalités analytiques (*i.e.*, HPLC-MS C18-MS ESI+ et ESI-, HILIC-MS ESI+, et spectroscopie par RMN).

c) Normalisation

Les jeux de données sont normalisés selon le type de matrice explorée (Craig *et al.*, 2006; Dieterle *et al.*, 2006; van den Berg *et al.*, 2006). Les échantillons de sérum et de LCS sont normalisés à l'aire totale. Les échantillons de tissus sont normalisés à la masse de tissus. Les échantillons d'urines sont normalisés par rapport à la créatinine, dont la concentration est déterminée à l'aide de l'étalon interne (TSP).

d) Analyses multivariées

Les analyses multivariées sur les jeux de données sont réalisées avec le logiciel R à l'aide du package *ropls* (Thevenot *et al.*, 2015). Une approche non supervisée est mise en œuvre *via* l'utilisation de l'analyse en composantes principales (ACP ou PCA en anglais). Cette analyse récapitule l'ensemble des variables d'un échantillon (*i.e.*, métabolites) en une seule variable. Cette approche regroupe les échantillons partageant un même profil sans connaissance *a priori* de ses caractéristiques (*e.g.*, appartenance à un groupe expérimental, type de matrice, *etc.*) afin d'identifier les potentiels échantillons aberrants pour débruiter l'information. De plus, une approche supervisée est réalisée. En effet, une régression discriminante des moindres carrés partiels (PLS-DA) est menée sur les jeux de données. Cette méthode établit des modèles statistiques prédictifs. La performance du modèle est déterminée par la métrique Q², plus sa valeur est proche de 1 plus le modèle permettra de classer convenablement de nouveaux échantillons. Après la réalisation de tests de permutations, implémentés dans le package *ropls*, les significativités du modèle et sa prédictibilité sont respectivement évaluées par les métriques pR²Y, pQ². Si, et seulement si, le modèle n'échoue pas aux tests de permutations (*i.e.*, pR²Y et pQ² inférieures à 0,05) et si la valeur de performance Q² est supérieure à 0,5, des métabolites remarquables peuvent être exploitées. Ces métabolites sont caractérisés par une valeur appelée « importance des variables dans la projection » ou VIP. Si elles sont supérieures à 1, elles seront utilisées pour les analyses futures.

e) Analyses univariées

Les groupes expérimentaux possèdent de petits effectifs, et ne permettent pas l'utilisation de tests paramétriques. C'est pourquoi, une approche non-paramétrique univariée est utilisée. Préalablement à l'utilisation du test de comparaison multiple de Dunn (Dunn, 1961, 1964), la normalité de la distribution des échantillons doit être évaluée par le test de Shapiro, de même que l'homogénéité des variances par le test de Fligner. Le test de comparaisons multiples par paires est implémenté et nécessite donc la correction de la significativité statistique (*p-value*) par la méthode de Bonferroni (Benjamini and Hochberg, 1995). La différence de concentration ou d'intensité d'un métabolite entre deux conditions est considérée comme significative si la *p-value* corrigée est inférieure à 0,05. Le rapport logarithmique base 2 de l'accroissement (*fold-change*) est également calculé pour les métabolites présentant des différences significatives.

f) Analyses des voies métaboliques impactées

En se basant sur les métabolites significativement différents entre les groupes expérimentaux, les voies métaboliques significativement impactées sont déterminées. Pour atteindre cet objectif, une approche hypergéométrique est utilisée. Les définitions des voies métaboliques sont établies à partir de la base de données KEGG (83 voies décrites ; consultée en Juin 2021). Le test hypergéométrique est couramment utilisé sur les plateformes en ligne d'analyse de voies métaboliques (Evangelou *et al.*, 2012). Il fait partie des analyses de sur-représentation (ORA) et teste la probabilité que la totalité ou une fraction des métabolites soit sur-représentée dans la liste des métabolites de la voie concernée. Le test hypergéométrique renvoie des *p-values* pour chaque voie métabolique qui doivent être corrigées

par la méthode *post-hoc False Discovery Rate* (FDR). La voie est considérée comme significativement impactée si la *p-value* ajustée est inférieure à 0,05. Les voies impactées significativement sont ensuite inspectées manuellement en remplaçant les métabolites afin d'éliminer les voies non pertinentes (*i.e.*, voies dont les métabolites ne partagent aucune relation réactionnelle).

Partie II

Matériel et méthodes

Chapitre 5

Histologie



II.	Matériel et méthodes	85
Chapitre 5.	Histologie	113
1.	Cryostats.....	113
2.	Coloration des tissus	113
a)	Coloration au crésyl violet/éosine	113
3.	Immunomarquage des tissus	113
a)	Protocole commun.....	113
4.	Acquisitions microscopiques.....	114
a)	Microscopie à lumière transmise.....	114
b)	Microscopie à fluorescence.....	114
5.	Traitements des données	115
a)	Fusion des canaux.....	115
b)	Reconstruction d'images par mosaïque.....	115

Chapitre 5. Histologie

1. Cryostats

Les échantillons cérébraux sont sectionnés sagittalement à l'aide du cryostat CM3050S (Leica Biosystem ; Wetzlar ; Allemagne). L'enceinte du cryostat est réglée sur une température de -20°C . L'épaisseur des coupes est de $20\ \mu\text{m}$.

Les cervelets sont retirés des cerveaux. Les hémisphères cérébraux sont ensuite séparés en coupant au niveau de la scissure interhémisphérique. Les hémisphères ipsilatéraux ou controlatéraux sont positionnés sur les porte-objets. Ces supports sont préalablement enduits d'*Optimal Cutting Compound* (OCT) dont la surface a été aplanie. Les hémisphères sont positionnés sur le support du côté de la jonction interhémisphérique. Ils sont ensuite enduits d'OCT pour les immobiliser et les stabiliser lors de la coupe. L'hémisphère est sectionné jusqu'à atteindre le plan de coupe latéral à $4,60\ \text{mm}$ par rapport à la ligne interhémisphérique. Lors des premières coupes, le plan de coupe est ajusté de manière qu'il soit orthogonal au plan horizontal et au plan coronal de l'échantillon (équilibre et rectification de l'inclinaison). Les coupes sont réalisées en 6 séries de 6 lames, à raison de 3 coupes par lames. Les lames sont conservées au congélateur à -80°C avant traitement.

2. Coloration des tissus

a) Coloration au crésyl violet/éosine

Les lames de tissu cérébral sont colorées par une solution de crésyl violet à 0,5% et d'éosine à 1%. Le crésyl violet met en évidence la structure globale du tissu cérébral, alors que l'éosine colore les cytoplasmes en rose et les globules rouges en rouge-cerise. Les lames sont positionnées dans un portoir et subissent différents bains : les lames sont décongelées et sont plongées dans un premier bain de crésyl violet à 0,5% pendant 30 minutes. Ensuite, elles sont plongées dans un bain d'éosine à 1% (v/v ; diluée dans une solution de tampon phosphate salin [PBS] à 0,1 M et à pH 7,4) pendant 30 minutes. Les coupes sont rincées à l'eau distillée et sont déshydratées par des bains successifs d'alcool de concentration croissante (70° – 30 secondes ; 95° – 2 minutes ; 100° – 2 minutes). Enfin, la coloration est fixée par bain de xylène pendant 5 minutes avant montage entre lame et lamelle avec milieu de montage Eukitt (Sordalab ; Etampes ; France).

3. Immunomarquage des tissus

a) Protocole commun

Les lames de coupes reviennent à température ambiante pendant 10 minutes. Elles sont rincées dans un bain de PBS (0,1 M ; pH 7,4). Les coupes sont plongées dans un bain de paraformaldéhyde (PFA ; 4% m/v) pour la fixation. Elles sont ensuite rincées au PBS (0,1 M ; 0,3% Triton ; 0,3 M Glycine). Les abords des coupes sont séchés et un fin trait de marqueur hydrophobe est tracé afin d'encercler les coupes de tissus. Le blocage des sites antigéniques est réalisé par une solution de PBS (0,1 M ; 5% albumine sérique bovine – BSA ; 0,3% Triton X-100) pendant 3 h à température ambiante. Les anticorps primaires sont ensuite incubés sur la nuit en chambre humide à 4°C après avoir été dilués dans une

solution de PBS (0,1 M ; 1% BSA ; 0,3% Triton). Les informations sur les anticorps primaires sont récapitulées dans le Tableau 16. Les coupes sont ensuite rincées au PBS (0,1 M). Puis les anticorps secondaires sont incubés, préalablement dilués dans une solution de PBS (0,1 M ; 1% BSA ; 0,3% Triton) pendant 2 h à température ambiante en chambre humide. Les informations sur les anticorps secondaires sont récapitulées dans le Tableau 16. Les coupes sont successivement rincées au PBS (0,1 M) et à l'eau ultrapure. Une contre-coloration des noyaux cellulaires est réalisée à l'aide du 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) à raison de 0,1 µg/mL pendant 15 minutes, à température ambiante et en chambre humide. Les lames sont rincées avant montage entre lame et lamelle avec un milieu de montage Mowiol (Carl Roth ; Karlsruhe ; Allemagne) préservant les échantillons de la photodégradation de la fluorescence (*fading*).

Tableau 16 : Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés pour l'immunomarquage.

Anticorps primaires				Anticorps secondaires				
Fournisseur	Espèce hôte	Cible	Concentration utilisée	Fournisseur	Espèce hôte	Espèce cible	Fluorophore	Concentration utilisée
Abcam	Poulet	GFAP	1/500	Abcam	Chèvre	Souris	488	1/500
Invitrogene	Lapin	Claudin-5	1/500	Abcam	Ane	Lapin	488	1/500
Invitrogene	Lapin	ZO-1	1/500	Abcam	Chèvre	Poulet	647	1/500
Biolegend	Souris	SMI71	1/500	Jackson IR	Chèvre	Souris	Cy3 (eq. 555)	1/250
Abcam	Lapin	NFκB	1/100	Jackson IR	Chèvre	Lapin	Cy3 (eq. 555)	1/250
Abcam	Lapin	HIF1α	1/250					
Abcam	Lapin	CD163	1/500					
MyBiosource	Lapin	GAD	1/250					
Abcam	Lapin	GS	1/250					
MyBiosource	Lapin	GAT1	1/500					
MyBiosource	Lapin	GAT2	1/250					
Abcam	Lapin	EAAT3	1/250					
Abcam	Lapin	TH	1/500					
Abcam	Lapin	S100β	1/500					

4. Acquisitions microscopiques

Les lames sont observées à l'aide d'un microscope CTR5500 (Leica Biosystem ; Wetzlar ; Allemagne) dont la plateforme est motorisée. Il est relié à un ordinateur pour l'automatisation de l'acquisition des images microscopiques.

a) Microscopie à lumière transmise

Les clichés de microscopie à lumière transmise sont captés à l'aide de la caméra couleur ProgRes™ CF (Jenoptik ; Jena ; Allemagne). La caméra a une résolution de 1 360 pixels par 1 024 pixels. La taille de la partie active du capteur mesure 8,8 mm par 6,6 mm. La taille du pixel est de 6,45 µm par 6,45 µm. La profondeur d'échantillonnage est de 14 bits.

b) Microscopie à fluorescence

La lumière excitatrice est produite par une lampe à vapeur de mercure EL6000 (Leica Biosystem ; Wetzlar ; Allemagne). Les clichés de microscopie à fluorescence sont captés à l'aide de la caméra monochrome Orca-R2 (Hamamatsu Photonics ; Hamamatsu ; Japon). La caméra a une résolution de 1 344 pixels par 1 024 pixels. La taille de la partie active du capteur est de 8,67 mm par 6,60 mm. La

taille du pixel est de 6,45 μm par 6,45 μm . La profondeur d'échantillonnage est de 12 bits. La caméra permet la visualisation des longueurs d'onde comprises entre 300 nm et 900 nm (fluorescence visible, infrarouge et ultraviolet).

5. Traitements des données

a) Fusion des canaux

Pour la microscopie à fluorescence, chaque canal est colorisé selon la longueur d'onde de l'anticorps secondaire et est fusionné en une seule image à l'aide du logiciel ImageJ (National Institute of Health ; Bethesda ; MD ; Etats-Unis).

b) Reconstruction d'images par mosaïque

Pour avoir une vue globale des coupes histologiques, un programme informatique a été mis au point puis est implémenté pour construire une mosaïque. Le procédé repose sur le calcul d'une matrice de coordonnées en X et en Y, pour l'acquisition d'images qui se recouvrent entre elles afin de couvrir une zone d'intérêt plus large. En prenant en compte la taille d'une image (en pixels), le pourcentage de recouvrement et le grossissement déterminé par la sélection de l'objectif au microscope, il est possible de calculer un ensemble de coordonnées qui vont englober la zone d'intérêt. Ces coordonnées sont renseignées dans le logiciel d'acquisition pour obtenir l'ensemble des images qui servent pour la reconstruction. Comme les lames ne sont pas parfaitement plane, la mise au point entre les deux points extrêmes peut être différente. Il est alors nécessaire d'acquérir plusieurs plans focaux à un intervalle de distance régulier. Une routine Python (Python Software Foundation ; Beaverton ; OR ; Etats-Unis) a donc été codée pour calculer ces paramètres.

Après avoir acquis toutes les images en X, Y et Z, une autre routine Python détermine l'image en Z qui est la moins floue. Dans le cas où les images sont issues d'un immunomarquage à plusieurs couples anticorps primaires et secondaires, il sera nécessaire de fusionner les canaux de couleur (vert, bleu, rouge, jaune). Ensuite, deux étapes de reconstruction sont réalisées. Une première en Y, et une seconde en X qui constitue *in fine* l'image globale de la zone d'intérêt. Pour cela, le module d'assemblage d'images (*stitching*) de la bibliothèque OpenCV (Intel ; Santa Clara ; CA ; Etats-Unis) est utilisé. Ce module assemble et recalcule les images partageant des caractéristiques communes (recouvrement) pour construire une mosaïque.

Partie III

Résultats et discussion

Chapitre 1

Caractérisations acoustiques du transducteur



III.	Résultats et discussion	119
Chapitre 1.	Caractérisations acoustiques du transducteur	119
1.	Résultats	119
2.	Discussion.....	120

III. Résultats et discussion

Chapitre 1. Caractérisations acoustiques du transducteur

1. Résultats

Il est nécessaire, avant l'utilisation du transducteur pour les expérimentations, de déterminer ses caractéristiques acoustiques. En effet, la sensibilité, correspondant à la tension (en mVpp) appliquée à l'amplificateur pour générer la pression acoustique désirée, ainsi que la forme en deux dimensions (2D) du faisceau ultrasonore au niveau de la tâche focale doivent être déterminées.

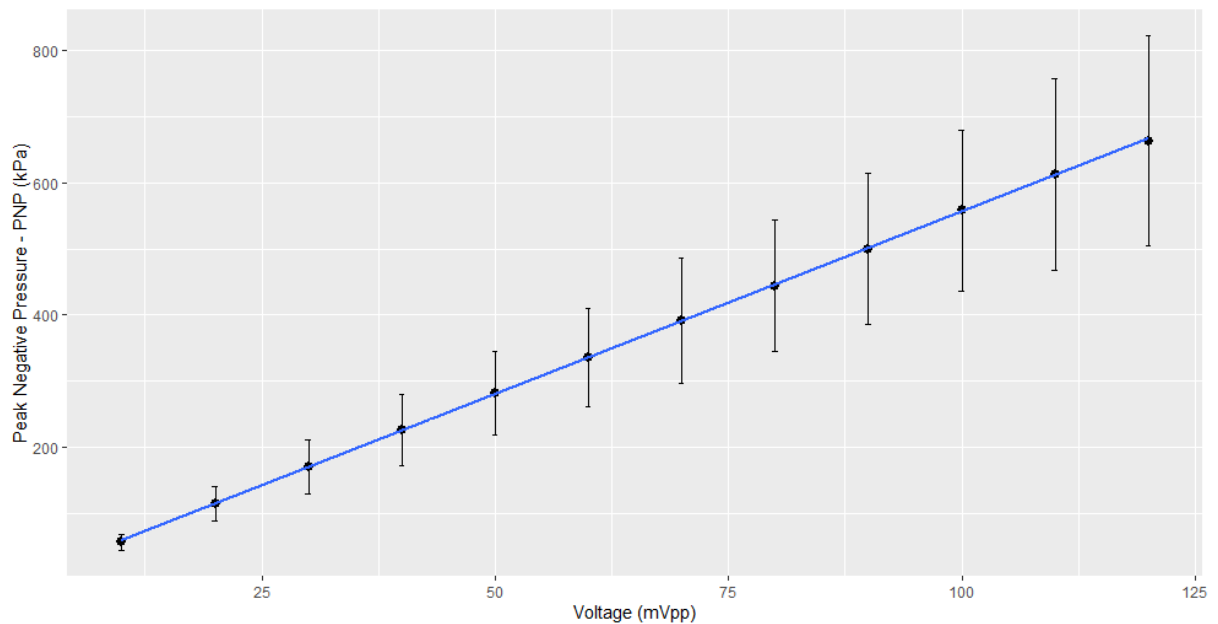


Figure 26 : Courbe de sensibilité du transducteur 1 MHz focalisé à 49 mm. Les mesures sont réalisées avec les paramètres acoustiques suivants : fréquence centrale de 1 MHz ; nombre de cycle 10 cycles, soit 10 μs ; fréquence de répétition des pulsations 4 Hz.

La Figure 26 représente la pression acoustique en kPa développée par un transducteur ultrasonore 1 MHz focalisé à 49 mm muni de son cône adaptateur. La régression linéaire entre les tensions appliquées au générateur de fonctions et les pressions acoustiques mesurées par l'hydrophone permet d'établir l'équation de la droite de sensibilité (Equation 3 et Annexe 6).

$$\text{Equation (3) : } y = 5,53 \times x + 3,43$$

où :

y représente la pression acoustique (PNP) en kPa ;

x la tension au générateur de fonctions en mVpp

Les cartes de distribution en deux dimensions sont tracées. La distribution axiale, correspondant à la profondeur en fonction de la dimension latérale est représentée en Figure 27A. La distribution latérale, correspondant à l'élévation en fonction de la dimension latérale est représentée en Figure 27B. À partir de ces données, les profils axiaux et latéraux sont établis pour calculer la taille du point focal (Annexe 5). La tâche focale est ensuite mesurée à -3 dB :

- En profondeur : $10,04 \pm 0,51$ mm
- En latéral : $1,35 \pm 0,03$ mm
- En élévation : $1,44 \pm 0,08$ mm

La tâche focale correspond à une forme géométrique en 3 dimensions au niveau de laquelle l'énergie est concentrée.

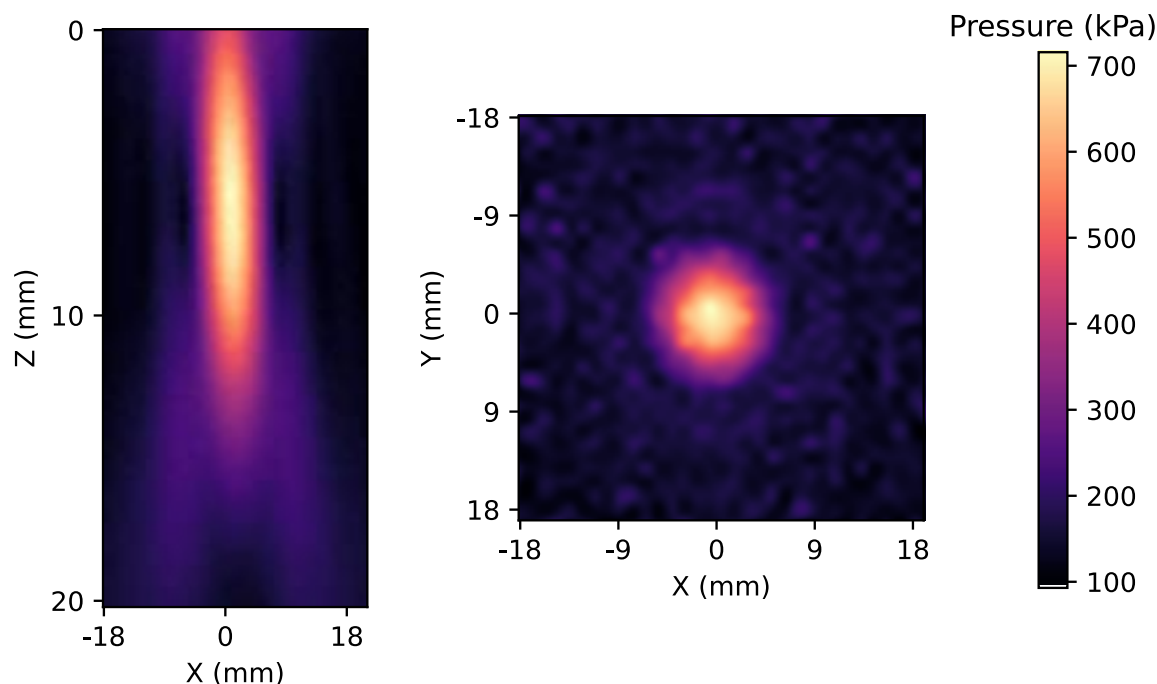


Figure 27 : Carte de distribution de la pression acoustique selon deux dimensions au niveau du point focal. En A, le profil est mesuré selon l'axe X, correspondant à la dimension latérale, et l'axe Z correspondant à la profondeur. L'origine de la mesure est en avant de la membrane du cône adaptateur. En B, le profil est mesuré selon l'axe X et l'axe Y (qui correspond à l'élévation). Les paramètres acoustiques pour ces mesures sont : fréquence centrale 1 MHz ; fréquence de répétition de la pulsation 4 Hz ; longueur de la pulsation 10 μ s, soit 10 cycles ; pression acoustique (PNP) 600 kPa, soit 93,70 mVpp.

2. Discussion

En ajustant les coordonnées stéréotaxiques lors des expérimentations préliminaires et la hauteur du transducteur dans son cône acoustique, nous avons positionné le centre de sa tâche focale au centre du striatum. En prenant en compte la taille de la tâche focale du transducteur ultrasonore (Figure 27 et Annexe 5) et à partir des coordonnées stéréotaxiques déterminées lors des expérimentations préliminaires, nous pouvons extrapoler l'étendue de l'ouverture de la BHE dans le plan antéro-postérieur (correspondant à la dimension latérale de la tâche focale) et dans le plan médio-latéral (correspondant à l'élévation de la tâche focale). De ce fait, tous les plans antéro-postérieurs se situant entre les distances 1,22 mm en avant du bregma et 0,22 mm en arrière du bregma contiennent les tissus perméabilisés. De la même manière, les plans médio-latéraux sont compris entre les distances 2,48 mm et 3,82 mm par rapport à la ligne interhémisphérique et contiennent également les tissus perméabilisés. De plus, la profondeur de la tâche focale ultrasonore est de 10,04 mm et correspond à la hauteur (dans le sens dorso-ventral) d'un cerveau de rat, signifiant alors que la BHE est perméabilisée sur toute sa hauteur.

Partie III

Résultats et discussion

Chapitre 2

Perméabilisation de la BHE par sonoporation



III. Résultats et discussion	119
Chapitre 1. Caractérisations acoustiques du transducteur	119
1. Résultats	119
2. Discussion.....	120
Chapitre 2. Perméabilisation de la BHE par sonoporation.....	123
1. Résultats	123
a) Détermination des coordonnées et de la pression acoustique optimales pour l'ouverture de la BHE du noyau caudé putamen.....	123
b) Cinétique de fermeture de la barrière hémato-encéphalique	125
2. Discussion.....	125
a) Influence des paramètres acoustiques	125
b) Influence des microbulles	126
c) Influence des paramètres physiologiques.....	127
d) Influence de l'anesthésie	128
e) Suivi de la perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique.....	129

Chapitre 2. Perméabilisation de la BHE par sonoporation

1. Résultats

a) Détermination des coordonnées et de la pression acoustique optimales pour l'ouverture de la BHE du noyau caudé putamen

Grâce aux caractérisations acoustiques du transducteur, nous avons établi les caractéristiques de sa tâche focale (Figure 27). Nous savons également que le centre de la tâche focale se trouve à 50 mm en avant du transducteur. Les coordonnées stéréotaxiques du noyau caudé putamen (striatum) déterminées à partir de l'atlas stéréotaxique de Paxinos et Watson sont les suivantes (Paxinos and Watson, 2013) :

- Antéropostérieur (AP) : entre -0,5 et +0,5 mm par rapport au bregma ;
- Latéralité (L) : entre $\pm 1,5$ mm et ± 5 mm par rapport au bregma ;
- Profondeur (P) : fixée à 5 mm.

Les expériences préliminaires confirment la position antéropostérieure à 0,5 mm en avant du bregma, et la position latérale à +3,15 mm par rapport à la ligne interhémisphérique. La profondeur pour atteindre le centre du striatum à ces coordonnées est de 5 mm par rapport au crâne. Nous souhaitons exposer le centre du striatum droit à une pression acoustique de 600 kPa (PNP). Pour minimiser la pression acoustique délivrée dans les structures adjacentes au striatum (*i.e.*, cortex et corps calleux), il est nécessaire de positionner le centre de la tâche focale au centre du striatum. Nous compensons alors la profondeur en ajoutant des bagues pour rehausser le transducteur dans le cône adaptateur. De ce fait, le centre de la tâche focale devrait coïncider avec le centre du striatum. Vu la taille, la forme de la tâche focale du transducteur, la taille d'un cerveau de rat (environ 1 cm), et malgré le fait d'avoir compensé la hauteur de transducteur, l'exposition ultrasonore couvre en intégralité la profondeur du cerveau, et ouvre la BHE située dans le trajet du faisceau ultrasonore.

De plus, nous avons testé trois pressions différentes pour ouvrir la BHE sans provoquer de dommages tissulaires évidents, ni d'hémorragies. Pour cela, nous avons exposé le striatum droit (selon les coordonnées déterminées précédemment) aux pressions suivantes : 0,6 ; 0,8 ; et 1,2 MPa. À partir de la droite de sensibilité du transducteur (Figure 26), nous déterminons les tensions nécessaires pour développer la pression acoustique désirée. Les résultats montrent que la pression acoustique permettant d'ouvrir de manière sécuritaire la BHE est de 0,6 MPa (Figure 28). Une augmentation de la pression acoustique de 0,8 à 1,2 MPa induit une augmentation de la concentration de bleu d'Evans dans le tissu cérébral, et de la surface de la région perméabilisée, traduisant ainsi une augmentation de l'efficacité de la perméabilisation de la BHE (Figure 29). Cette augmentation de la pression acoustique engendre également une augmentation du nombre de microhémorragies dans la région perméabilisée.

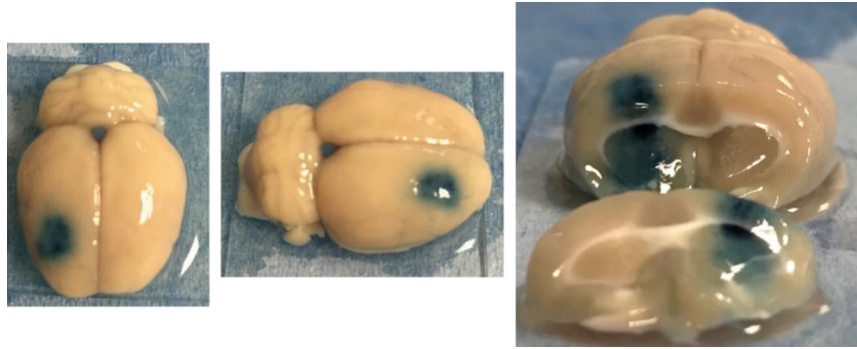


Figure 28 : Perméabilisation de la barrière hématoencéphalique par sonoporation. La solution de bleu d'Evans est injectée pour évaluer l'étendue et l'intensité de la perméabilisation. Les paramètres acoustiques sont : fréquence 1 MHz ; PNP 0,8 MPa ; durée de la pulsation 10 ms (10 000 cycles) pendant 30 secondes.

Les travaux antérieurs ont montré que le crâne de rat atténue la pression acoustique d'environ 50% chez le rat (Fry and Barger, 1978; Gerstenmayer *et al.*, 2018). Par conséquent, la pression acoustique réellement délivrée dans le tissu cérébral avoisinerait les 0,3 MPa, pour un générateur configuré afin de générer une pression acoustique de 0,6 MPa. Cette pression est couramment utilisée dans les travaux étudiant la perméabilisation de la BHE par sonoporation pour la délivrance de médicaments (Hynynen *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2012; Alonso, 2015; Song *et al.*, 2018).

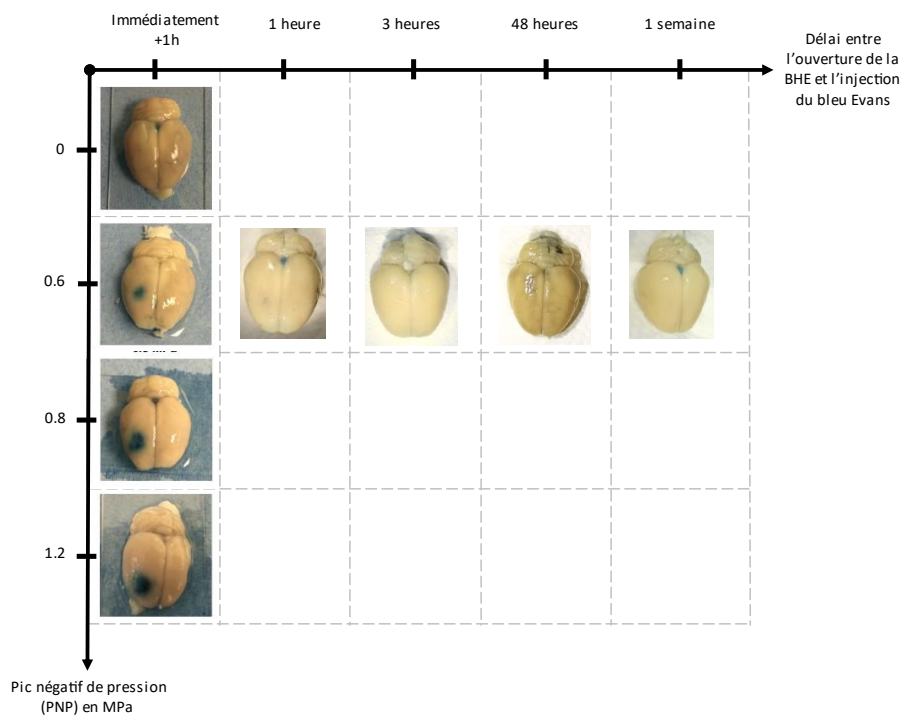


Figure 29 : Cinétique de perméabilisation et de fermeture de la barrière hématoencéphalique évaluée par l'extravasation de bleu d'Evans au niveau du striatum droit. La première colonne présente les résultats où le bleu d'Evans a été injecté immédiatement après la sonoporation, puis l'animal a été sacrifié 1 h après la circulation du colorant.

Pour rappel, la fréquence centrale de notre transducteur est de 1 MHz. L'exposition aux ultrasons est répétée toutes les secondes (PRF de 1 Hz) pendant 30 secondes par pulsation de 10 000 périodes (soit une pulsation de 10 ms). Ce protocole acoustique est identique aux études de référence (Kovacs *et al.*, 2017; McMahon and Hynynen, 2017; McMahon *et al.*, 2017).

b) Cinétique de fermeture de la barrière hémato-encéphalique

Afin de déterminer la durée de la perméabilisation de la BHE, la région d'intérêt a été exposée à une pression acoustique de 0,6 MPa après injection intraveineuse de microbulles. Puis, une solution de bleu d'Evans à 2% a été injectée immédiatement, 1 h, 3 h, 48 h et 1 semaine après la perméabilisation de la BHE par sonoporation. L'injection du colorant immédiatement après la sonoporation montre l'ouverture de la BHE, confirmant ainsi nos résultats précédents (Figure 29). Une légère coloration du tissu cérébral est observée à 1 h après la sonoporation témoignant d'une fermeture progressive de la BHE. En revanche, aucune coloration du tissu cérébral n'est observée à 3 h, à 48 h et à 1 semaine après sonoporation confirmant la fermeture de la BHE. Nous avons constaté la présence de quelques microhémorragies dans les minutes et heures qui suivent la sonoporation (*i.e.*, 1 h et 3 h). Cependant, aucune microhémorragie n'est constatée à 48 h et à 1 semaine après la sonoporation.

2. Discussion

a) Influence des paramètres acoustiques

Nos expériences préliminaires ont déterminé qu'une pression acoustique de 600 kPa suffisait pour perméabiliser la BHE sans provoquer de microhémorragies ou de dommages tissulaires. En se basant sur les études qui explorent la réponse protéomique et/ou transcriptomique, un tableau récapitulatif des **paramètres acoustiques** a été réalisé (Tableau 17). Bien que McMahon *et al.*, et Kovacs *et al.*, utilisent des transducteurs dont les **fréquences centrales** sont comprises entre 0,55 et 0,59 MHz, notre groupe et Ji *et al.*, utilisent des transducteurs dont les fréquences centrales sont comprises entre 1 MHz et 1,5 MHz. Le corollaire découlant de ces observations est qu'à une fréquence plus faible, la **pression acoustique** est diminuée (*i.e.*, entre 190 et 300 kPa à 0,550 MHz ; entre 490 et 600 kPa à 1 MHz) (Kovacs *et al.*, 2017; McMahon *et al.*, 2017). De plus, le faisceau ultrasonore est d'avantage distordu à des fréquences plus élevées. Notre fréquence centrale est inférieure à celle de Ji *et al.*, alors que notre pression acoustique est pourtant supérieure (Ji *et al.*, 2021). Cette différence de pression acoustique entre nos groupes s'explique par leur fréquence de répétition des impulsions qui est 2 fois plus élevée que celle utilisée dans les autres travaux. De plus, notre temps d'exposition est 6 fois inférieur à celui des études de références (*i.e.*, 30 s contre 120 s).

L'ensemble de ces paramètres acoustiques (*i.e.*, fréquence centrale, PRF, durée de la pulsation, temps d'exposition) influent sur la quantité d'énergie qui est transmise à travers les tissus et aux microbulles présentes dans la zone sonoporée. Cette quantité d'énergie influence le comportement physique des microbulles (*i.e.*, cavitation stable ou cavitation inertielle) qui conditionne les conséquences biologiques de la sonoporation. Comme explicité dans le chapitre 2 et 3 de l'état de l'art (pp. 19 à 76), la sonoporation se base sur l'utilisation conjointe d'ultrasons focalisés et de microbulles de gaz injectées dans la circulation sanguine. Ces deux composantes introduisent une variabilité dans la réponse biologique lors de la sonoporation. En effet, la fréquence et la pression acoustique au pic négatif, qui déterminent l'index mécanique, sont des paramètres importants renseignant sur les variations maximales de la pression locale lors de l'exposition ultrasonore des tissus. Les microbulles augmentent significativement les effets mécaniques par cavitation. En effet, l'ajout de microbulles dans

une suspension d'érythrocytes *in vitro* exposée aux ultrasons provoque une hémolyse de ces cellules, alors que la même exposition ultrasonore sans les microbulles ne provoque pas de dommages (Williams *et al.*, 1991; Brayman and Miller, 1999). De la même manière, des hémorragies ont été constatées dans les intestins *in vivo* lors de l'exposition ultrasonore après injection intraveineuse de microbulles, alors qu'elle ne provoquait pas d'effets secondaires sans les microbulles (Miller and Gies, 1998). McMahon *et al.*, et de Ji *et al.*, ont utilisé un système de détection de la cavitation des microbulles limitant la pression acoustique lors de la sonoporation. En effet, ce système asservit la pression acoustique en fonction de la réponse ultraharmonique générée par les microbulles (Sanchez *et al.*, 2013). De ce fait, la cavitation inertielle est évitée en faveur de la cavitation stable. Les effets secondaires induits par la cavitation inertielle des microbulles sont limités. Dans notre étude, hormis l'évaluation *post mortem* de la perméabilisation de la BHE par extravasation de bleu d'Evans, nous n'utilisons pas de détecteur de la cavitation. Par conséquent, l'index mécanique ne suffit donc pas à garantir l'innocuité de la sonoporation.

Tableau 17 : Récapitulatif des paramètres acoustiques pour la perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique par sonoporation.

Études	Espèce	Fréquence centrale (f)	PNP (moyenne si détection de la cavitation)	PRF (Hz)	Durée du <i>burst</i> et nombre de cycles	Temps de sonoporation	Détection de la cavitation
(Kovacs <i>et al.</i> , 2017)	Rat	589,6 kHz	300 kPa	1	10 ms 5 896 cycles	120 s	Non
(McMahon <i>et al.</i> , 2017)	Rat	551,5 kHz	Environ 190 kPa	1	10 ms 5 551 cycles	120 s	Oui
(McMahon and Hynynen, 2017)	Rat	551,5 kHz	Environ 200 kPa	1	10 ms 5 551 cycles	120 s	Oui
(Ji <i>et al.</i> , 2021)	Souris	1,5 MHz	490 kPa	2	10 ms 15 000 cycles	De 36 s à 8 min	Oui
(Preset <i>et al.</i> , 2022)	Rat	1 MHz	600 kPa	1	10 ms 10 000 cycles	30 s	Non

b) Influence des microbulles

Les données physiologiques des animaux ainsi que celles concernant les microbulles (type, taille, doses) des études de référence ont été récapitulées dans le Tableau 18. Nous avons injecté un unique bolus de 100 µL de microbulles (Vevo MicroMarker®) à une concentration moyenne de $2,5 \times 10^8$ MB/mL avant l'exposition aux ultrasons. Les animaux pesaient environ 340 g lors de la perméabilisation de la BHE par sonoporation. Le nombre de microbulles injectées est ramené au poids moyen des animaux. Par conséquent, la quantité de microbulles injectées est donc de $7,3 \times 10^7$ MB par kilogramme. En comparant avec les études de référence (Tableau 18), notre dose de microbulles pour l'ouverture de la BHE est inférieure à celle des études citées dans le Tableau 18. McMahon *et al.*, ont montré que les conséquences biologiques, notamment au niveau de l'inflammation, étaient

conditionnées par la dose de microbulles et par leur composition (McMahon and Hynynen, 2017; Dallon McMahon *et al.*, 2020). En effet, les auteurs ont conclu que l'inflammation induite par la sonoporation était due à une dose 10 fois supérieure à celle utilisée lors d'examen clinique. De plus, McMahon *et al.*, ont largement démontré que l'expression des facteurs pro-inflammatoires était proportionnelle à l'amplitude de la perméabilisation de la BHE (McMahon and Hynynen, 2017; McMahon *et al.*, 2017; Dallon McMahon *et al.*, 2020).

Tableau 18 : Récapitulatif des informations concernant l'injection des microbulles et l'évaluation de la perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique.

Études	Anesthésie	Dose	Espèce et masse des animaux	Concentration reconstituée	Diamètre moyen	Évaluation de l'ouverture	Nombre de MB/kg
(Kovacs <i>et al.</i> , 2017)	Isoflurane 1,5% à 3% 100% O ₂	100 µL en injection continue à 1 µL par seconde	Rat Environ 300 g à 350 g (8 à 10 semaines)	5 à 8 x 10 ⁸ MB/mL (Optison®)	3,0 à 4,5 µm	IRM	1,5 x 10 ⁸ à 2,4 x 10 ⁸
(McMahon <i>et al.</i> , 2017)	Isoflurane 5% Air 1 L/min	Bolus 20 µL/kg	Rat 250 g	1 x 10 ¹⁰ MB/mL (Definity®)	1,5 à 3,3 µm	IRM et détecteur de cavitation	2,0x10 ⁸
(McMahon and Hynynen, 2017)	Isoflurane 1% à 2% Air 1 L/min	Bolus « faible » 10 µL/kg Bolus « fort » 100 µL/kg	Rat 270 g à 340 g				Bolus « faible » 1,0 x 10 ⁸ Bolus « fort » 1,0 x 10 ⁹
(Ji <i>et al.</i> , 2021)	Isoflurane 1,5% à 2% O ₂ 0,8 L/min	100 µL/kg	Souris 25 à 30 g (6 à 8 semaines)	1 x 10 ¹⁰ MB/mL (Definity®)	1,5 à 3,3 µm	IRM et détecteur de cavitation	1,0 x 10 ⁹
(Presset <i>et al.</i> , 2022)	Kétamine – Xylazine 70 mg/kg – 7 mg/kg	Bolus 100 µL	Rat 340 g (8 à 10 semaines)	2,5x10 ⁸ MB/mL (Vevo MicroMarker®)	2,3 à 2,9 µm	Extravasation de bleu d'Evans	7,3 x 10 ⁷

La concentration de microbulles dans la zone d'intérêt est influencée par leur pharmacocinétique : tant par leur biodistribution que par leur élimination dans les poumons, le foie et la rate. Ces paramètres sont tributaires de la **pression partielle en gaz dissous** dans le sang, notamment en dioxygène (O₂), et des **constantes cardiopulmonaires** (fréquence cardiaque et ventilatoire, pression artérielle). Ces constantes sont modifiées par les anesthésiques utilisés lors des expériences *in vivo*. De même, la **pression partielle en O₂** affecte la physiologie cardiaque provoquant une **diminution de la pression artérielle** et/ou une **augmentation du débit sanguin**.

c) Influence des paramètres physiologiques

Les autres paramètres importants à prendre en compte lors de la perméabilisation de la BHE sont les **particularités physiologiques**. Le SNC est protégé par la boîte crânienne et la colonne vertébrale. Le crâne est une structure osseuse dure et dense à travers laquelle les ultrasons sont fortement atténués et distordus. La conséquence directe est une **atténuation de la pression acoustique** délivrée *in situ*. Ces phénomènes expliquent la différence de pression acoustique entre notre groupe, qui travaille chez le

rat, et le groupe de Ji *et al.*, qui travaille chez la souris (*i.e.*, 490 et 600 kPa). L'atténuation à travers le crâne est inversement proportionnelle à la fréquence centrale, et est proportionnelle au poids corporel des animaux. L'atténuation de la pression acoustique à travers le crâne de souris est estimée *ex vivo* à 18% (Choi *et al.*, 2007), alors que dans nos conditions expérimentales, la pression acoustique à travers le crâne de rat est atténuée de 50% correspondant à une pression acoustique *in situ* estimée à 300 kPa (Gerstenmayer *et al.*, 2018).

L'ensemble de la **vascularisation** du SNC (excepté les zones cérébrales dépourvue de BHE, *e.g.*, organes circumventriculaires) est protégé par la BHE. De ce fait, les paramètres **morphologiques** et la **densité** des vaisseaux sanguins présents dans les différentes zones cérébrales influencent directement l'**étendue** et le **volume** de la BHE qui est perméabilisée. En effet, la vascularisation du cortex cérébral est, par exemple, moins dense que la substance noire *pars compacta* (SNpc) et *pars reticulata* (SNpr) (Cavaglia *et al.*, 2001; Kirst *et al.*, 2020). Par conséquent, le volume de la BHE perméabilisée est nécessairement plus important dans la substance noire que dans le cortex. En outre, la **dynamique vasculaire** est également impactée (Sheikov *et al.*, 2004; Raymond *et al.*, 2007). En effet, la sonoporation provoque des **vasospasmes** le long des vaisseaux qui pourraient être responsables de l'**interruption transitoire** de la circulation sanguine.

d) Influence de l'anesthésie

Dans notre protocole de perméabilisation de la BHE par sonoporation, nous avons anesthésié nos animaux par une injection de kétamine et de xylazine. Ce type d'anesthésie induit une baisse de la fréquence cardiaque (de l'ordre de 36%) et ventilatoire (de l'ordre de 41%) conduisant à une **chute de la saturation en dioxygène** dans le sang (de l'ordre de 10%) (Giroux *et al.*, 2015, 2016). Par conséquent, à cause de la diminution de ces constantes physiologiques due à cette modalité d'anesthésie, les vaisseaux peuvent sécréter des **agents vasodilatateurs** (adénosine, prostaglandine E₂, *etc.*) afin d'augmenter le **débit sanguin local**. L'augmentation de ce débit sanguin conduit localement à une augmentation de la **concentration des microbulles** au niveau de la région ciblée par la sonoporation. Néanmoins, les effets de ces paramètres cardiovasculaires restent à explorer pour pleinement évaluer leur influence sur la perméabilisation de la BHE.

En revanche, l'inhalation d'isoflurane engendre une **augmentation de la fréquence cardiaque** et de la **pression artérielle** (Albrecht *et al.*, 2014). L'isoflurane ne modifie néanmoins pas la **pression partielle en O₂** (Karanovic *et al.*, 2010). L'augmentation des constantes cardiovasculaires induisent une augmentation du *turn-over* des microbulles. De plus, l'inhalation d'air comme gaz porteur de l'anesthésie gazeuse (*i.e.*, isoflurane), comparée à l'oxygène pur induit une **augmentation de la durée de vie** des microbulles dans la circulation sanguine (McDannold *et al.*, 2017). Enfin, un travail a rapporté une perméabilisation native transitoire de la BHE lors de l'inhalation d'isoflurane pour l'anesthésie du chat. Cette perméabilisation est évaluée par une technique électroencéphalographique et par l'extravasation du bleu d'Evans (Tétrault *et al.*, 2008). Les auteurs expliquent ce phénomène par la propriété vasodilatatrice de l'isoflurane, provoquant des contraintes physiques au niveau des jonctions serrées, et augmentant de ce fait la perméabilité de la BHE (Schwinn *et al.*, 1990). Ces

résultats montrent également la nécessité d'utiliser une **pression acoustique plus faible** lors de l'utilisation d'une anesthésie gazeuse à base d'isoflurane par rapport à une anesthésie chimique.

e) Suivi de la perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique

Pour confirmer la perméabilisation de la BHE, nous avons injecté une solution de bleu d'Evans par voie intraveineuse. Cette méthode est un **gold-standard** pour suivre la perméabilité de la BHE vis-à-vis des macromolécules après la sonoporation (Shen *et al.*, 2014; McMahon *et al.*, 2017; Montero *et al.*, 2019; Kadry *et al.*, 2020; Chien *et al.*, 2022). Certaines études utilisent l'**IRM de contraste** après injection intraveineuse d'un agent de contraste à base de gadolinium pour détecter et quantifier l'efficacité de la perméabilisation de la BHE (Marquet *et al.*, 2014). Cette technique évalue et contrôle en temps réel la **localisation**, **l'étendue** et le **volume** de la perméabilisation de la BHE.

Nous avons également évalué la cinétique de fermeture de la BHE (*i.e.*, retour à la perméabilité native de la BHE). Nos résultats ont montré que la BHE retrouve sa perméabilité native une heure après la sonoporation. La littérature décrit que la durée d'ouverture de la BHE est dépendante du **volume perméabilisé** (O'Reilly *et al.*, 2017), qui est lui-même dépendant de la **dose** de microbulles, de la **pression acoustique** et des **paramètres physiologiques** vus précédemment (Samiotaki *et al.*, 2012). De plus, Sun *et al.*, ont mis en évidence une fermeture de la BHE après plus de 4 heures en exploitant les mêmes paramètres acoustiques utilisés dans notre étude (Sun *et al.*, 2015). Ces différences peuvent s'expliquer par les différences du **diamètre moyen** des microbulles et de la **région cérébrale** perméabilisée. En effet, Sun *et al.*, utilisent différentes microbulles de diamètres différents, montrant que plus le **diamètre moyen** des bulles est important, plus le **temps d'ouverture** est long. De plus, la région cérébrale ciblée par Sun *et al.*, est l'hippocampe, alors que nous ciblons le striatum. Les différences dans la densité de vascularisation entre ces deux régions peuvent également expliquer le délai de fermeture plus important.

En conclusion, notre protocole ultrasonore permet une perméabilisation efficace et sûre de la BHE. De même, cette perméabilisation transitoire de la BHE n'affecte pas l'état général de l'animal (i.e., prise de poids, comportement locomoteur et cognitif – agressivité, isolement, etc.).

Partie III

Résultats et discussion

Chapitre 3

Analyses anatomopathologiques de l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique par sonoporation



III. Résultats et discussion	119
Chapitre 3. Analyses anatomopathologiques de l'ouverture de la barrière hématoencéphalique par sonoporation.....	133
1. Coloration histologique au crésyl violet et éosine.....	133
a) Rappels neuroanatomiques du cortex et du striatum	133
b) Analyses des coupes sagittales des cerveaux contrôles.....	136
c) Analyses des coupes sagittales des cerveaux 3 heures après la sonoporation	139
d) Analyses des coupes sagittales des cerveaux 48 heures après la sonoporation	142
e) Analyses des coupes sagittales des cerveaux 1 semaine après la sonoporation.....	142
f) Discussion	146
2. Immunomarquage	148
a) Résultats.....	148
(1) Mise en évidence des systèmes de neurotransmission GABAergique, glutamatergique et dopaminergique	148
(2) Mise en évidence de l'unité neurovasculaire.....	152
(3) Mise en évidence des protéines du stress cellulaire.....	156
b) Discussion	159
(1) Description des anticorps	159
(2) Ajustement du protocole.....	162
(3) Synthèse.....	163

Chapitre 3. Analyses anatomopathologiques de l'ouverture de la barrière hématoencéphalique par sonoporation

1. Coloration histologique au crésyl violet et éosine

Les coupes sagittales de cerveaux contrôles (*i.e.*, sans exposition aux ultrasons) et sonoporés (3 h, 48 h et 1 semaine après la sonoporation) ont été colorés par un mélange de crésyl violet (0,5%) et d'éosine (1%) pour respectivement mettre en évidence l'architecture globale du tissu nerveux et la présence éventuelle de cellules sanguines dans le tissu cérébral.

a) Rappels neuroanatomiques du cortex et du striatum

Le cortex est une structure cérébrale paire dérivant du télencéphale neuro-embryonnaire. Il est segmenté en 4 lobes (frontal, pariétal, temporal et occipital) dont la surface est divisée en plusieurs aires fonctionnelles. Il présente une organisation dorso-ventrale en 6 couches distinctes, dont la composition et la densité en neurones diffèrent entre chacune d'entre elles (Figure 30). De plus, chacune de ces couches reçoit et émet des projections avec les autres aires corticales et/ou avec les autres structures fonctionnelles du cerveau.

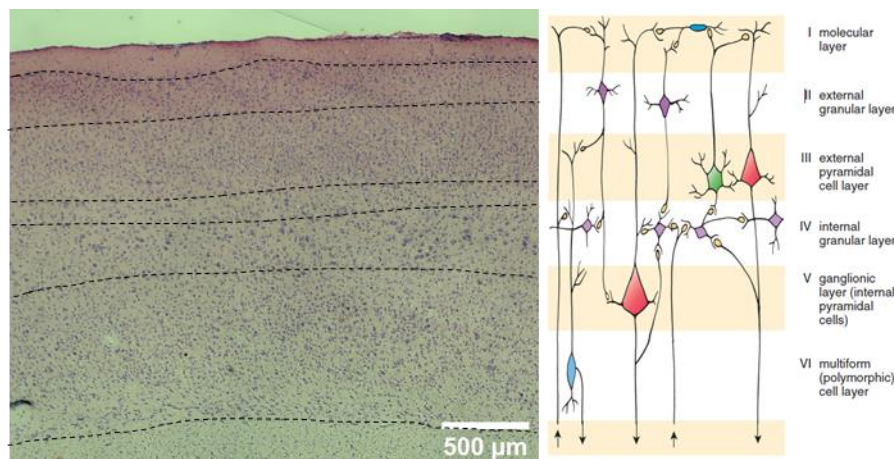


Figure 30 : Organisation laminaire du cortex cérébral. Adapté d'après (Pawlina and Ross, 2018)

On distingue la **première couche** la plus superficielle qui est appelée **couche moléculaire**. Elle est située juste en dessous de la pie-mère et contient principalement l'entrelacement des fibres nerveuses des autres couches corticales et des autres structures cérébrales. Cette couche demeure le lieu où se produit la neurotransmission synaptique. Sa population neuronale est composée de cellules de Cajal dispersées à travers la couche, dont la quantité diminue durant le développement. Les dendrites proviennent des neurones pyramidaux des couches inférieures, tandis que les axones terminaux proviennent des neurones présents dans les noyaux thalamiques. La **seconde couche** est la **couche granulaire externe** qui contient principalement des petites cellules granulaires (interneurones) et des neurones pyramidaux de petite taille. L'arbre dendritique s'étend superficiellement dans la couche moléculaire (1^{ère} couche). Les axones courent localement vers les autres couches corticales, et rejoignent les axones de la substance blanche sous corticale ou projettent vers les autres zones corticales en tant que fibres associatives. La **troisième couche** est appelée **couche pyramidale externe**. Elle contient les neurones pyramidaux de taille moyenne et de grande taille. Les dendrites de ces

neurones s'étendent à travers la couche pyramidale externe (2^{ème} couche) pour atteindre la couche moléculaire (1^{ème} couche). Leurs axones projettent vers les autres parties du cortex en tant que fibres commissurales ou associatives. Un certain nombre de fibres nerveuses proviennent de noyaux thalamiques spécifiques, notamment dans le cortex moteur primaire. La **quatrième couche** est la **couche granulaire interne** dont la population neuronale est principalement représentée par les interneurons et par quelques neurones pyramidaux. Les axones des interneurons restent dans le cortex, tandis que les axones des neurones pyramidaux projettent dans les couches corticales profondes ou vers la substance blanche sous-corticale. Les interneurons reçoivent les synapses des projections axonales thalamiques. Cette couche est le principal relai pour la communication entre le cortex somatosensoriel et le thalamus. La **cinquième couche** est appelée **couche pyramidale interne** dont l'épaisseur est réduite dans les aires motrices. La majorité des efférences de cette couche constitue la majeure partie des fibres des tractus corticobulbaires (structure du tronc cérébral) et corticospinaux. La population neuronale de cette couche est constituée de neurones pyramidaux de moyenne et de grande taille. Les fibres efférentes des neurones pyramidaux constituent le tractus corticostriatal témoignant de son rôle dans la motricité. La dernière et **sixième couche** constitue la **couche fusiforme** ou **polymorphique**. Elle est la plus proche de la substance blanche sous corticale et présente des neurones fusiformes, pyramidaux et des interneurons. Les projections vers la substance blanche sous-jacente de ces neurones constituent des fibres associatives et commissurales cortico-corticale et cortico-thalamique.

Le **striatum** (CPu) est une structure cérébrale profonde paire située à proximité des ventricules cérébraux. Elle est constituée des noyaux caudés, des putamens et des noyaux accubens (Figure 31). Le striatum est séparé : (i) en une **partie ventrale** qui contient les noyaux accubens ; (ii) et une **partie dorsale** qui contient les noyaux caudés et les putamens. D'un point de vue fonctionnel, le striatum est l'une des structures les plus importantes au sein des ganglions de la base. Il régit plusieurs **processus moteurs** et **cognitifs**. Il est la principale voie d'entrée des projections axonales vers les ganglions de la base et émet des efférences vers les autres noyaux des ganglions de la base (globus pallidus, noyaux sous thalamiques et substances noires) et vers le thalamus. La population neuronale striatale est très hétérogène dépendamment de la localisation neuroanatomique (Bolam *et al.*, 2000; Kreitzer and Malenka, 2008; Prager and Plotkin, 2019). En coupe sagittale, le striatum fait apparaître des bandes blanches longitudinales qui lui confèrent un aspect strié. Ces fibres correspondent à des fibres nerveuses. En coupe coronale, ces bandes fibreuses sont présentes sous forme d'îlots, conférant au striatum un aspect ponctiforme (Figure 31).

Les coupes sagittales révèlent la présence une bande fibreuse appelée capsule interne (ic), qui évolue dans l'axe antéro-postérieur (Figure 31A et C). Dans l'axe médio-latéral, cette bande débute en position ventrale et antérieure dans la partie interne du striatum pour terminer en position dorsale et postérieure dans la partie externe du striatum. De la même manière, la commissure antérieure (ac) qui traverse le cerveau dans l'axe antéro-postérieur se retrouve dans la partie interne et ventrale du striatum (Figure 31A, B et C). Ces deux structures apparaissent comme des bandes fibreuses blanches qui relient les structures antérieure et postérieure du cerveau. De plus, le globus pallidus (EGP) vient se loger contre la partie ventro-médiale du striatum et ventro-latérale de la capsule interne (Figure

31C). Cette structure apparaît entre la capsule interne et la partie postérieure de la commissure antérieure pour disparaître en position postérieure. Enfin le noyau accubens (Acb) vient prendre naissance dans la partie antérieure du cerveau, en position ventro-médiale par rapport au striatum et disparaît un peu avant l'apparition de la capsule interne (Figure 31A et B).

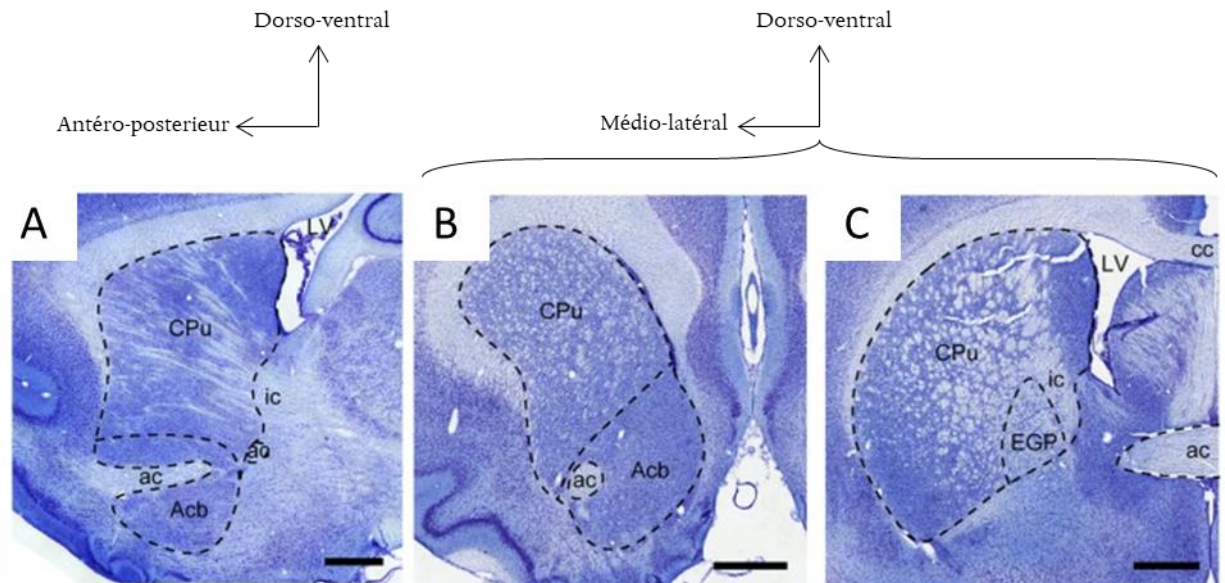


Figure 31 : Coupes sagittales (en A) et coronales (en B et C) de cerveaux de rat. ac : commissure antérieure ; Acb : noyau accubens ; cc : corps calleux ; CPU : noyaux caudé putamen ; EGP : globus pallidus externe ; ic : capsule interne ; LV : ventricules latéraux. Modifié d'après (Ni *et al.*, 2018). Les axes neuroanatomiques sont représentés au-dessus des panels A, B et C.

b) Analyses des coupes sagittales des cerveaux contrôles

L'analyse des **tissus cérébraux controlatéraux** ne montre aucune désorganisation des structures corticales, ni des striata. De plus, aucune cellule sanguine rouge n'a été observée dans les structures cérébrales. Aucun dommage ou œdème n'ont été constatés à l'observation microscopique des coupes controlatérales chez les animaux contrôles, 3 h, 48 h et 1 semaines après la sonoporation (Annexe 15).

Les analyses histologiques par coloration au crésyl violet et à l'éosine des coupes sagittales de cerveaux de rats contrôles (*i.e.*, n'ayant pas subi la sonoporation) ne révèlent pas d'anomalies morphologiques, ni la présence de cellules sanguines rouges dans le tissu cérébral (Figure 32). Le **cortex** présente l'organisation laminaire attendue et ne présente pas de dommages, ni d'œdèmes ou d'hémorragies. La localisation des coupes, d'après l'atlas de Paxinos et Watson qui fournit les coordonnées stéréotaxiques par rapport à la ligne interhémisphérique, associe les régions corticales avec les aires fonctionnelles (Paxinos and Watson, 2013). Les cortex somatosensoriels des membres antérieurs et postérieurs, ainsi que celui associé aux épaules ont ainsi été identifiés. De même, aucune anomalie n'a été détectée dans les **striata** des rats contrôles (Figure 33). De plus, aucune extravasation d'érythrocytes n'a été observée. En localisant les coupes sagittales par rapport à la ligne interhémisphérique, la capsule interne, la commissure antérieure et le globus pallidus ont été identifiés.

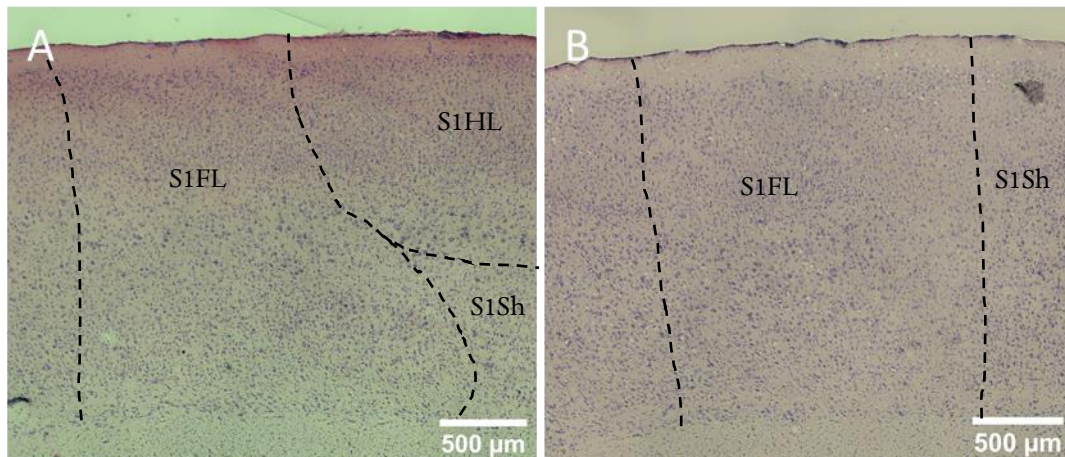


Figure 32 : Analyse histologique par coloration au crésyl violet et à l'éosine du cortex de rats contrôles n'ayant pas subi la sonoporation. La latéralité des coupes par rapport à la ligne interhémisphérique est comprise entre 2,90 mm et 3,18 mm (en A), et entre 3,18 mm et 3,75 mm (en B). S1FL : cortex somatosensoriel primaire des membres antérieurs ; S1HL : cortex somatosensoriel primaire des membres postérieurs ; S1Sh : cortex somatosensoriel primaire des épaules.

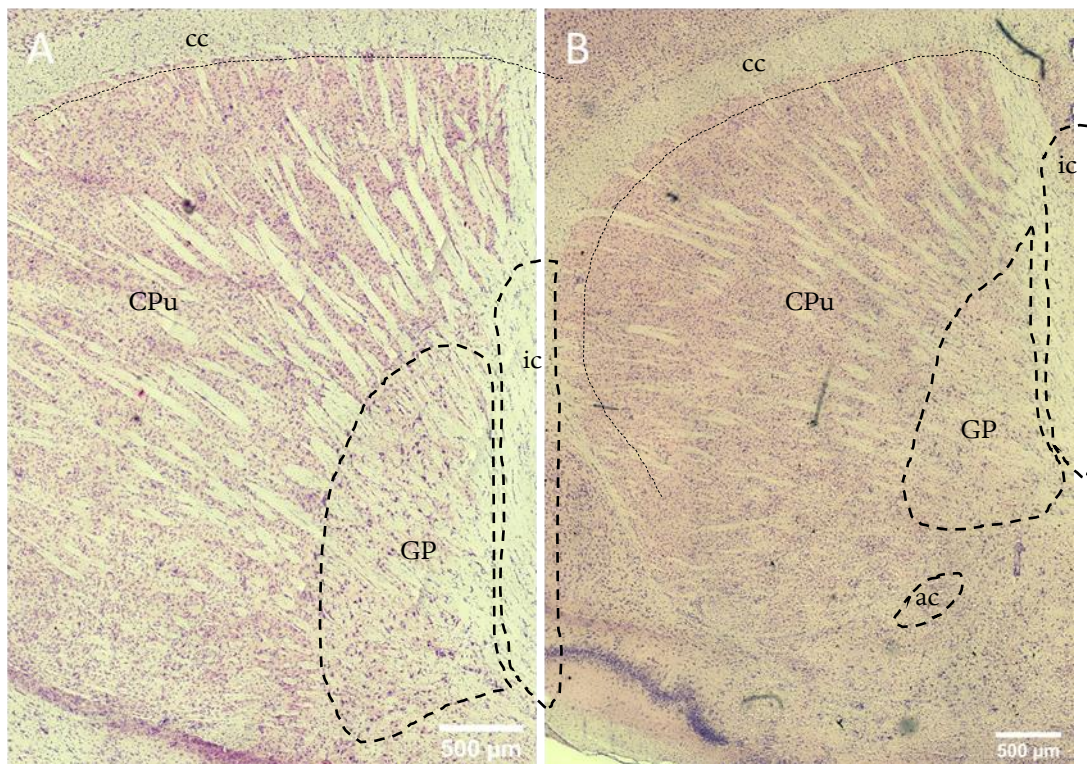


Figure 33 : Analyse histologique par coloration au crésyl violet et à l'éosine du striatum de rats contrôles n'ayant pas subi la sonoporation. La latéralité des coupes par rapport à la ligne interhémisphérique est comprise entre 2,90 mm et 3,18 mm (en A), et entre 3,18 mm et 3,75 mm (en B). ac : commissure antérieure ; cc : corps calleux ; CPu : noyaux caudé putamen ; GP : globus pallidus; ic : capsule interne.

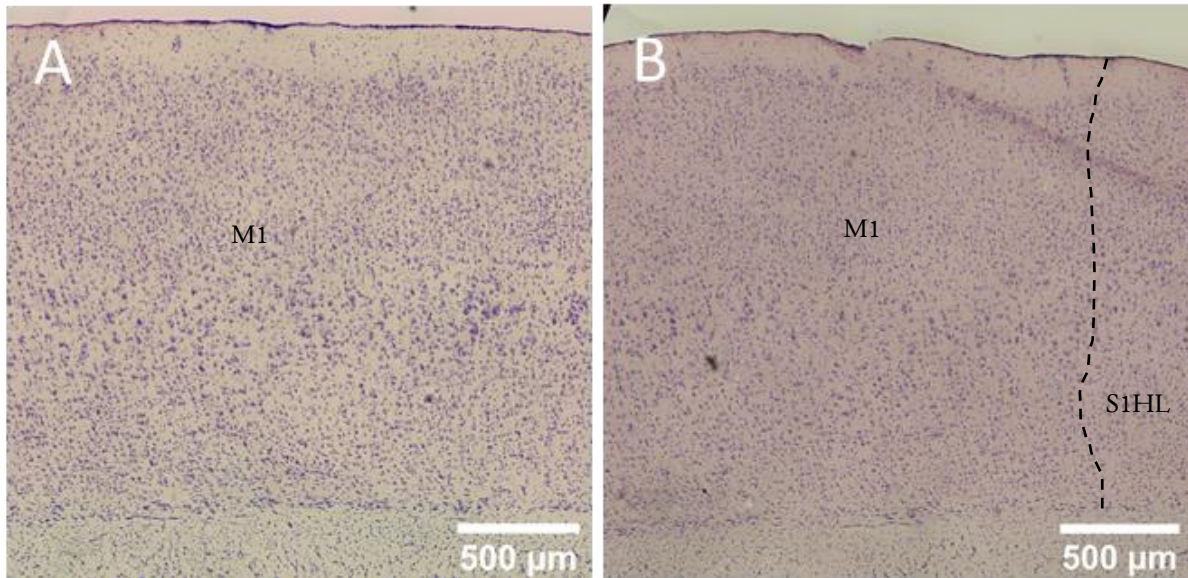


Figure 34 : Analyse histologique par coloration au crésyl violet et à l'éosine du cortex de rats 3 heures après la sonoporation du striatum. La latéralité des coupes par rapport à la ligne interhémisphérique est comprise entre 2,40 mm et 2,62 mm (en A), et entre 2,62 mm et 2,90 mm (en B). M1 : cortex moteur primaire ; S1HL : cortex somatosensoriel primaire des membres antérieurs.

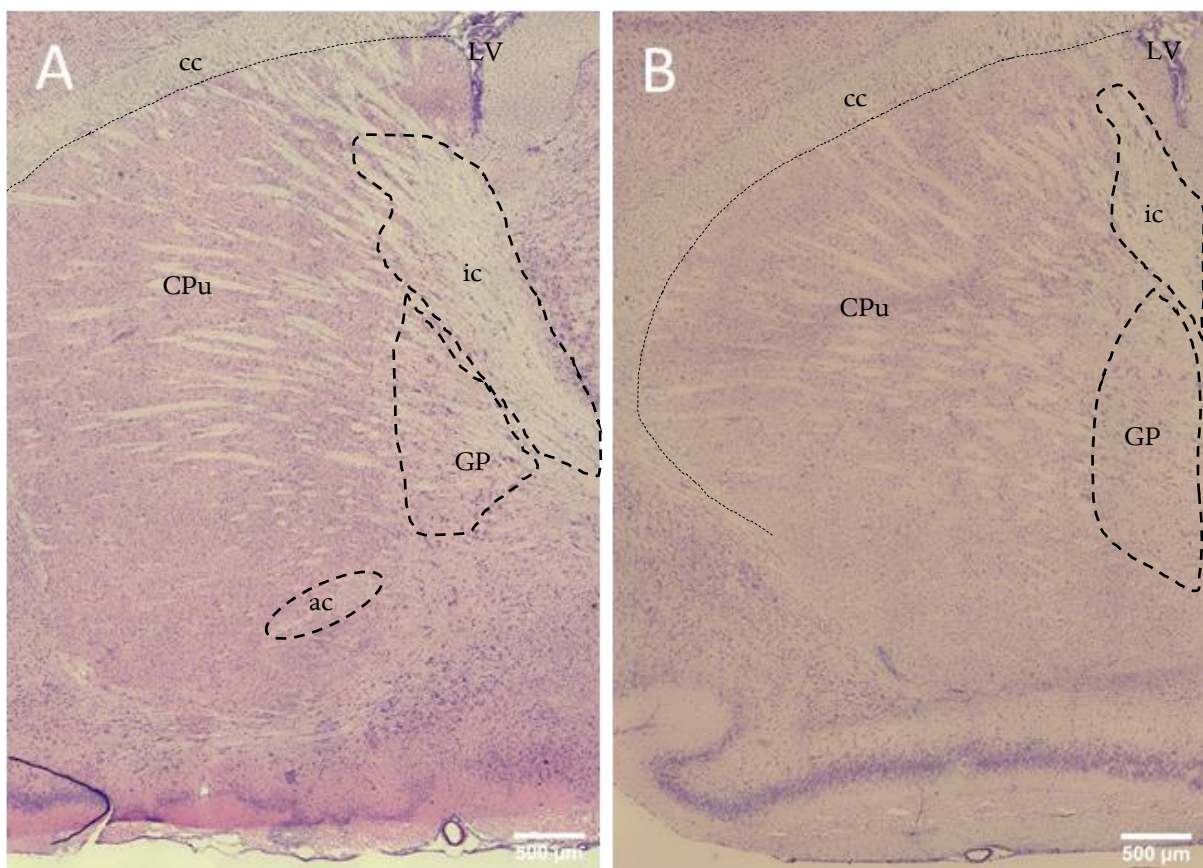


Figure 35 : Analyse histologique par coloration au crésyl violet et à l'éosine du striatum de rats 3 heures après la sonoporation. La latéralité des coupes par rapport à la ligne interhémisphérique est comprise entre 2,40 mm et 2,62 mm (en A), et entre 2,62 mm et 2,90 mm (en B). ac : commissure antérieure ; cc : corps calleux ; CPu : noyaux caudé putamen ; GP : globus pallidus ; ic : capsule interne ; LV : ventricule latéral.

c) Analyses des coupes sagittales des cerveaux 3 heures après la sonoporation

L'analyse histologique des **tissus cérébraux corticaux** 3 h après la sonoporation (Figure 34) ne révèle pas de désorganisation des couches corticales. De plus, aucune extravasation de cellules sanguines rouges n'a été observée. D'après la localisation des coupes par rapport à la ligne interhémisphérique, les aires fonctionnelles associées aux zones corticales sont le cortex moteur primaire (M1) et le cortex somatosensoriel primaire des membres antérieurs (S1HL).

L'analyse histologique des **striata** 3 h après la sonoporation (Figure 36) révèle à de rare occasion la présence de structures vacuolaires dans le trajet du faisceau ultrasonore. Ces vacuoles ont également été observées dans le noyau accumbens (Figure 37). Il est également possible d'observer la présence d'un élément coloré en rouge violacé au sein du striatum (Figure 38).

Les striata qui présentent ces particularités anatomopathologiques sont localisés entre 2,10 mm et 2,40 mm ; et entre 2,62 mm et 2,90 mm par rapport à la ligne interhémisphérique. Il est possible d'identifier les structures suivantes : la capsule interne, le globus pallidus et la commissure antérieure. Les cortex sus-jacents ne présentent pas d'anomalies anatomohistopathologiques.

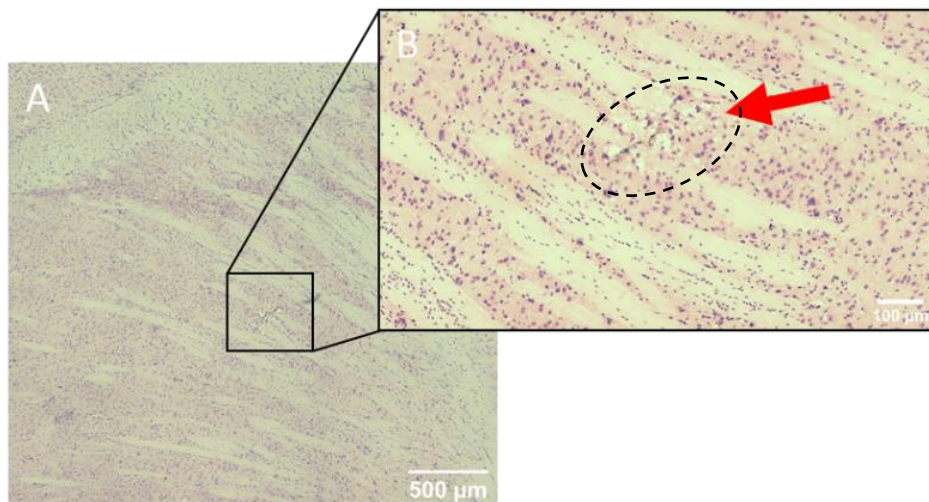


Figure 36 : Agrandissement d'une vacuolisation dans le striatum sonopéré d'un rat 3 heures après la procédure. La latéralité de cette coupe sagittale par rapport à la ligne interhémisphérique se trouve entre 2,62 mm et 2,90 mm.

Page laissée intentionnellement vide

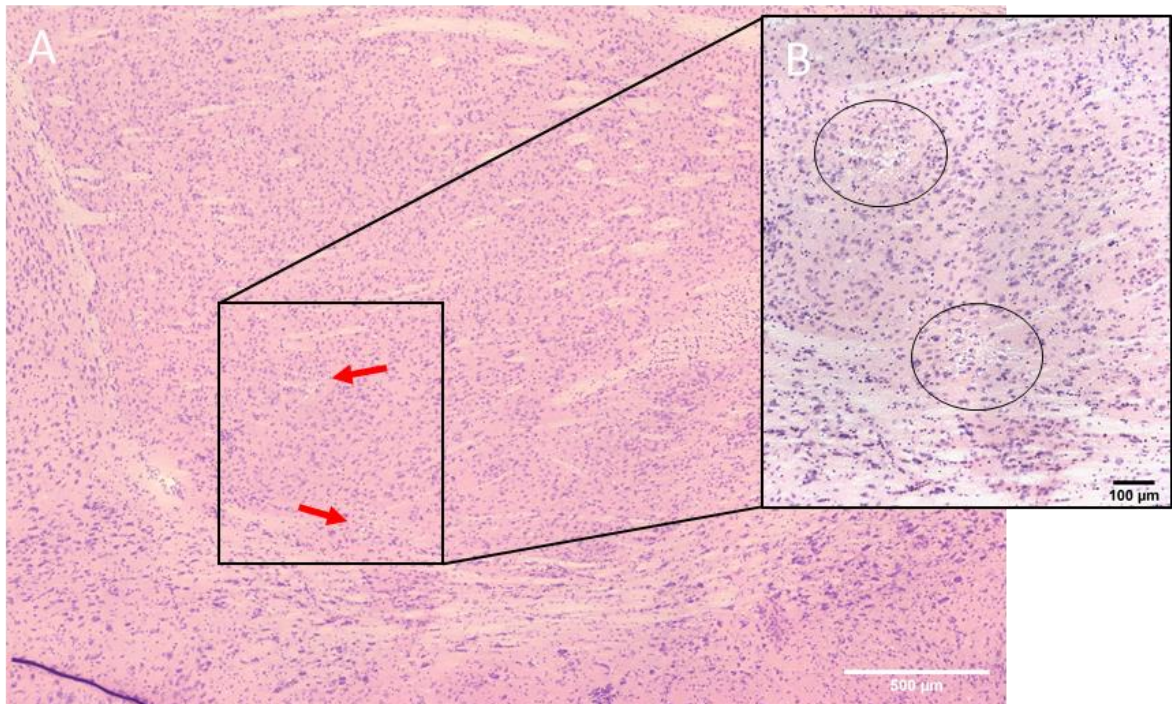


Figure 57 : Structures vacuolaires identifiées dans la partie antéro-ventrale du striatum (en A). Les flèches pointent des vacuolisations qui sont agrandies (en B). La latéralité de cette coupe par rapport à la ligne interhémisphérique est comprise entre 2,40 mm et 2,62 mm.

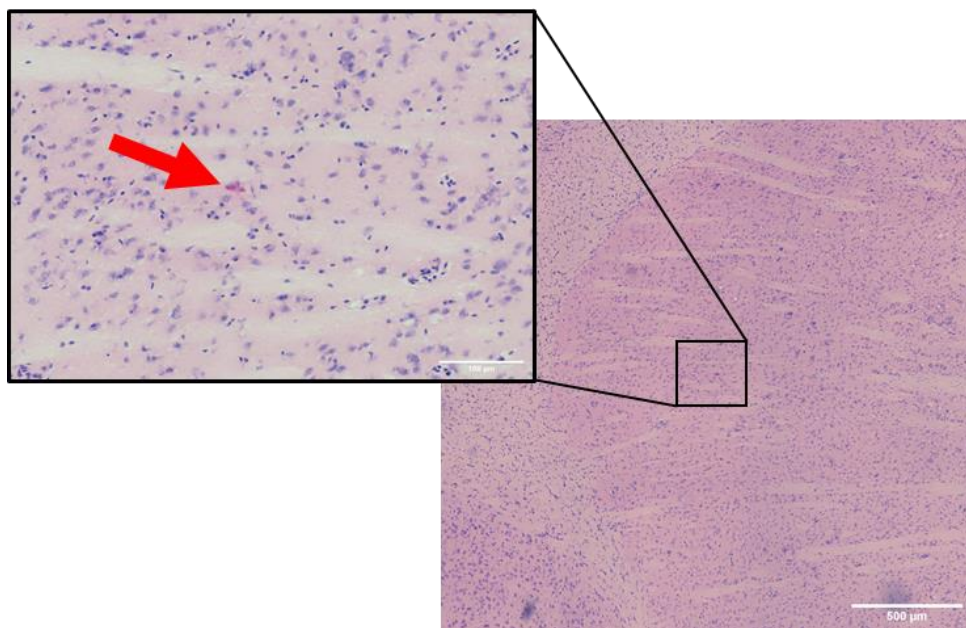


Figure 58 : Agrandissement d'une zone montrant la présence de cellules sanguines dans le striatum sonopéré d'un rat 3 heures après la procédure. La latéralité de cette coupe par rapport à la ligne interhémisphérique est comprise entre 2,10 mm et 2,40 mm.

d) Analyses des coupes sagittales des cerveaux 48 heures après la sonoporation

Les analyses histologiques par coloration au crésyl violet et à l'éosine des coupes sagittales de cerveaux de rats 48 heures après la sonoporation ne révèlent pas d'anomalies morphologiques, ni la présence de cellules sanguines dans le tissu cérébral (Figure 39). Le **cortex** ne présente pas de dommages, ni d'œdèmes ou d'hémorragies. Les cortex somatosensoriels des membres antérieurs et postérieurs, ainsi que le cortex moteur primaire sont identifiés selon la distance par rapport à la ligne interhémisphérique.

Aucune anomalie (œdème, dommage tissulaire, *etc.*) n'a été détectée dans les **striata** des rats 48 heures après la sonoporation (Figure 40). De plus, aucune extravasation d'érythrocytes n'a été observée. En localisant les coupes sagittales par rapport à la ligne interhémisphérique, la capsule interne, la commissure antérieure, le noyau accubens et le globus pallidus sont identifiés.

e) Analyses des coupes sagittales des cerveaux 1 semaine après la sonoporation

Les analyses histologiques par colorations au crésyl violet et à l'éosine sur les coupes sagittales de cerveaux de rats 1 semaine après la sonoporation ne révèlent pas d'anomalies morphologiques, ni la présence de cellules sanguines rouges dans le tissu cérébral (Figure 41). Le **cortex** ne présente pas de dommages, ni d'œdèmes ou d'hémorragies. Le cortex somatosensoriel des membres antérieurs, ainsi que le cortex moteur primaire sont identifiés.

Aucune anomalie (œdème, dommage tissulaire, *etc.*) n'a été détectée dans les **striata** des rats 1 semaine après la sonoporation (Figure 42). De plus, aucune extravasation d'érythrocytes n'a été observée. En localisant les coupes sagittales par rapport à la ligne interhémisphérique, la capsule interne, la commissure antérieure et le globus pallidus sont identifiés.

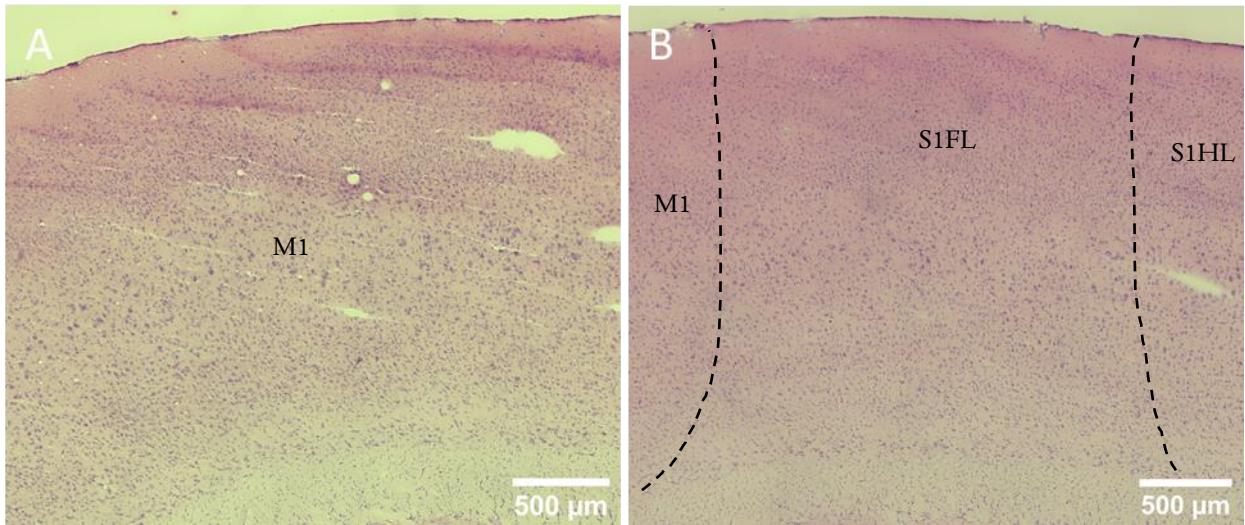


Figure 39 : Analyse histologique par coloration au crésyl violet et à l'éosine du cortex de rats 48 heures après la sonoporation du striatum. La latéralité des coupes par rapport à la ligne interhémisphérique est comprise entre 2,40 mm et 2,62 mm (en A), et entre 2,62 mm et 2,90 mm (en B). M1 : cortex moteur primaire ; S1FL : cortex somatosensoriel des membres postérieurs ; S1HL : cortex somatosensoriel des membres antérieurs.

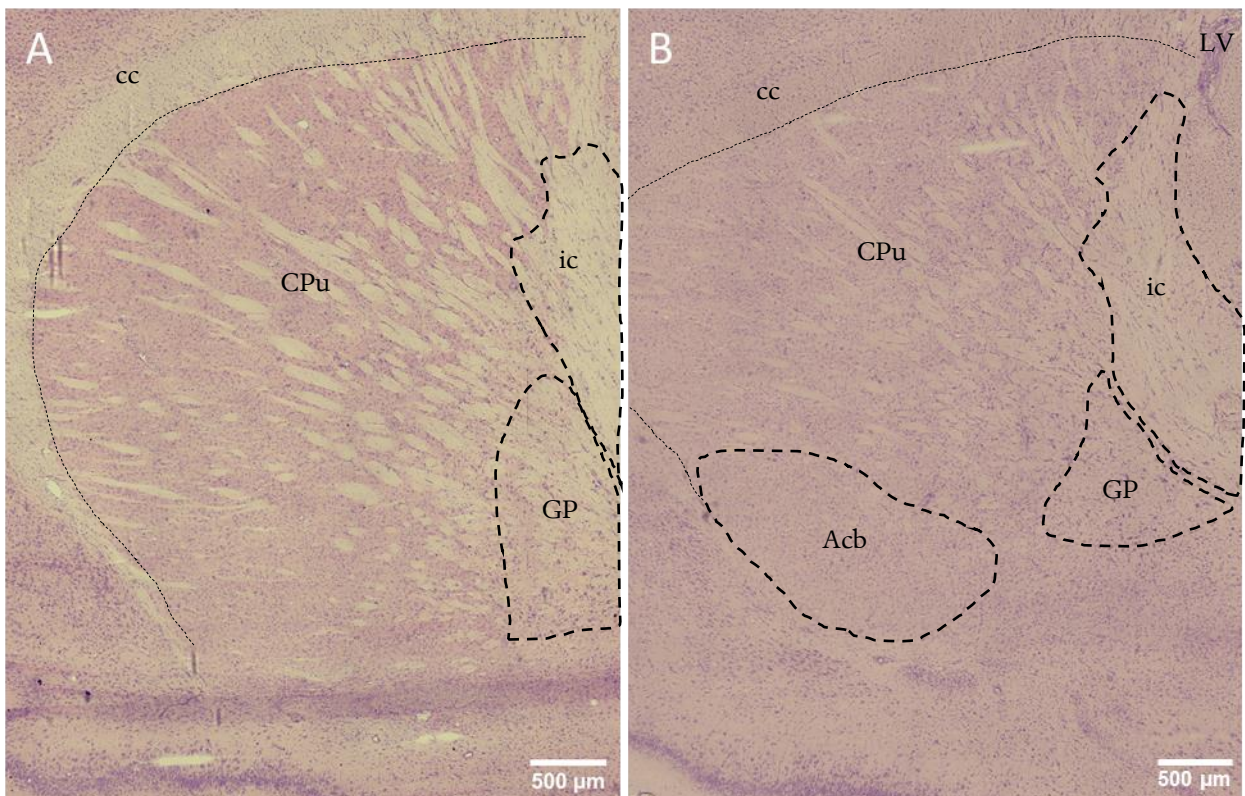


Figure 40 : Coloration de Nissl et éosine du striatum de rats 48 heures après la sonoporation. La latéralité des coupes par rapport à la ligne interhémisphérique est comprise entre 2,40 mm et 2,62 mm (en A), et entre 2,62 mm et 2,90 mm (en B). ac : commissure antérieure ; Acb : noyau accubens ; cc : corps calleux ; CPu : noyaux caudé putamen ; GP : globus pallidus ; ic : capsule interne ; LV : ventricule latéral.

Page vide laissée intentionnellement

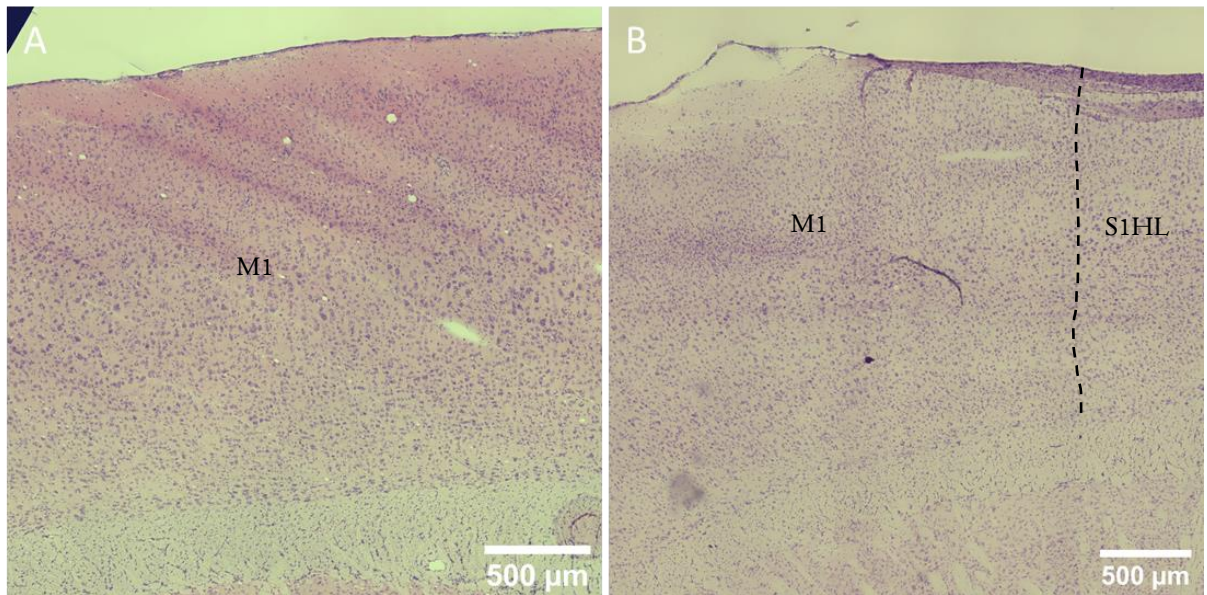


Figure 41 : Analyse histologique par coloration au crésyl violet et à l'éosine du cortex de rats 1 semaine après la sonoporation du striatum. La latéralité des coupes par rapport à la ligne interhémisphérique est comprise entre 2,40 mm et 2,62 mm (en A), et entre 2,62 mm et 2,90 mm (en B). M1 : cortex moteur primaire ; S1HL : cortex somatosensoriel des membres antérieurs.

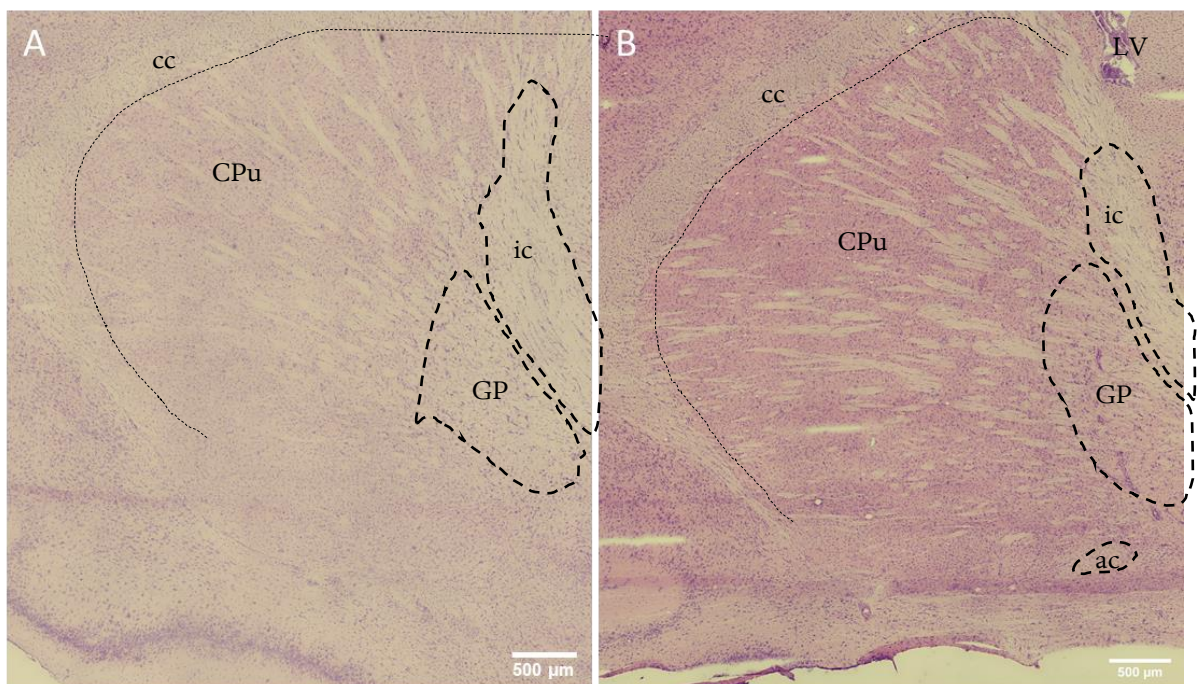


Figure 42 : Analyse histologique par coloration au crésyl violet et à l'éosine du striatum de rats 1 semaine après la sonoporation. La latéralité des coupes par rapport à la ligne interhémisphérique est comprise entre 2,40 mm et 2,62 mm (en A), et entre 2,62 mm et 2,90 mm (en B). ac : commissure antérieure ; cc : corps calleux ; CPu : noyaux caudé putamen ; GP : globus pallidus ; ic : capsule interne ; LV : ventricule latéral.

f) Discussion

Les tissus sont colorés par une technique de coloration basée sur l'utilisation du crésyl violet et de l'éosine. Le crésyl violet est un colorant basique ou cationique qui se fixe au composé acide ou anionique. Les neurones contiennent des structures appelées corps de Nissl dont la forme, la quantité et la distribution varient en fonction du type cellulaire neuronal ou glial. Ces structures sont des agrégats présents sur le réticulum endoplasmique rugueux et contiennent de nombreuses molécules d'ARN messager. De ce fait, ces molécules leur confèrent un caractère acide et donc basophile attirant alors le colorant. À l'inverse, l'éosine est un colorant acide et donc basophile. L'éosine colore donc les structures cellulaires basiques telles que le cytoplasme et l'hémoglobine. En effet, l'éosine colore en rouge-cerise les érythrocytes et en rouge rosé le cytoplasme des cellules.

Nos résultats ont montré la présence de petites vacuolisations dans le tissu nerveux des groupes ayant subi la sonoporation. Ces vacuolisations ont été décrites par Baseri *et al.*, lors de l'utilisation de la sonoporation avec un faible index mécanique dans l'hippocampe (*i.e.*, 0,4) et dont la sévérité augmentait avec la pression acoustique. Les paramètres acoustiques utilisés lors de notre étude correspondent à un IM de 0,6 MPa. Cependant, la pression acoustique réellement transmise dans le tissu s'élève à 0,3 MPa, soit un IM de 0,3. De plus, la région ciblée par la sonoporation dans notre étude est le striatum, alors que Baseri *et al.*, ciblent la région de l'hippocampe. L'hippocampe est une zone cérébrale sous corticale hétérogène dont la densité en neurones et en fibres nerveuses est élevée au niveau des gyrus dentés. Cependant, la densité neuronale de cette structure est relativement moins importante que le cortex et le striatum (Keller *et al.*, 2018). Baseri *et al.*, ont utilisé des microbulles Definity® qui ont un diamètre moyen de 1,5 µm à 3 µm, alors que les microbulles Vevo MicroMarker® ont un diamètre moyen de 2,3 µm à 2,9 µm. Le diamètre supérieur de nos microbulles pourrait alors provoquer des effets physiques plus importants que les Definity® expliquant alors l'apparition des vacuolisations à une pression acoustique plus faible.

De plus, Baseri *et al.*, ont observé la présence de microhémorragies lors de la sonoporation à partir d'une pression acoustique de 0,61 MPa. Nos résultats ont montré l'extravasation d'érythrocytes dans le tissu nerveux. Cette extravasation n'est pas associée à des dommages tissulaires ni à la formation d'œdèmes.

Les analyses histologiques n'ont pas révélé de dommages ni la présence d'hémorragies. De plus, aucune désorganisation du tissu cérébral n'a été observé. Cependant, quelques vacuolisations ont été remarquées, sans pour autant être accompagnées d'une accumulation de cellules gliales ou de dommages tissulaires.

2. Immunomarquage

Nous avons mis en pratique une coloration au crésyl violet et à l'éosine qui analyse respectivement l'organisation cytoarchitecturale du tissu nerveux et l'extravasation potentielle d'érythrocytes. Nous avons ensuite réalisé des immunomarquages pour révéler la surexpression de protéines spécifiques. Les coupes sagittales de cerveaux contrôles (*i.e.*, sans exposition aux ultrasons) et sonoporés (3 h, 48 h et 1 semaine après la sonoporation) ont été traitées selon le protocole présenté dans le Matériel et Méthodes (pp. 113).

Nous avons choisi les anticorps sur la base de l'analyse des données issues des approches de transcriptomique et de métabolomique, mais également par rapport à la littérature. Les principaux immunomarquages réalisés sont les suivants :

- Immunomarquage des protéines relatives à l'inflammation et à la réponse immunitaire (GFAP, NFκB, S100β)
- Immunomarquage des protéines relatives aux cellules endothéliales (Claudine 5, ZO-1 et SMI71)
- Immunomarquage des protéines relatives au stress cellulaire (HIF1α, CD163)

Les coupes immunomarquées sont contre-colorées avec du DAPI, qui émet une fluorescence bleue sous ultraviolet. Les anticorps seront présentés sous cette forme :

- *Espèce hôte* α (anti) *espèce cible* **protéine** pour les anticorps primaire (I^{aire}) ;
- *Espèce hôte* α *espèce cible* **longueur d'onde** pour les anticorps secondaire (II^{aire}).

Par exemple, l'anticorps I^{aire} *Mouse* α *Rat* **SMI71** révélé par l'anticorps II^{aire} *Goat* α *Mouse* **488**.

Les principales espèces utilisées dans cette étude sont : la souris (*Mouse* – *Ms*), le lapin (*Rabbit* – *Rb*), le poulet (*Chicken* – *Ck*) et le rat (*Rat* – *Rt*). La longueur d'onde des principaux anticorps II^{aire} sont 488 nm (vert), 555 nm ou Cy3 (rouge) et 647 nm rouge lointain (invisible à l'œil nu).

a) Résultats

(1) Mise en évidence des systèmes de neurotransmission GABAergique, glutamatergique et dopaminergique

L'anticorps I^{aire} *Rb* dirigé contre la **glutamine déshydrogénase** (GAD) est incubé à une concentration de 1/250, puis révélé par un anticorps II^{aire} *Gt* α *Rb* 488 à une concentration de 1/500. Ce marquage est réalisé sur des coupes sagittales de cerveaux de rats 3 h, 48 h et 1 semaine après la sonoporation, et sur des coupes de cerveaux de rats contrôles (Figure 43).

La présence de l'anticorps primaire dans le striatum postéro-dorsal est révélée par la fluorescence de couleur verte. Les observations de cet immunomarquage montrent la présence d'un important bruit de fond avec des zones diffuses où le signal de fluorescence est particulièrement intense (Figure 43B). De plus, ce marquage vert n'est pas homogène dans le striatum. La présence d'agrégats révélée par des points de fluorescence est observable sur la coupe de cerveau de rats contrôles, et est indiquée par les

petites flèches jaunes (Figure 43A et C). Ces agrégats ne colocalisent pas avec les noyaux cellulaires, ni autour de ceux-ci. Nous notons également la présence d'un marquage non spécifique, désignée par des flèches blanches sur la Figure 43A. Un signal dont l'intensité est accentuée, colocalisant avec les noyaux est également mis en évidence par des flèches rouges sur la Figure 43D.

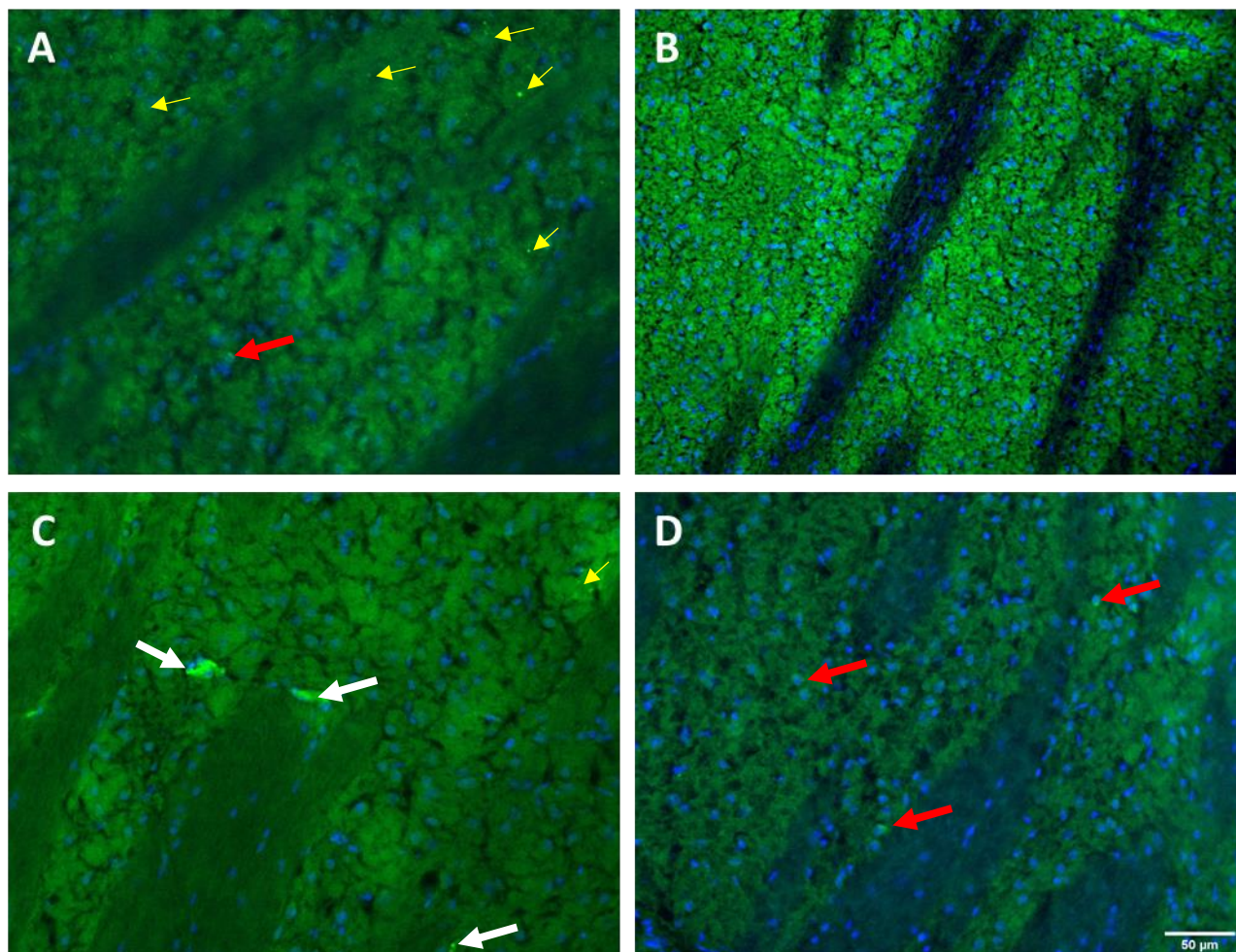


Figure 43 : Immunomarquage dirigé contre la glutamate déshydrogénase (GAD) sur des coupes de cerveaux de rats contrôles (en A) ; de rats ayant reçu une injection de microbulles suivie d'une exposition aux ultrasons puis sacrifiés 3 h (en B), 48 h (en C) et 1 semaine (en D) après la procédure. Les flèches blanches désignent un marquage non spécifique. Les flèches rouges désignent la colocalisation des fluorescences. Les flèches jaunes montrent une agrégation. L'échelle du panel D est commune à tous les panels.

L'anticorps I^{aire} *Rb* dirigé contre la **glutamine synthetase** (GS) du rat (*Rt*) est incubé à une concentration de 1/250, puis révélé par un anticorps II^{aire} *Gt α Rb* 488 à une concentration de 1/500 (Figure 44). Ce marquage est réalisé sur des coupes sagittales de cerveaux de rats 3 h et 48 h après la sonoporation, ainsi que sur des coupes de cerveaux contrôles.

La présence de l'anticorps primaire dans le striatum postéro-dorsal est révélée par la fluorescence de couleur verte. Les résultats de cet immunomarquage montrent une fluorescence diffuse dans le striatum et le cortex (Figure 44A et Figure 44D). Ce marquage présente un important bruit de fond. Une colocalisation entre la fluorescence verte et le noyau cellulaire est observée en plusieurs zones, et notamment au niveau des fibres du striatum, symbolisée par les flèches rouges (Figure 44). De

nombreux agrégats sont observables, indiqués par les flèches jaunes (Figure 44A, B et C). De plus, plusieurs marquages fluorescents intenses indiquent un marquage non spécifique.

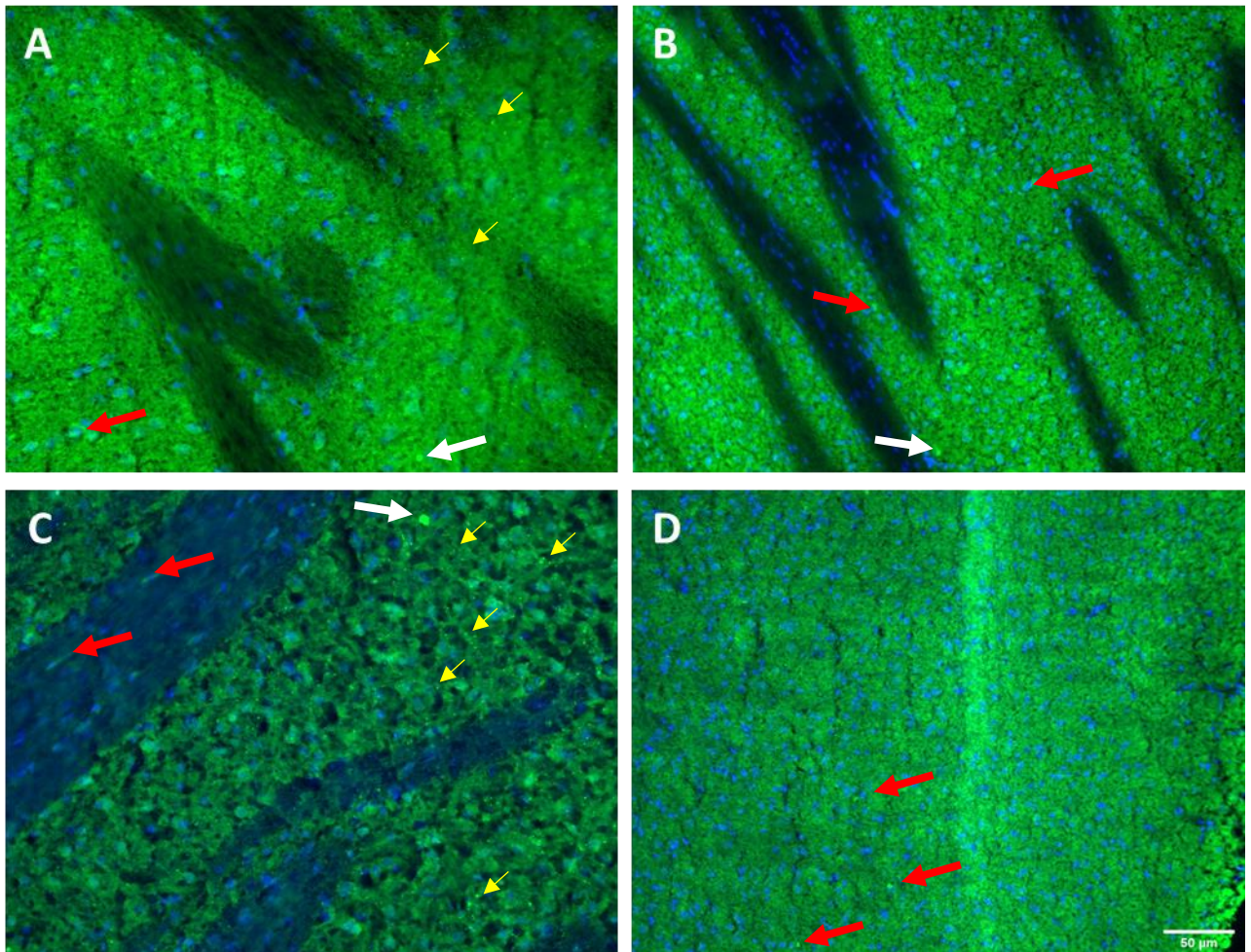


Figure 44 : Immunomarquage dirigé contre la glutamine synthétase (GS) sur des coupes de cerveaux de rats contrôles (en A) ; et de rats ayant reçu une injection de microbulles suivie d'une exposition aux ultrasons, puis sacrifiés 3 h (en B), 48 h (en C) après la procédure. Les flèches blanches désignent un marquage non spécifique. Les flèches rouges désignent la colocalisation des fluorescences. Les flèches jaunes montrent une agrégation. L'échelle du panel D est commune à tous les panels.

Les anticorps I^{aire} *Rb* dirigés contre les **transporteurs du GABA** (GAT1 et GAT2), et le **transporteur des acides aminés excitateurs** (EAAT3) sont respectivement incubés à une concentration de 1/500 (GAT1) et 1/250 (GAT2 et EAAT3), puis révélés par un anticorps II^{aire} *Gtα Rb 488* à une concentration de 1/500. Ce marquage est réalisé sur des coupes sagittales de cerveaux de rats 3 h et 48 h après la sonoporation, ainsi que sur des coupes de cerveaux contrôles (Figure 45).

La présence des anticorps primaires dans le striatum postéro-dorsal est révélée par la fluorescence de couleur verte. Les résultats de cet immunomarquage montrent une fluorescence diffuse dans le striatum (Figure 45A, B et C). La fluorescence est polluée par un important bruit de fond. Ce bruit de fond est également présent lors de l'observation de la contre-coloration au DAPI. Une colocalisation entre la fluorescence verte et le noyau cellulaire est détectée dans plusieurs régions cérébrales, symbolisée par les flèches rouges (Figure 45B et C). De nombreux agrégats sont observables indiqués

par les flèches jaunes (Figure 45A et C). De plus, plusieurs marquages fluorescents intenses témoignent d'un marquage non spécifique, signalés par des flèches blanches (Figure 45B).

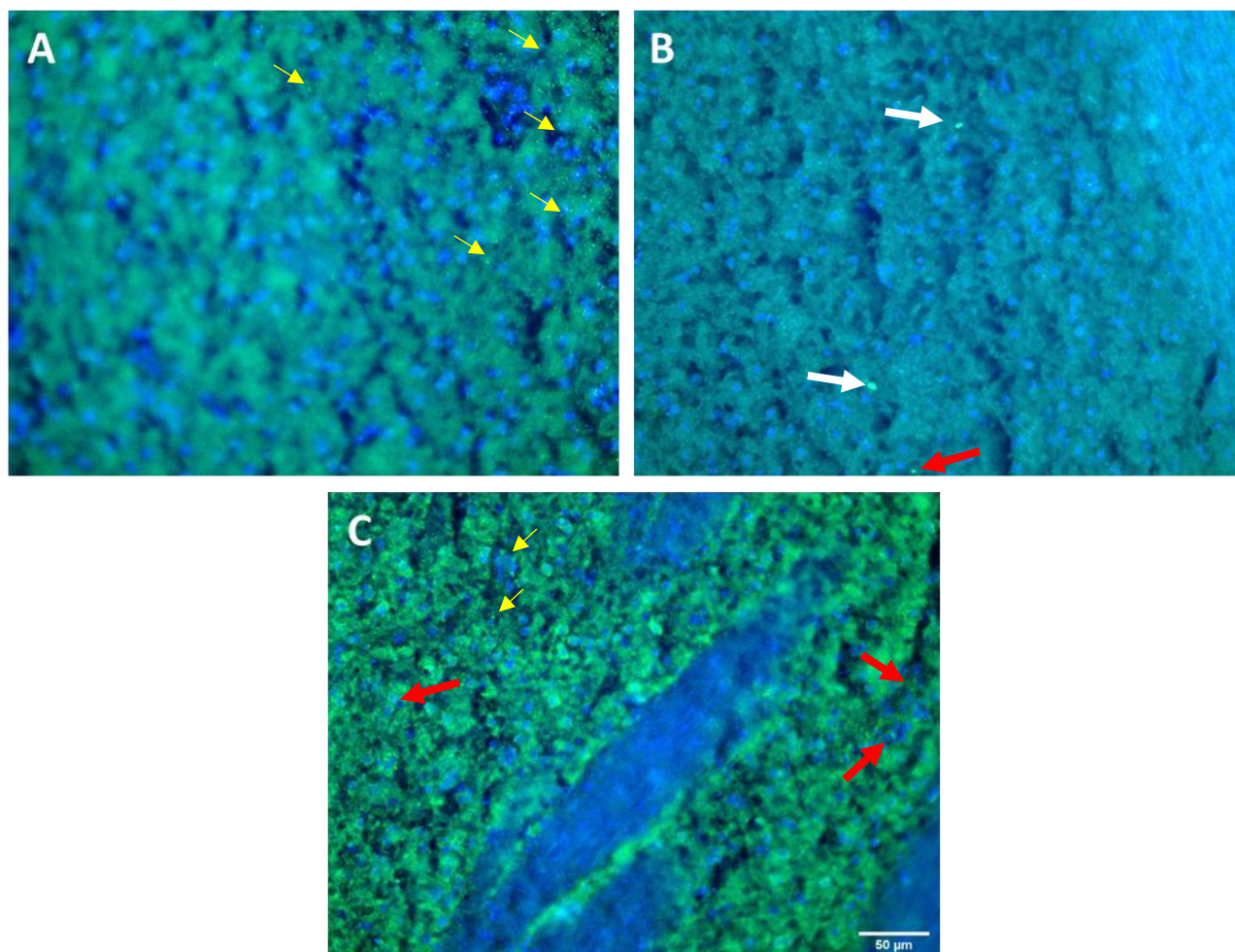


Figure 45 : Immunomarquage dirigé contre les transporteurs 1 et 2 du GABA (en A et en B) et le transporteur des acides aminés excitateurs (en C) sur des coupes de cerveaux de rats contrôles. Les flèches blanches désignent un marquage non spécifique. Les flèches rouges désignent la colocalisation des fluorescences. Les flèches jaunes montrent une agrégation. L'échelle du panel C est commune à tous les panels.

L'anticorps I^{aire} *Rb* dirigé contre la **tyrosine hydroxylase** (TH) est incubé à une concentration de 1/500, puis révélé par un anticorps II^{aire} *Gt α Rb* 488 à une concentration de 1/500. Ce marquage est réalisé sur des coupes sagittales de cerveaux de rats 3 h, 48 h après la sonoporation, et sur des coupes de cerveaux contrôles (Figure 46).

La présence des anticorps primaires dans le striatum postéro-dorsal est révélée par la fluorescence de couleur verte. Les résultats de cet immunomarquage montrent une fluorescence diffuse dans le striatum (Figure 46A, B et C). De plus, la substance noire dans le mésencéphale présente un important marquage diffus (Figure 46D).

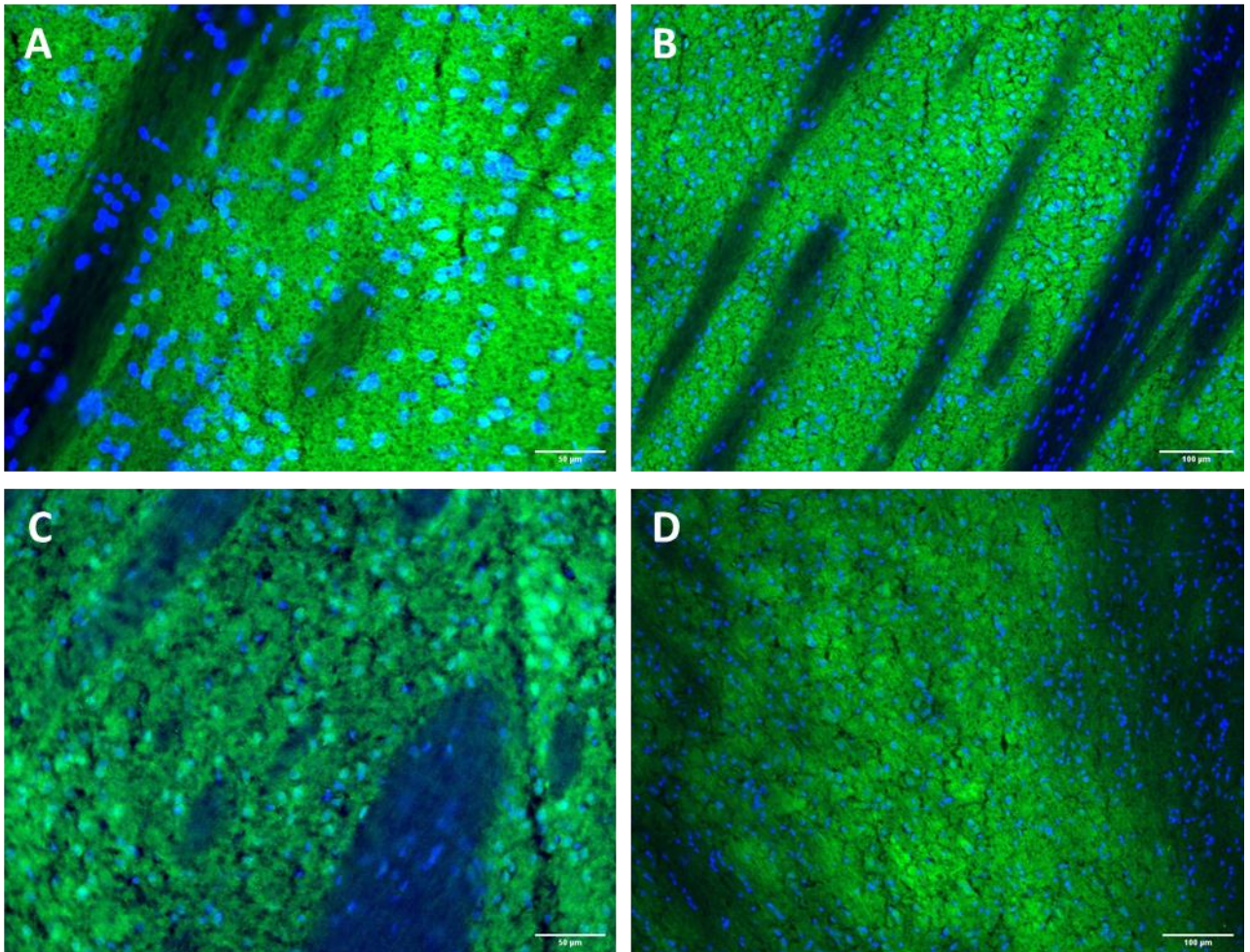


Figure 46 : Immunomarquage dirigé contre la tyrosine hydroxylase (TH) dans le striatum de rats contrôles (en A) et ayant reçu une injection de microbulles suivie d'une exposition aux ultrasons puis sacrifiés 3 h (en B), 48 h (en C) après la procédure et dans la substance noire (en D) du cerveau de rat contrôlé.

(2) Mise en évidence de l'unité neurovasculaire

L'anticorps I^{aire} *Rb* dirigé contre la **protéine S100 β** est incubé à une concentration de 1/500, puis révélé par un anticorps II^{aire} *Gt α Rb* 488 à une concentration de 1/500. De plus, un double marquage est réalisé en incubant l'anticorps I^{aire} *Ms* dirigé contre la **protéine SMI71** à une concentration de 1/500, puis révélé par un anticorps II^{aire} *Gt α Ms Cy3* à une concentration de 1/250. SMI71 est un anticorps spécifique des vaisseaux sanguins de la BHE chez le rat. La protéine S100 β est une protéine spécifique des astrocytes (Figure 47). Ce marquage est réalisé sur des coupes sagittales de cerveaux de rats contrôles. Le marquage obtenu est comparé entre trois structures : le cortex, le striatum et l'hippocampe.

Le marquage rouge met en lumière des structures fusiformes et tortueuses qui correspondraient aux vaisseaux sanguins. Le marquage vert, mettant en évidence la protéine S100 β , colocalise avec les noyaux cellulaires dans le cortex. De plus, des structures fibrillaires dans le cortex et le striatum sont marquées par la fluorescence verte (flèches blanches ; Figure 47A et B). Ces fibres ne sont pas retrouvées dans l'hippocampe. L'intensité de la fluorescence rouge est plus importante dans le striatum

que dans le cortex (Figure 47A et B). Cette intensité est elle-même plus importante dans le cortex que dans l'hippocampe (Figure 47B et C).

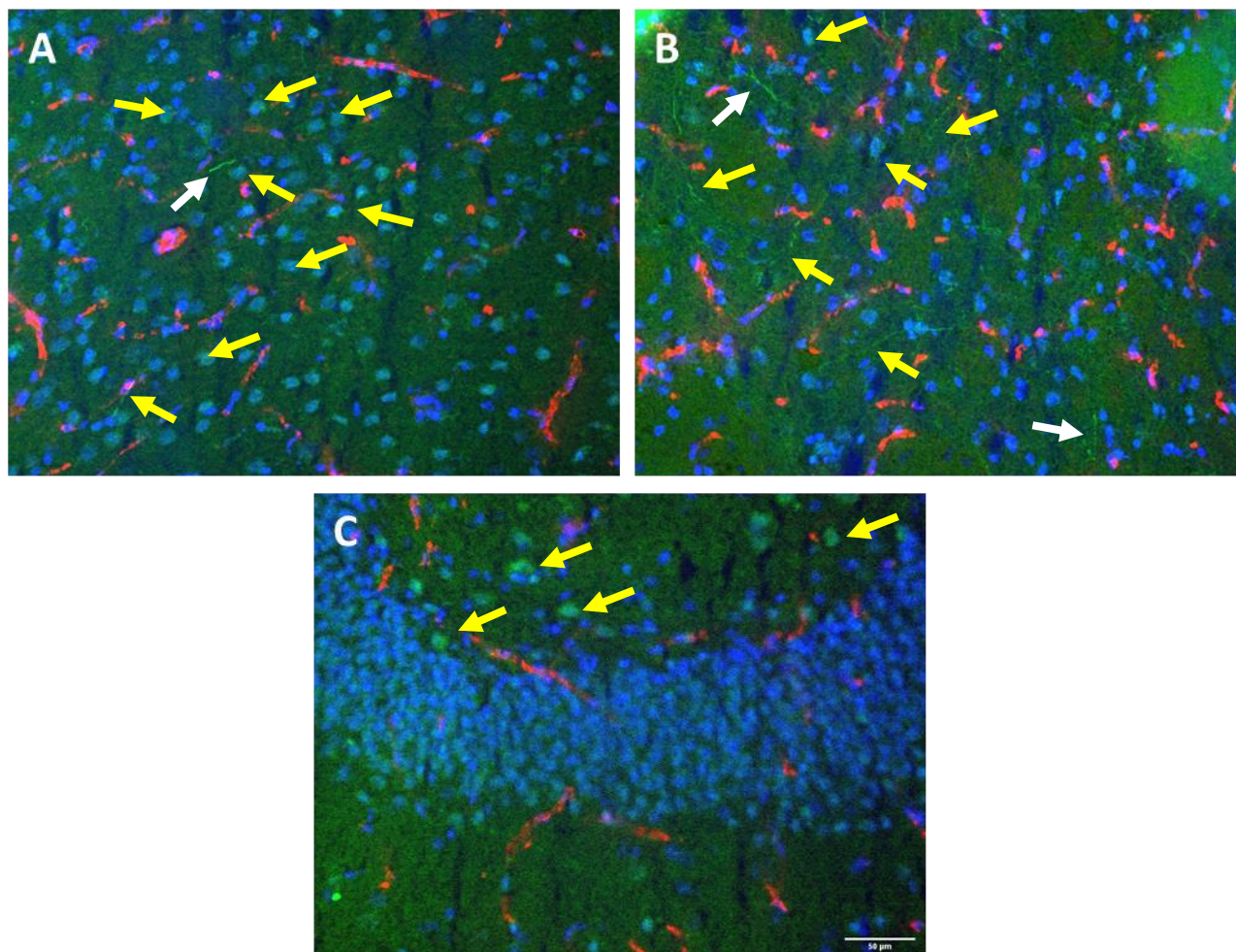


Figure 47 : Double immunomarquage dirigé contre la protéine S100 β et SMI71 dans le cortex (en A), le striatum (en B) et l'hippocampe (en C) de rats contrôles. Les flèches jaunes montrent une colocalisation des fluorescences. L'échelle du panel C est commune à tous les panels.

L'anticorps I^{aire} *Ck* dirigé contre la **protéine GFAP** est incubé à une concentration de 1/500, puis révélé par un anticorps II^{aire} *Gt α Ck 647* à une concentration de 1/500. De plus, un double marquage est réalisé en incubant l'anticorps I^{aire} *Rb* dirigé contre la **claudine 5** à une concentration de 1/500, puis révélé par un anticorps II^{aire} *Gt α Rb Cy3* à une concentration de 1/250 (Figure 48). La GFAP met en évidence la protéine gliale fibrillaire acide des astrocytes. La claudine 5 est l'un des principaux composants constituant les jonctions serrées et met en évidence les vaisseaux sanguins de la BHE.

Le fluorophore 647 nm couplé à l'anticorps secondaire émet un signal lumineux qui n'est pas perceptible par l'œil humain (rouge lointain). Néanmoins, la caméra Hamamatsu Orca est capable de capter ce signal en niveau de gris sur 12bits (soit 4096 niveau de gris). Les niveaux de gris sont ensuite recolorisés en jaune.

Le marquage jaune montre des structures fibrillaires en forme d'étoile qui viennent colocaliser avec la fluorescence rouge. La fluorescence rouge met en évidence des structures fusiformes et tortueuses au même titre que le marquage obtenu avec l'anticorps SMI71. Les fluorescences rouge et

jaune colocalisent au niveau de plusieurs zones du cliché microscopique. La fluorescence jaune ne se confond pas avec la fluorescence rouge mais se positionne autour d'elle. Certains noyaux cellulaires détectés par le DAPI colocalisent avec la fluorescence jaune.

Les coupes ayant subi ce traitement ont fait l'objet d'une acquisition microscopique sous forme de mosaïque qui est reconstruite grâce au programme Python/OpenCV (Annexe 16). L'observation de l'image montre un cône semblable à la forme du faisceau acoustique. Ce cône présente en son sein une augmentation de l'intensité de la fluorescence rouge de la GFAP. De plus, la densité des astrocytes dans le striatum est plus importante que dans les autres régions cérébrales, témoignant de leur activation. Ces astrocytes ont également adopté une morphologie étoilée réactive.

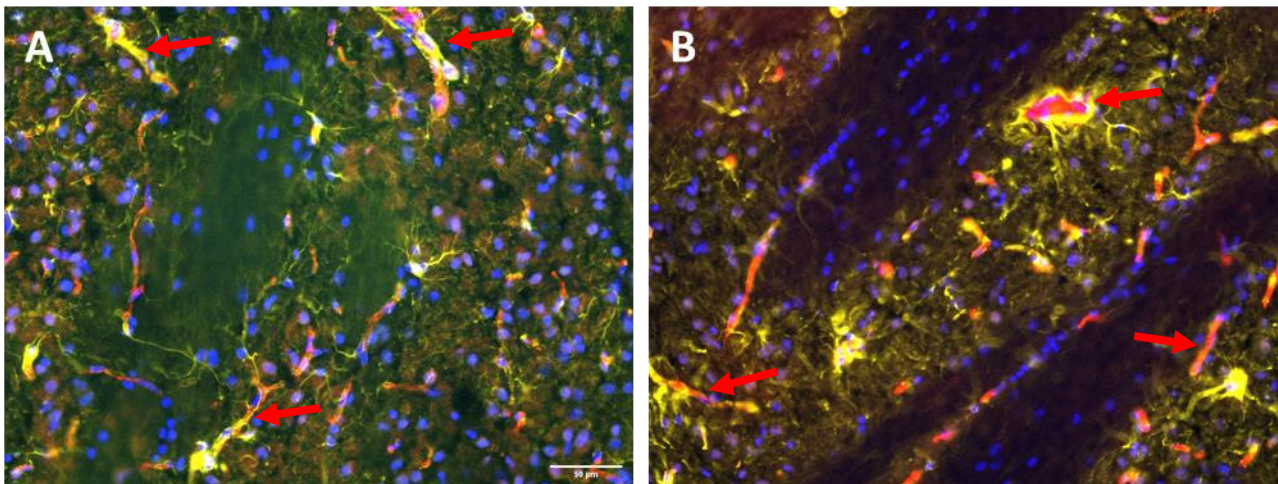


Figure 48 : Double immunomarquage dirigé contre la protéine gliale fibrillaire acide (GFAP) et la claudine 5. Les essais sont réalisés sur le striatum de rats contrôles (en A) et sur le striatum de rats ayant reçu une injection de microbulles suivie d'une exposition aux ultrasons, puis sacrifiés 5 h (en B) après la procédure. Les flèches rouges indiquent la colocalisation de plusieurs fluorescences. L'échelle du panel A est commune aux deux panels.

Le marquage des protéines SMI71 et S100 β a été réalisé en ajoutant un 3^{ème} anticorps dirigé contre la GFAP (Figure 49). Des structures fibrillaires correspondant aux prolongements des astrocytes sont observées sur tous les clichés, à travers la présence d'une fluorescence jaune. De plus, le marquage de la protéine SMI71, mettant en évidence les vaisseaux sanguins, est conforme aux immunomarquages réalisés précédemment (Figure 47). De même, la colocalisation des fluorescences jaune et rouge est observée sur l'ensemble des clichés microscopiques. À l'instar de l'immunomarquage dirigé contre la GFAP et la claudine 5, la fluorescence jaune semble encercler les vaisseaux, au lieu de se confondre avec ceux-ci. Néanmoins, un important bruit de fond de couleur rouge est observé dans le striatum comme en témoigne la teinte rouge présente dans les fibres du striatum (flèches blanches ; Figure 49B, C et D). L'intensité de la fluorescence entre les différents groupes ne varie pas. La fluorescence verte révélant la protéine S100 β constitue principalement du bruit de fond et ne met pas en évidence des structures particulières.

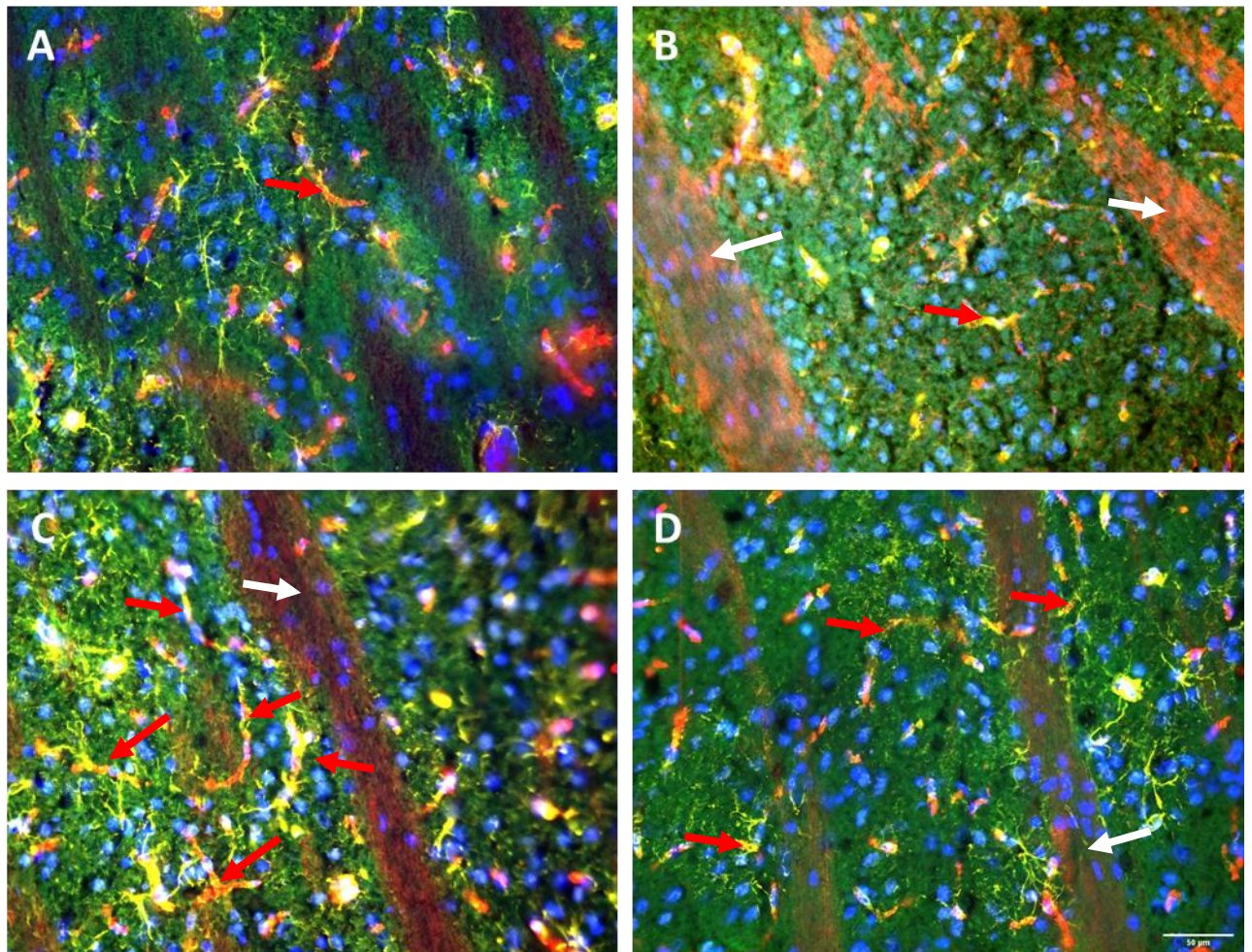


Figure 49 : Triple immunomarquage dirigé contre la protéine gliale fibrillaire acide et contre les protéines SMI71 et SI00 β . Les marquages sont réalisés sur le striatum de rats contrôles, et sur le striatum de rats ayant reçu une injection de microbulles suivie d'une exposition aux ultrasons, puis sacrifiés 3 h (en B), 48 h (en C) et 1 semaine (en D) après la procédure. Les flèches rouges indiquent la colocalisation de plusieurs fluorescences. Les flèches blanches indiquent un immunomarquage non spécifique. L'échelle du panel D est commune à tous les panels.

L'anticorps I^{aire} *Ck* dirigé contre la **protéine GFAP** est incubé à une concentration de 1/500, puis révélé par un anticorps II^{aire} *Gt α Ck 647* à une concentration de 1/500. De plus, un double marquage a été réalisé en incubant, soit l'anticorps I^{aire} *Rb* dirigé contre la **claudine 5** à une concentration de 1/500 ; soit l'anticorps I^{aire} *Rb* dirigé contre la **protéine ZO-1**. Ces deux anticorps sont révélés par un anticorps II^{aire} *Gt α Rb Cy3* à une concentration de 1/250. Le double immunomarquage est observé dans le cortex et dans le striatum sous-jacent (Figure 50). La protéine ZO-1 et la claudine 5 sont les deux principaux composants des jonctions serrées et mettent en évidence les vaisseaux sanguins de la BHE.

La fluorescence rouge présente un très léger bruit de fond, mais révèle de manière très satisfaisante les structures fusiformes et tortueuses que constituent les vaisseaux sanguins. De plus, la fluorescence jaune, mettant en lumière les astrocytes colocalise, avec la fluorescence rouge révélant la claudine 5 (Figure 50A et C) et la protéine ZO-1 (Figure 50B et D). Cette colocalisation est plus importante dans le cortex cérébral. Nous notons également une colocalisation plus intense avec les vaisseaux de taille plus importante dans le cortex (flèches rouges ; Figure 50), aussi bien pour la claudine

5 que pour la protéine ZO-1. À l'inverse, la colocalisation entre les fluorescences rouge et jaune semble plus disparate dans le striatum pour les deux anticorps primaires.

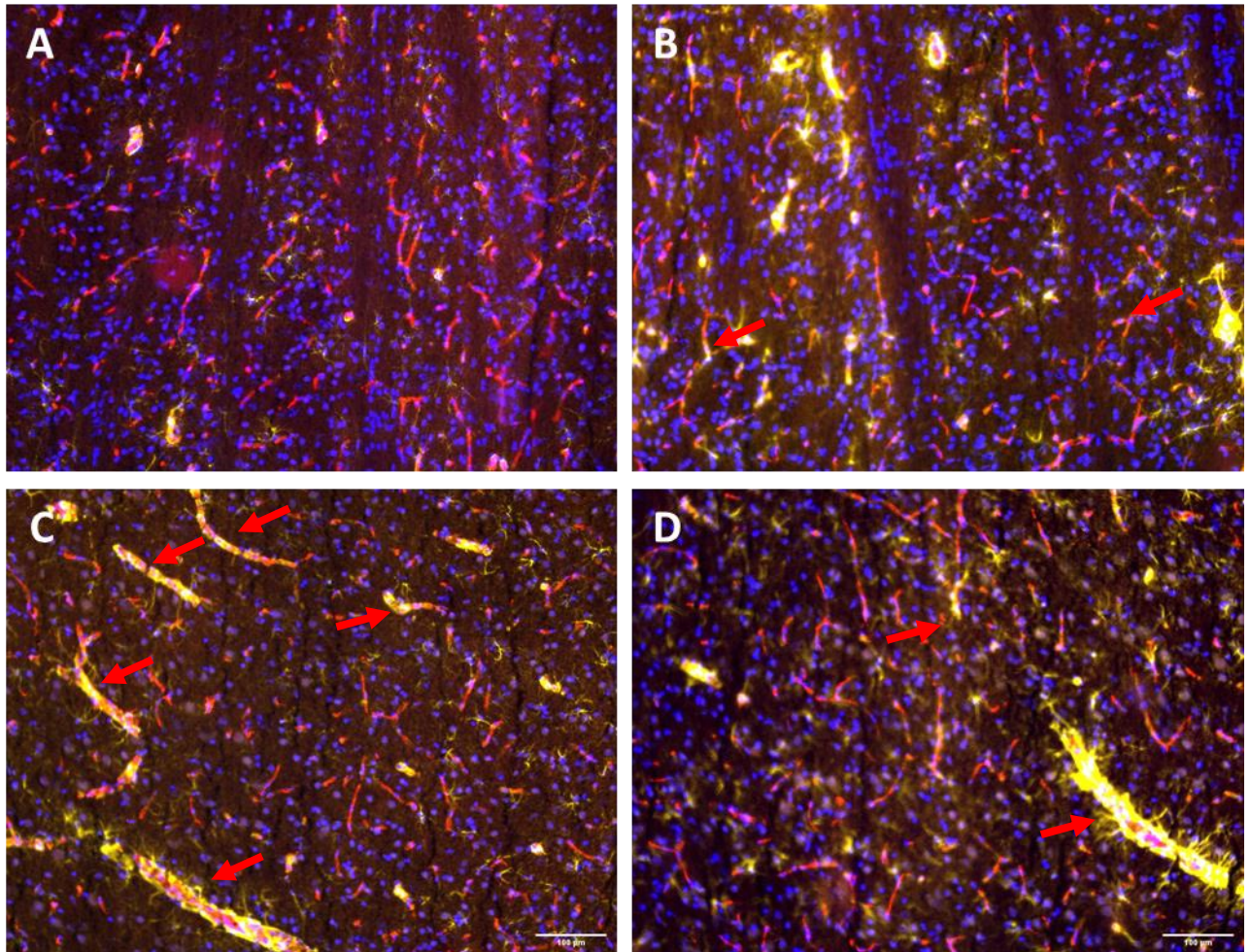


Figure 50 : Double immunomarquage dirigé contre la protéine gliale fibrillaire acide et contre les protéines claudine 5 (en A et C) et ZO-1 (en B et D). Les marquages sont réalisés sur le striatum et le cortex de rats contrôles. Les flèches rouges indiquent la colocalisation de plusieurs fluorescences. L'échelle du panel C est commune avec le panel A. L'échelle du panel D est commune avec le panel B.

(3) Mise en évidence des protéines du stress cellulaire

L'anticorps I^{aire} *Rb* dirigé contre la protéine ***Hypoxia Inducible Factor 1α*** (HIF-1α) est incubé à une concentration de 1/500, puis révélé par un anticorps II^{aire} *Gt α Rb* 488 à une concentration de 1/500. De plus, un second marquage est réalisé en incubant l'anticorps I^{aire} *Ms* dirigé contre **SMI71** à une concentration de 1/500, puis révélé par un anticorps II^{aire} *Gt α Rb* Cy3 à une concentration de 1/250. Le double immunomarquage est observé dans le striatum (Figure 51).

Les observations de l'immunomarquage dans les striata montrent un important bruit de fond et des colocalisations de fluorescence verte avec le noyau cellulaire chez les rats contrôles (flèches rouges ; Figure 51). Ce marquage devient cytoplasmique dans le striatum des rats sacrifiés 3 h après la perméabilisation de la BHE (flèches rouges ; Figure 51B). La présence de marquages non spécifiques est également observée (flèche blanche ; Figure 51C). Un triple immunomarquage est également

réalisé sur une coupe de cerveaux de rats sacrifiés 3 h après la procédure (Figure 51D). Elle montre la colocalisation de la protéine SMI71, de HIF-1 α et du noyau cellulaire.

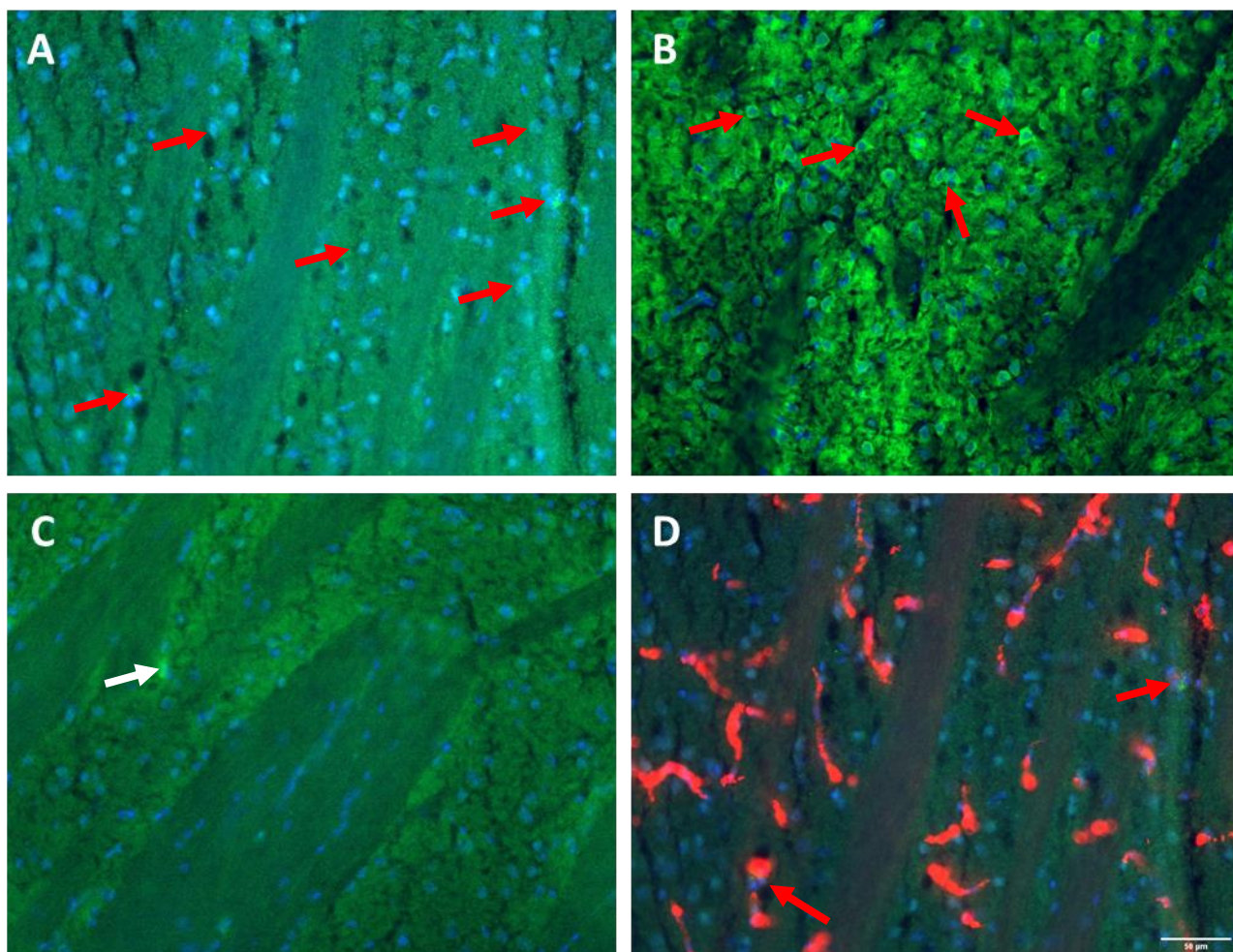


Figure 51 : Double immunomarquage dirigé contre la protéine *Hypoxia Inducible Factor 1 α* (HIF-1 α). Les marquages sont réalisés sur le striatum de rats contrôles, et sur le striatum de rats ayant reçu une injection de microbulles suivie d'une exposition aux ultrasons, puis sacrifiés 3 h (en B), 48 h (en C) après la procédure. Le double immunomarquage est représenté sur le panel D. Les flèches rouges indiquent la colocalisation de plusieurs fluorescences. Les flèches blanches indiquent un immunomarquage non spécifique. L'échelle du panel D est commune à tous les panels.

L'anticorps I^{aire} *Rb* dirigé contre la protéine **CD163** est incubé à une concentration de 1/500, puis révélé par un anticorps II^{aire} *Gt α Rb 488* à une concentration de 1/500 (Figure 52A, B, C et D). L'immunomarquage est observé dans le striatum. Un immunomarquage supplémentaire est réalisé pour mettre en évidence les vaisseaux sanguins par l'intermédiaire de la protéine **SMI71** (Figure 52E et F).

L'observation de la fluorescence montre un bruit de fond modéré et une colocalisation de la fluorescence verte avec les noyaux cellulaires sur l'ensemble des clichés microscopiques. De plus, des structures fibrillaires sont observables (flèches jaunes ; Figure 52A, B et C). Nous notons également une structure importante mise en évidence par la fluorescence bleue du DAPI (flèche blanche ; Figure 52B). Le comarquage avec la fluorescence rouge de l'anticorps SMI71 indique que cette structure est

un vaisseau sanguin. La proximité de certaines structures présentant une double fluorescence verte et bleu est remarquée et est indiquée par des flèches roses sur les clichés (Figure 52E et F).

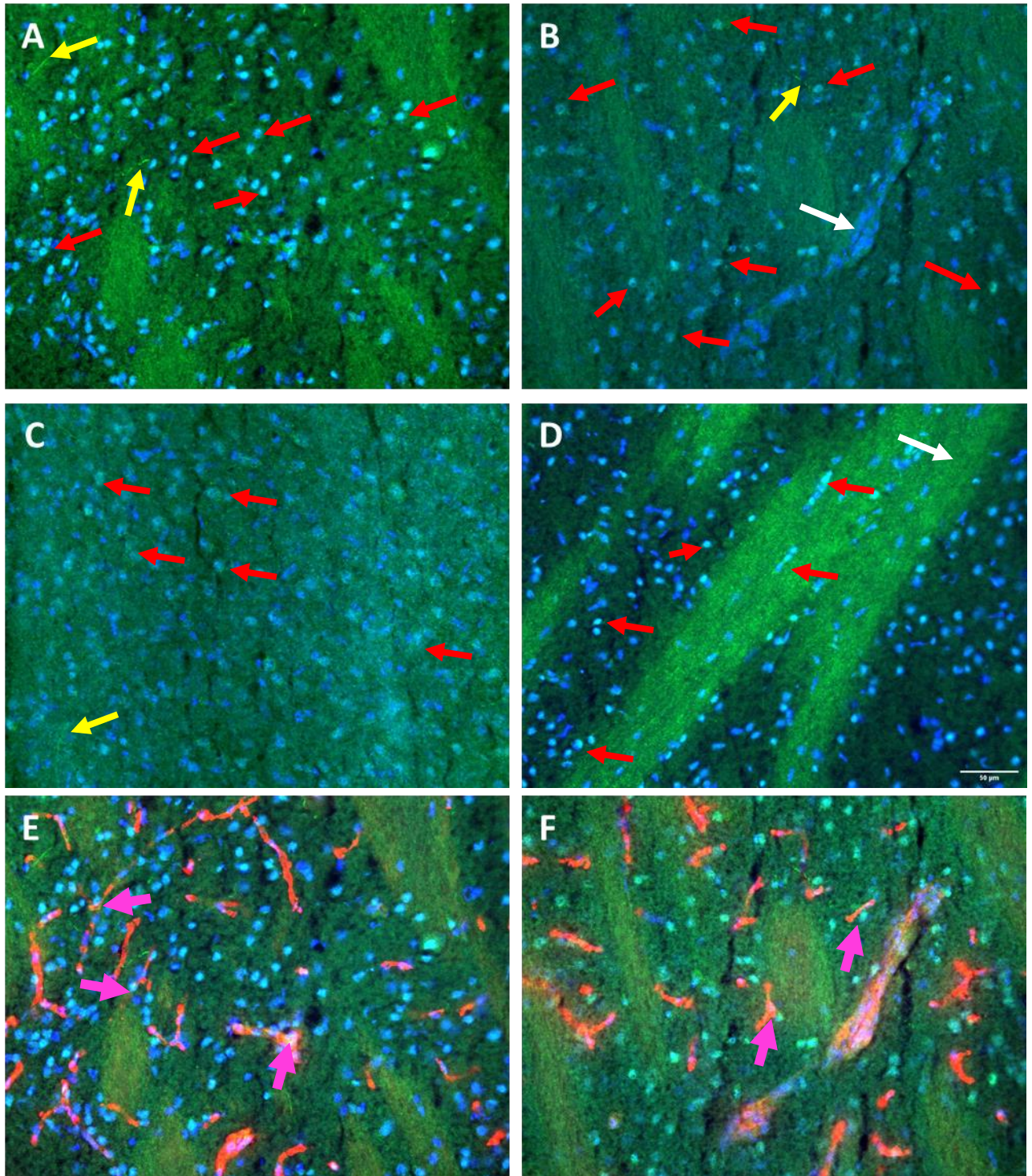


Figure 52 : Immunomarquage dirigé contre la protéine CD163. Les marquages sont réalisés sur les striata de rats contrôles, et sur les striata de rats ayant reçu une injection de microbulles suivie d'une exposition aux ultrasons, puis sacrifiés 3 h (en B), 48 h (en C) et 1 semaine (en D) après la procédure. Un double immunomarquage est également réalisé avec la protéine SMI71 afin de mettre en évidence les vaisseaux sanguins. Les flèches rouges indiquent la colocalisation de plusieurs fluorescences. Les flèches blanches indiquent un immunomarquage non spécifique. Les flèches jaunes indiquent des structures fibrillaires.

Les flèches roses indiquent la proximité de la colocalisation des fluorescences bleu et verte près d'un vaisseau sanguin. L'échelle du panel D est commune à tous les panels.

Les immunomarquages dirigés contre NF κ B et révélés par les anticorps secondaires *Gt α Rb 488* ou *Gt α Rb Cy3* n'ont pas permis d'observer sa présence dans le tissu cérébral. Un important bruit de fond provenant de l'anticorps secondaire a été observé pour le 488 nm (vert) et le Cy3 (rouge).

b) Discussion

Le protocole décrit dans le Matériel et Méthodes (pp. 113) et utilisé pour l'incubation des anticorps fonctionne globalement pour l'ensemble des anticorps utilisés. Aucune révélation à l'aide des anticorps secondaires n'a échoué. Cependant, certains anticorps primaires ont présenté des résultats inattendus.

(1) Description des anticorps

En premier lieu, nous avons voulu mettre en évidence les différentes neurotransmissions présentes dans le striatum. Pour atteindre cet objectif, nous avons utilisé des anticorps I^{aire} dirigés contre les enzymes responsables de la synthèse des neurotransmetteurs et contre leurs transporteurs : citons pour la neurotransmission GABAergique, la **glutamate déshydrogénase** (GAD), les **transporteurs du GABA** (GAT1 et GAT2) ; pour la transmission glutamatergique, l'enzyme **glutamine synthétase** et le **transporteur des acides aminés excitateurs** (EAAT3) ; et pour les neurotransmissions catécholaminergiques, l'enzyme **tyrosine hydroxylase** (TH).

La **GAD** est exprimée dans les neurones et interneurons GABAergiques spécifiques des populations neuronales du striatum. Cette protéine, principalement cytosolique, retire le groupement carboxylique du carbone α du glutamate. La **GS** ou *glutamate-ammonia ligase* est exprimée par les astrocytes et catabolise le glutamate libéré dans la fente synaptique des synapses glutamatergiques. Elle catalyse la réaction ATP-dépendante de ligation d'un groupement amine au glutamate pour donner la glutamine. La GS est principalement cytosolique ou mitochondriale. Nos résultats montrent d'importants agrégats qui ne sont pas situés dans le cytoplasme des cellules, suggérant alors un marquage non spécifique. De plus, plusieurs cellules présentent une colocalisation entre la fluorescence du DAPI et celle de la GS, suggérant qu'elle est nucléaire et non cytosolique. Or la GS est soit mitochondriale, soit cytosolique. Nous pouvons conclure que ce marquage est non spécifique.

Le GABA est transporté par les **transporteurs membranaires du GABA** qui se situent respectivement, à la surface des synapses présynaptiques des interneurons et au niveau des méninges, notamment au niveau de la BHE (Zhou and Danbolt, 2013). Ces transporteurs de type SLC sont dépendants des ions sodiques et chlorures (SLC6A1 et SLC6A13). Le transporteur des acides aminés excitateurs EAAT3 est le transporteur membranaire des acides aminés dicarboxyliques (glutamate et aspartate). C'est un transporteur de type SLC dépendant du sodium (SLC1A1) (Holmseth *et al.*, 2012). Il est exprimé au niveau des somas et des dendrites des neurones. Nos résultats d'immun marquage des transporteurs du GABA et du glutamate ont mis en évidence un important bruit de fond et la présence d'agrégats, suggérant un marquage non spécifique.

Enfin, la **TH** est exprimée par les neurones catécholaminergiques incluant les neurones dopaminergiques, noradrénergiques et adrénérgiques. Ces neurones au sein du SNC sont principalement présents dans la substance noire du mésencéphale ventral et dans les noyaux nerveux du pont cérébral (Kobayashi, 2001). La TH est présente dans le cytoplasme et le réticulum endoplasmique des neurones. Elle catalyse la réaction d'ajout d'un groupement hydroxyle à la tyrosine pour donner la L-3,4-dihydrophénylalanine (L-DOPA). Cette dernière est décarboxylée pour donner la dopamine ; qui est ensuite hydroxylée pour synthétiser la noradrénaline ; et finalement être méthylée pour obtenir l'adrénaline. Dans notre étude, le marquage fluorescent de la TH apparaît comme diffus dans des zones correspondant à des zones décrites comme étant le siège de la neurotransmission dopaminergique. Le marquage TH est spécifique, mais il n'est pas assez fin pour mettre en évidence les neurones entiers.

Nous aurions pu utiliser l'anticorps **NeuN** qui cible spécifiquement tous les types de neurones matures, mais le but de l'utilisation des anticorps spécifiques à une neurotransmission donnée, permet d'identifier clairement les populations neuronales présentes dans une structure cérébrale. Dans ce cas, nous pourrions mettre en œuvre une méthode de quantification, afin de mettre en évidence une perte neuronale par rapport à l'hémisphère controlatéral ou à un contrôle.

Nous avons ensuite mis en évidence les composants de l'unité neurovasculaire, à travers l'utilisation des anticorps spécifiques ciblant les cellules endothéliales, notamment grâce aux protéines des jonctions serrées. Nous avons également ciblé les protéines des astrocytes. Pour ce faire, nous avons utilisé les anticorps I^{aire} dirigés contre les protéines **SMI71**, **ZO-1** et **claudine-5** pour mettre en évidence les cellules endothéliales ; et contre la **GFAP** et la protéine **S100β** pour mettre en évidence les astrocytes.

SMI71 est une protéine spécifique des cellules endothéliales de rat retrouvée au niveau de la BHE. L'anticorps ne réagit pas avec les vaisseaux des organes circumventriculaires (*i.e.*, ne possédant pas de BHE), ou avec les endothéliums fenestrés des tissus périphériques. Les protéines **claudine 5** et **ZO-1** sont les principaux composants des jonctions serrées situées entre les cellules endothéliales de la BHE. Ces protéines ont été décrites dans la partie de l'état de l'art (pp. 6). Elles sont principalement membranaires. Nos résultats montrent que l'immunomarquage des protéines constituant les jonctions serrées présentent des structures fusiformes et tortueuses correspondant vraisemblablement aux vaisseaux sanguins. Cet immunomarquage colocalise avec le signal de la GFAP des astrocytes, et plus particulièrement avec les pieds astrocytaires qui caractérisent la BHE. Ce signal englobe les vaisseaux sanguins sans pour autant se confondre avec l'immunomarquage des cellules endothéliales.

La **GFAP** est la protéine retrouvée dans les astrocytes. Elle met en évidence le cytoplasme et le cytosquelette des astrocytes. En cas d'activation astrocytaire, son expression est augmentée conduisant à une augmentation de l'intensité de la fluorescence. De plus, leur morphologie change et présente un corps cellulaire plus massif, ainsi que des prolongements plus importants (Siracusa *et al.*, 2019). Nous avons mis en évidence l'activation astrocytaire dans le trajet du faisceau acoustique au sein du cerveau des rats sacrifiés 48 h et 1 semaine après la sonoporation. Ces résultats sont en accord avec les données de Kovacs *et al.*, et de McMahon *et al.* En effet, Kovacs *et al.*, ont montré une augmentation de

l'expression de la GFAP 6 h après la sonoporation, et McMahon *et al.*, ont observé une augmentation significative de l'expression de la GFAP, qui était supprimée après l'administration de dexaméthasone (Kovacs *et al.*, 2017; McMahon *et al.*, 2020). À l'inverse, Ji *et al.*, ne montrent pas de surexpression de la protéine GFAP. Nos résultats sont en accord avec la littérature, et rapportent également la présence d'une activation astrocytaire à plus d'une semaine après la sonoporation.

La **protéine S100 β** est essentiellement synthétisée par les astrocytes et est présente dans leur cytoplasme. Elle est impliquée dans la régulation du cytosquelette en interagissant avec la tubuline, les protéines tau et la GFAP. Nos résultats ont montré la présence d'un marquage qui colocalise avec les noyaux cellulaires. Or, la protéine S100 β étant une protéine cytoplasmique en interaction avec le cytosquelette, son immunomarquage devrait être cytosolique. Néanmoins, des structures fibrillaires ont été observées lors d'un double marquage S100 β /SMI71 suggérant un marquage spécifique de la protéine S100 β dans les prolongements astrocytaires. Les résultats portent à croire que l'immunomarquage manque de spécificité.

Enfin, nous avons mis en évidence les protéines impliquées dans la réponse au stress cellulaire grâce aux marqueurs spécifiques du **facteur induit par l'hypoxie** (HIF-1 α) du **récepteur membranaire du complexe hémoglobine/haptoglobine** (CD163) et du **Nuclear Factor kappa B** (NF κ B).

La **sous unité α de la protéine HIF-1** (HIF-1 α) est une protéine cytosolique qui, en condition de normoxie (*i.e.*, apport normal de dioxygène), est marquée puis dégradée par le protéasome (Corcoran and O'Neill, 2016). Lors d'une hypoxie, la sous unité α de la protéine HIF-1 se dimérise avec sa sous-unité β afin d'être transloquée dans le noyau pour se lier au *Hypoxia Responsive Element* (HRE). Le HRE induit alors la transcription de gènes de réponse à l'hypoxie. Il est donc dans le cytoplasme ou dans le protéasome lors de la normoxie, ou nucléaire lors d'une hypoxie. Notre étude histologique révèle des résultats incohérents. En effet, le marquage de la sous-unité HIF-1 α colocalise avec le noyau à 48 h et 1 semaine après la sonoporation, mais également dans les tissus contrôles suggérant l'activation de HIF-1 α *via* son passage dans le noyau. En revanche, à 3 h après la sonoporation, le marquage devient cytoplasmique suggérant son accumulation, son inactivation et sa dégradation par le protéasome.

La protéine **CD163** est un cluster de différenciation qui est impliqué dans la cascade de signalisation du nettoyage du complexe hémoglobine/haptoglobine (Thomsen *et al.*, 2013). Elle est principalement retrouvée dans le cytoplasme et à la surface des macrophages. Elle est impliquée dans l'internalisation de l'hémoglobine afin de protéger le tissu des dommages oxydatifs liés à sa présence. Le récepteur capte et internalise l'hémoglobine qui est alors dirigée vers un lysosome. Lorsque les composants protéiques ont été dégradés, l'hème est libéré pour être dégradé en bilirubine par l'hème oxygénase. Nos résultats montrent une colocalisation des signaux de fluorescence du DAPI et de la protéine CD163 à proximité des vaisseaux sanguins. Ces observations suggèrent la présence de cellules dont le rôle est le nettoyage de l'hémoglobine qui a extravasé après la perméabilisation de la BHE. Alonso *et al.*, ont montré une surexpression de la protéine CD163 à la surface de la microglie, suggérant son rôle dans la dégradation de l'albumine après la sonoporation (Alonso *et al.*, 2011). Notre étude a

mis en évidence la présence de la protéine CD163 mais nous n'avons pas encore identifié le type cellulaire qui l'exprimait.

Le facteur de transcription **NFκB** est considéré comme le chef d'orchestre de l'activation des cellules du système immunitaire (Pereira and Oakley, 2008). Lorsque ses récepteurs sont inactifs, la protéine inhibitrice IκBα retient ce facteur dans le cytoplasme. Dans ce cas, le marquage en condition physiologique est cytoplasmique. À l'inverse, lorsqu'un stimulus inflammatoire active les récepteurs du facteur nucléaire κB, l'inhibiteur IκBα est phosphorylé et ubiquitiné pour être dégradé par le protéasome. Par conséquent, NFκB libre est transporté dans le noyau où il pourra promouvoir ou réprimer la transcription des gènes. Il sera donc nucléaire lors d'une stimulation immunitaire. Notre protocole d'immunomarquage n'a pas permis de mettre en évidence la protéine NFκB. Toutefois, Kovacs *et al.*, ont montré l'apparition d'une neuroinflammation stérile induite par l'activation de la voie NFκB (Kovacs *et al.*, 2017).

(2) Ajustement du protocole

Face à l'important bruit de fond et aux nombreux immunomarquages non spécifiques, le protocole d'immunomarquage par fluorescence a été ajusté.

En effet, en premier lieu nous avons augmenté le temps de fixation des tissus au PFA de 30 minutes à 1 h. Cette fixation chimique des tissus peut masquer et dénaturer les sites antigéniques. Aucune amélioration n'a été constatée avec la prise de ces dispositions (*i.e.*, pas de réduction du bruit de fond, pas d'amélioration de la pénétration et de la fixation des anticorps dans la cellule). De plus, nous avons également ajouté de la glycine à 0,3 M dans le tampon de lavage PBS 0,1 M pH 7,4 afin de bloquer les sites aldéhydes qui n'auraient pas réagi avec le PFA. Grâce à cet ajout, une nette diminution du bruit de fond a été observée sur nos coupes histologiques.

D'après les informations disponibles sur les fiches techniques des fournisseurs, l'ensemble des anticorps utilisés ne nécessitent pas de démasquage des sites antigéniques. Néanmoins, une technique de démasquage enzymatique des sites antigéniques a été entreprise. Cependant, l'action de la trypsine a fortement dégradé les tissus, empêchant la suite du protocole d'immunomarquage. Nous supposons que nos coupes étaient trop fines pour subir ce protocole enzymatique.

Dans un second temps, nous avons ajusté les temps de perméabilisation et de saturation des sites non spécifiques avant l'incubation de l'anticorps primaire. En effet, le marquage des antigènes présents à la surface des cellules a généralement donné des résultats satisfaisants. Cependant, les antigènes présents dans les cellules (*i.e.*, GAD, GS, TH, *etc.*) semblent difficiles à atteindre. Le signal des anticorps secondaires étant présents sous forme de bruit de fond, nous supposons que les anticorps primaires associés ne pénètrent pas dans les cellules, ou bien que le temps d'incubation avec la solution de blocage des sites antigéniques et de perméabilisation ne soit pas suffisamment long. De ce fait, nous avons augmenté de deux heures le temps d'incubation de cette solution, sans pour autant observer une amélioration de la pénétration des anticorps ou une réduction du bruit de fond. Enfin, nous avons remplacé notre agent détergeant, le Triton X-100, par le Tween 20. Malheureusement, cette dernière mesure n'a pas amélioré la liaison des anticorps primaires aux sites antigéniques.

(3) Synthèse

Nous avons mis en évidence deux composants cellulaires de la BHE avec des marqueurs spécifiques des cellules endothéliales et des astrocytes. De plus, le marquage dirigé contre CD163 a mis en évidence la présence de cellules exprimant cette protéine, impliquée dans la détoxification de l'hème ayant extravasé dans le tissu cérébral. Nous avons également détecté une activation astrocytaire qui suivait le trajet du faisceau ultrasonore à partir de 48 h et jusqu'à 1 semaine après la sonoporation, témoignant d'une réponse astrocytaire tardive à la perméabilisation de la BHE. La mise au point du protocole d'immunomarquage des cellules endothéliales et des astrocytes de la BHE permet à terme d'envisager une quantification automatique de la fluorescence. Ce procédé rendrait possible l'évaluation de l'angiogenèse et de l'activation astrocytaire. Cependant, une étude complémentaire doit être entreprise afin de confirmer ces données histologiques.

Beaucoup d'anticorps ont présenté un marquage non spécifique, peut-être à cause de l'incapacité à faire pénétrer l'anticorps dans les cellules cibles. Malgré l'ajustement du protocole, il serait nécessaire d'améliorer la qualité de nos réactifs et d'utiliser un tampon citrate pour ajuster le pH, paramètre non modifié dans notre étude. Afin d'améliorer la reconnaissance et la pénétration des anticorps, nous avons testé une méthode de démasquage enzymatique des sites antigéniques. Cependant, cette méthode s'est soldée par un échec. Cette méthode est donc à parfaire et nécessite de plus amples approfondissements, notamment au niveau de l'ajustement des temps d'incubation.

Partie III

Résultats et discussion

Chapitre 4

Exploration du transcriptome après la perméabilisation de la BHE par sonoporation



III. Résultats et discussion	119
Chapitre 4. Exploration du transcriptome après la perméabilisation de la BHE par sonoporation	167
1. Résultats	167
a) Comparaison entre les groupes 3 h post-sonoporation vs contrôles	170
b) Comparaison entre les groupes 1 semaine post-sonoporation vs contrôles	172
c) Comparaison entre les groupes 3 h post-sonoporation vs 48 h post-sonoporation	174
2. Discussion.....	175
a) Perturbation de l'homéostasie cellulaire et de la réponse immunitaire.....	175
b) Couplage entre le métabolisme énergétique et le choc hypoxique	177
c) Perturbation de la transduction du signal et des voies de signalisation	178
d) Avantages et limites de l'étude	179

Chapitre 4. Exploration du transcriptome après la perméabilisation de la BHE par sonoporation

1. Résultats

Afin de réaliser une analyse transcriptomique des conséquences neurophysiologiques de la perméabilisation de la BHE par sonoporation, nous nous sommes basés sur le modèle d'ouverture de la BHE par sonoporation décrit dans la section précédente (pp. 123 - 129). Les cerveaux de rats sont exposés aux ultrasons en présence de microbulles, puis prélevés 3 h, 48 h et 1 semaine après la sonoporation. Les cerveaux d'un groupe d'animaux contrôles (*i.e.*, sans exposition aux ultrasons) sont également prélevés. Les striata sont disséqués. Les ARN totaux sont extraits du tissu cérébral. La concentration et la qualité de ces extractions sont ensuite évaluées pour le séquençage par *RNAseq*.

Les dosages réalisés avec le Nanodrop® et le Qubit® ont respectivement mesuré une concentration moyenne des échantillons à $199,70 \pm 71,67$ ng/ μ L et à $182,40 \pm 121,48$ ng/ μ L. Le rapport moyen des absorbances à 260 nm et à 280 nm est égal à 2,06 témoignant d'une pureté satisfaisante pour le séquençage des échantillons.

Les analyses non supervisées regroupent les échantillons sans *a priori* dans un même groupe expérimental, s'ils présentent un même profil d'expression génique. Le *clustering* hiérarchique, représenté sous forme d'une *heatmap*, met en évidence l'importante hétérogénéité des profils transcriptomiques au sein même des groupes expérimentaux (Figure 53). Cette hétérogénéité est également retrouvée lors des analyses en composantes principales (Figure 54). En effet, en se basant sur le *score plot* de la PCA (Figure 54A), un changement du profil d'expression génique semble intervenir entre le groupe contrôle et le groupe 3 h post-sonoporation. Cependant, le centre d'inertie des ellipses se superposent, témoignant de la persistance d'une homogénéité du profil génétique entre ces deux groupes. En outre, les 3 échantillons du groupe 3 h post-sonoporation se retrouvent dans le 2^{ème} *cluster*, alors qu'un échantillon du groupe 3 h post-sonoporation se retrouve dans le 3^{ème} *cluster*. Ce 3^{ème} *cluster* contient principalement les échantillons du groupe contrôle. De plus, les échantillons du groupe 48 h post-sonoporation présentent une hétérogénéité des profils d'expression génique beaucoup plus importante que les autres groupes expérimentaux, puisque l'ellipse, formée par les échantillons du groupe 48 h post-sonoporation, englobe les échantillons des groupes contrôle, 3 h et 1 semaine post-sonoporation (Figure 54A, Annexe 3 et Annexe 4). Ce même constat est valable pour les échantillons du groupe 1 semaine post-sonoporation. Néanmoins, le profil d'expression génique des échantillons du groupe 1 semaine présente un profil intermédiaire entre celui des groupes contrôle et 3 h post-sonoporation. La *heatmap* de classification hiérarchique (Figure 53) montre la présence d'échantillons du groupe 48 h et du groupe 1 semaine après la sonoporation dans chacun des clusters établis par *consensus clustering*, appuyant alors la forte hétérogénéité des profils génétiques de ces échantillons.

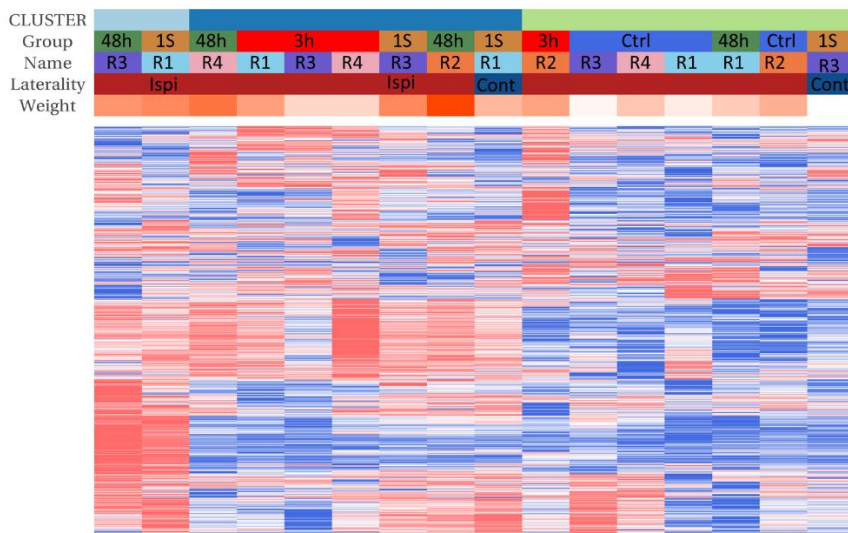


Figure 55 : *Heatmap* de classification hiérarchique des 1 000 gènes les plus variants. Cette classification permet de regrouper en 3 clusters, les échantillons qui présentent un même profil génétique. Les informations des échantillons sont regroupées au dessus de la *heatmap*. Elles décrivent le *cluster*, le groupe expérimental, le numéro du rat, la latéralité, et le poids de l'animal.

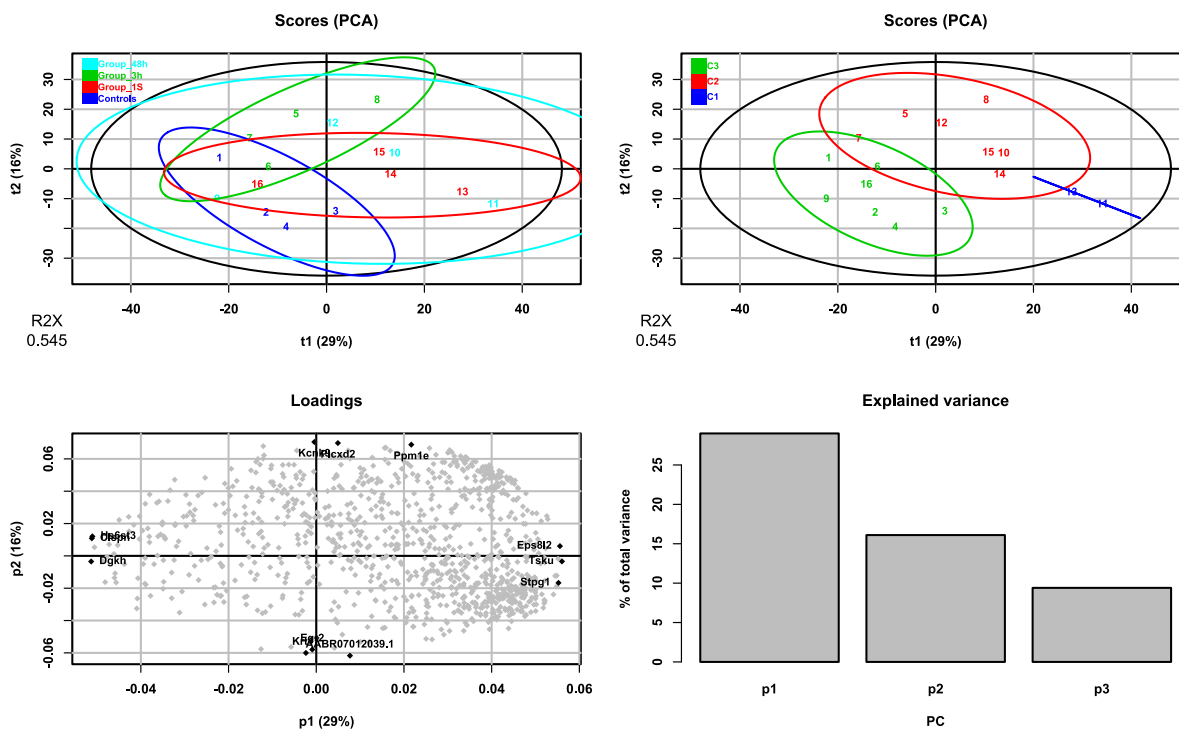


Figure 54 : Analyses en composantes principales des 1 000 gènes les plus variants. Les *score plots* représentent les composantes 1 et 2. En A et B, les ellipses sont tracées en fonction du groupe expérimental et en fonction du *cluster* déterminé précédemment par la classification hiérarchique ; En C, le repère *loadings* représente les variables qui expliquent les composantes principales ; En D, la variance expliquée par les trois premières composantes principales est récapitulée sous forme d'historgramme.

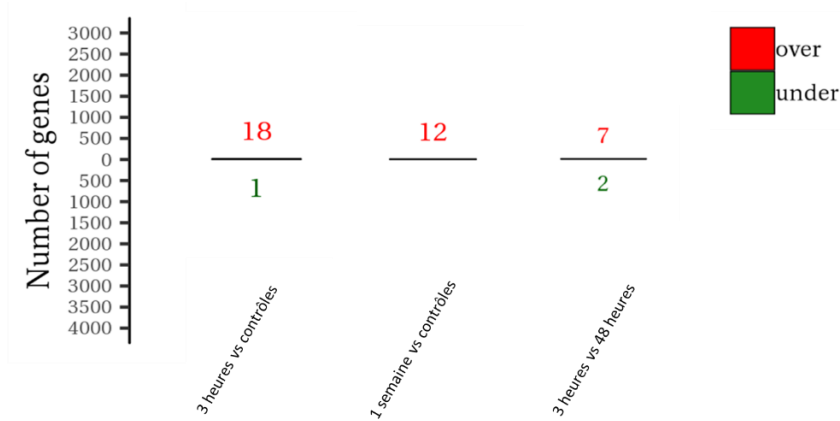


Figure 55 : Récapitulatif des résultats de l'analyse différentielle de l'expression des gènes après la sonoporation. Les gènes surexprimés sont écrits en rouge alors que ceux sous-exprimés sont écrits en vert.

L'analyse de l'expression différentielle des groupes expérimentaux contre le groupe contrôle montre la dérégulation de 19 gènes (18 surexprimés et 1 sous-exprimé dans le groupe 3 h post-sonoporation) (Figure 55). Tandis que 12 gènes sont surexprimés 1 semaine après la sonoporation. De la même manière, l'analyse de l'expression différentielle des gènes entre les groupes expérimentaux 3 h et 48 h après la sonoporation montre la surexpression de 7 gènes et la sous-régulation de 2 gènes entre ces deux groupes. L'ensemble des gènes dérégulés est détaillé sur la Figure 56.

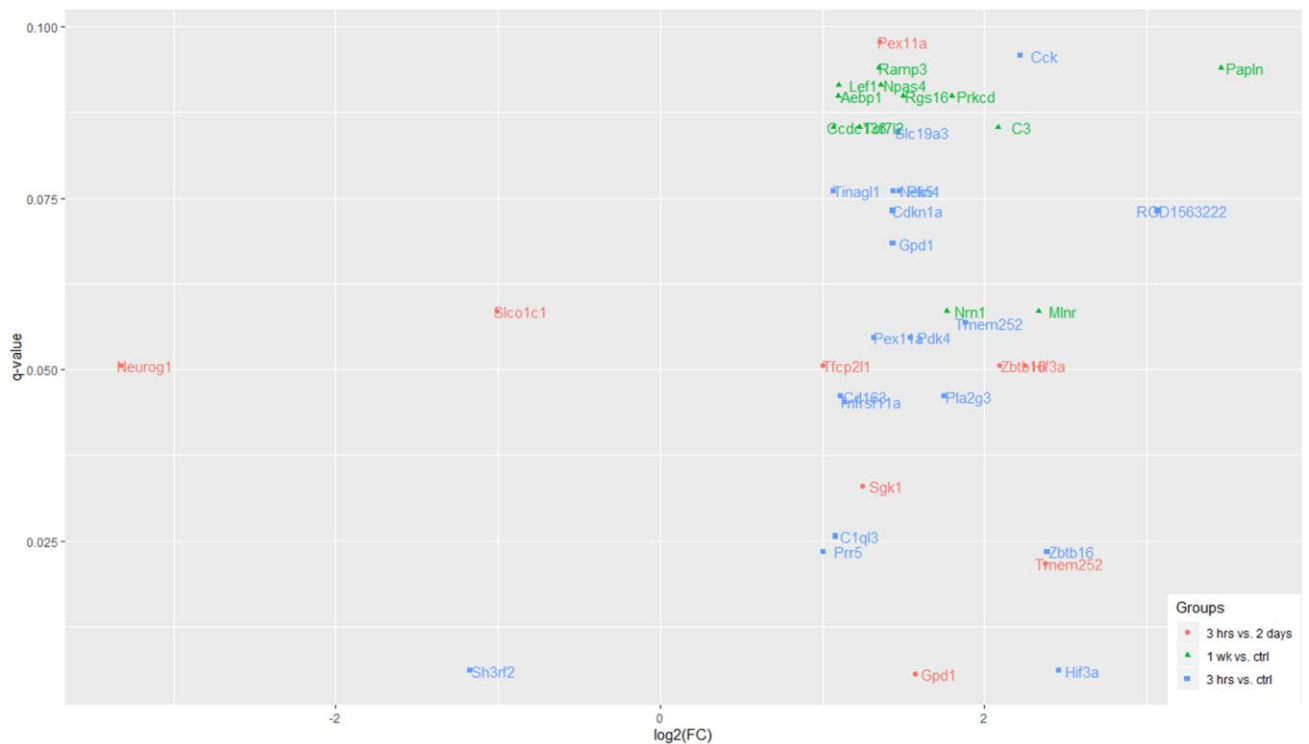


Figure 56 : Détails des gènes dérégulés à 3 h, 48 h, et 1 semaine après la sonoporation en fonction de la q -value et du logarithme base 2 de l'accroissement entre deux groupes. En bleu, les gènes dérégulés entre la condition contrôle et le groupe 3 h après la sonoporation ; en rouge, les gènes dérégulés entre les groupes 3 h et 48 h après la procédure ; en vert sont représentés les gènes dérégulés entre la condition contrôle et le groupe 1 semaine après l'ouverture de la BHE par sonoporation. La q -value est la valeur de significativité corrigée par l'analyse d'expression différentielle. $\log_2(FC)$ est le rapport logarithmique base 2 de l'accroissement du FPKM entre deux conditions (*i.e.*, fold-change).

a) Comparaison entre les groupes 3 h post-sonoporation *vs* contrôles

Le gène codant pour le domaine Sh3 présent dans le complexe GRB2 des protéines adaptatrices des récepteurs à tyrosine kinase (*Sh3rf2*) est sous exprimé à 3 h après la sonoporation. De plus, le gène codant pour une sous-unité de mTORC2 qui régule la **croissance cellulaire** et la **survie** en réponse à un signal hormonal (*Prr5*) est surexprimé. Sa présence dans le complexe mTORC2 lui permet d'avoir une action rayonnante sur plusieurs voies de signalisation. Le gène codant pour la sous-unité $\alpha 3$ du **facteur induit par l'hypoxie** (*Hif3a*), ainsi que le gène codant pour une protéine impliquée dans le transport de soluté (*Slc19a3*), et notamment l'absorption des thiamines (*i.e.*, vitamine B) sont surexprimés 3 h après la sonoporation. Plusieurs gènes impliqués dans l'**immunité** et dans l'**inflammation** sont exprimés différemment 3 h après la sonoporation par rapport au groupe contrôle. En effet, le gène codant pour le **complément** (*C1ql3*) est surexprimé ainsi que les gènes codants : pour un membre de la superfamille des **récepteurs au TNF** (*Tnfrsf11a*) ; pour une protéine appartenant à la famille des **phospholipases A2**, impliquée dans le métabolisme de l'**acide arachidonique** (*Pla2g3*) ; et pour une protéine, membre des *Scavenger receptor cysteine-rich protein domain*, largement présente dans les macrophages et les monocytes, qui est impliquée dans le **nettoyage** et l'**endocytose** des **complexes hémoglobine/haptoglobine** (*Cd163*). En outre, deux gènes intervenant dans les processus de **transport cellulaire** et **membranaire** sont surexprimés : le gène codant pour un facteur intervenant dans la prolifération, la protrusion et l'élongation des **peroxysomes** (*Pex11a*) ; et le gène codant pour une protéine qui n'est pas encore suffisamment documentée (*Tmem252*). Cette protéine serait principalement retrouvée chez les eucaryotes et constitue un composant structural de la membrane plasmique. Trois gènes intervenant dans la régulation du **cycle cellulaire** sont surexprimés dans le groupe 3 h post-sonoporation par rapport au groupe contrôle : le gène codant pour un **inhibiteur des kinases cycline-dépendantes** (*Cdkn1a*) (la protéine ainsi codée se lie aux kinases intervenant dans la régulation du cycle cellulaire et les inhibe) ; le gène codant pour une protéine de la famille des sérine/thréonine kinases, qui est impliquée dans la régulation de l'intégrité et la cohésion du centrosome pendant la mitose (**transition des phases G2/M**) dans les cellules somatiques (*Nek5*) ; et le gène codant pour une protéine nucléaire impliquée dans la progression du **cycle cellulaire**, dans la structure de la chromatine *via* son action sur les histones désacétylase (*Zbtb16*). Deux gènes impliqués dans la **communication neurohormonale** sont surexprimés 3 h après la sonoporation par rapport au groupe contrôle : le gène codant pour une protéine impliquée dans la zonation adrénocorticale et dans le mécanisme de répression de l'expression du **cytochrome CYP11B1** (*Tinagl1*) ; et le gène codant pour le neuropeptide et l'hormone cholécystokinine qui régule la sécrétion pancréatique d'enzymes et la motilité gastro-intestinale (*Cck*). Cette hormone joue également un rôle dans la satiété. Trois gènes intervenant dans la régulation du **métabolisme cellulaire** ont été retrouvés surexprimés dans le groupe 3 h post-sonoporation par rapport au groupe contrôle : (i) le gène *Gpd1* codant pour une protéine de la famille des déshydrogénases du glycérol-3-phosphate (G3P) NAD⁺ dépendante. Son rôle est critique dans le **métabolisme des glucides** et **des lipides** en catalysant la conversion du DHAP et du NADH en G3P et en NAD⁺ ; (ii) le gène *Pdk4* codant pour une protéine qui joue un rôle dans le **métabolisme du glucose** et des **acides gras**, et dans l'**homéostasie** *via* la phosphorylation de la pyruvate déshydrogénase ; et (iii) le gène *Plin4* codant pour une protéine de la famille des périlipines, qui joue un rôle dans le

stockage des acides gras dans les adipocytes. Elle aurait la fonction de protéine manteau impliquée dans la biosynthèse des **gouttelettes lipidiques**.

Sur les 19 gènes identifiés comme significativement dérégulés, l'analyse des voies et des processus biologiques (grâce au package R *ReactomePA*) a permis de créer des réseaux entre seulement 9 d'entre eux. La carte relationnelle d'enrichissement rend compte de l'enrichissement d'un processus biologique par les gènes dérégulés. En effet, l'ensemble des gènes qui se recourent tend à former un regroupement autour d'une fonction biologique. De cette manière, il est facile d'identifier des modules fonctionnels. Le package R *ReactomePA* réalise des analyses statistiques hypergéométriques à partir des gènes, dont la significativité est corrigée par la méthode de Bonferroni.

L'analyse bio-informatique des données transcriptomiques du groupe 3 h après la sonoporation par rapport au groupe contrôle a permis d'associer la réponse hypoxique au processus de neddylation (relations entre les gènes *Hif3A/Zbtb16*) (Figure 57). La neddylation est une **modification post-traductionnelle** semblable à l'ubiquitination des protéines (Rabut and Peter, 2008). Trois gènes sont impliqués dans la régulation du **métabolisme énergétique** et la **synthèse des phospholipides** (*Pdk4*, *Gpd1* et *Pla2g3*). De même, le gène codant pour le récepteur CD163 est associé au nettoyage de l'hème. Enfin, la constellation créée par les gènes *Cdkn1a*, *Prr5* et *Tnfrsf11a* met en évidence l'**activation des voies PI3K/ Akt** et **NFκB** en association avec la **régulation du cycle cellulaire** médiée par **P53**.

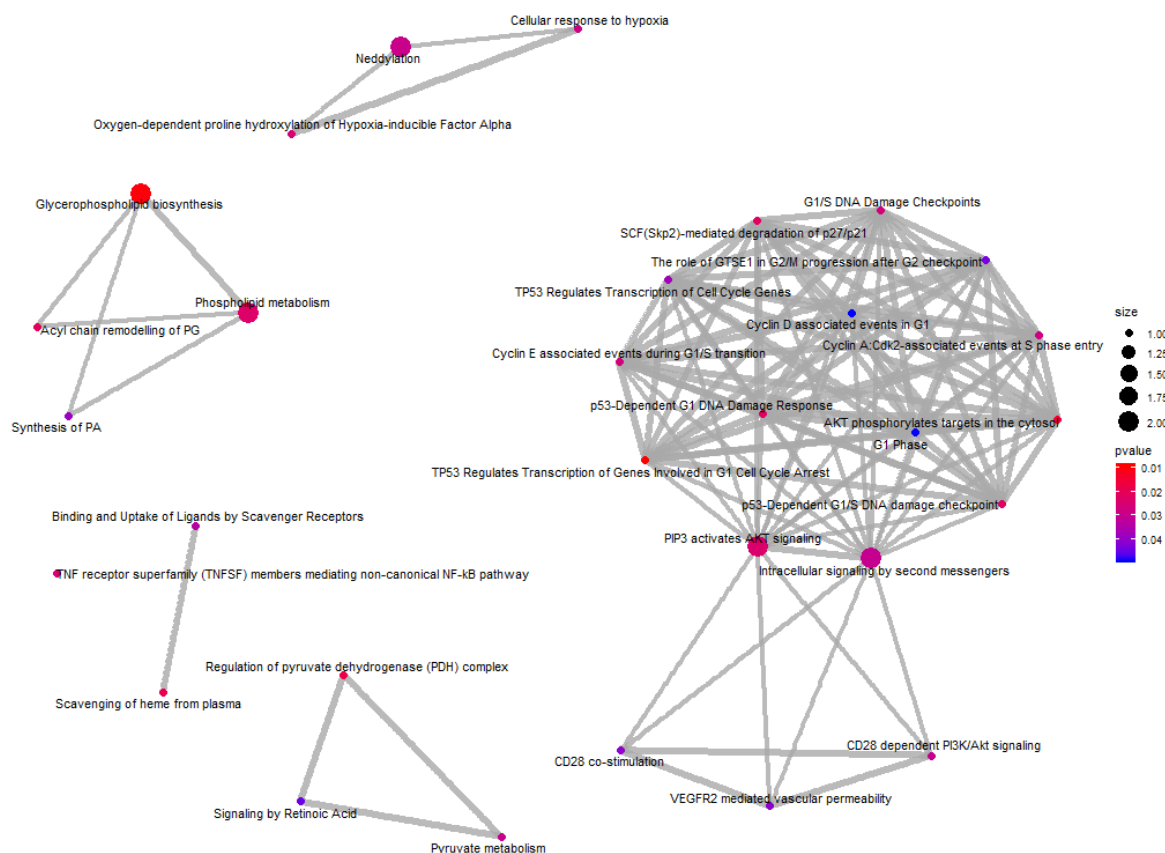


Figure 57 : Réseau relationnel entre les gènes dérégulés entre la condition contrôle et 3 h après la sonoporation. La taille des points correspond au nombre de gènes impliqués dans le processus biologique. La couleur est indexée à la valeur de la *p-value* corrigée.

b) Comparaison entre les groupes 1 semaine post-sonoporation
vs contrôles

Tous les gènes dérégulés entre le groupe contrôle et le groupe 1 semaine post-sonoporation sont surexprimés. En effet, 5 gènes impliqués dans la transduction du signal (*Aebp1*, *Prkcd*, *Ramp3*, *Rgs16*, et *Tcf7l2*) sont surexprimés 1 semaine après la sonoporation. Le gène *Aebp1* serait impliqué dans la régulation de la voie NFκB dans les macrophages, déclenchant une **réponse pro-inflammatoire**. Le gène *Ramp3* code pour le **transporteur intracellulaire** des récepteurs CALCRL et GPER1, qui amène ces protéines vers la membrane plasmique. Le gène *Rgs16* est un régulateur de la cascade de signalisation découlant des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). La protéine inhibe l'activité GTPasique des RCPGs. La protéine codée par le gène *Tcf7l2* est impliquée dans la voie de signalisation *Wnt* et module l'expression de *Myc* en se liant à son promoteur. Enfin, le gène *Prkcd* code une protéine phosphokinase indépendante du calcium (PKCδ). Elle joue un rôle prépondérant dans la **survie cellulaire**, et notamment dans le **processus apoptotique** et dans la **régulation du cycle cellulaire**. Elle aurait également un rôle dans la régulation du métabolisme à travers la modulation de l'activité des oxydases dépendantes du NADPH. De plus, les gènes surexprimés *Npas* et *Nrn1* ont un rôle dans la **plasticité** et la **modulation neuronale**. En effet, *Npas* est le gène qui code pour un facteur de transcription qui régule la balance excitatrice/inhibitrice des circuits neuronaux (*i.e.*, modulation du nombre de synapses et adaptation des potentiels post-synaptiques inhibiteurs et excitateurs). De plus, la protéine codée par *Nrn1* promeut la croissance des neurites. *Lef1* code pour un facteur de transcription impliqué dans la **voie de signalisation Wnt**. La protéine produite serait impliquée dans l'induction transcriptionnelle de la **fibronectine**, et dans la **répression des cadhérines**. *Ccdc136* et *Papln* sont deux gènes responsables du maintien structurel de la membrane plasmique et de la matrice extracellulaire. Le gène *C3* est impliqué dans l'**activation du complément** et a donc un rôle immunitaire. Le gène *Mlnr* code pour le récepteur RCPG de la motiline, qui est une hormone peptidique exprimée au niveau des cellules musculaires lisses dans le tractus gastrointestinal.

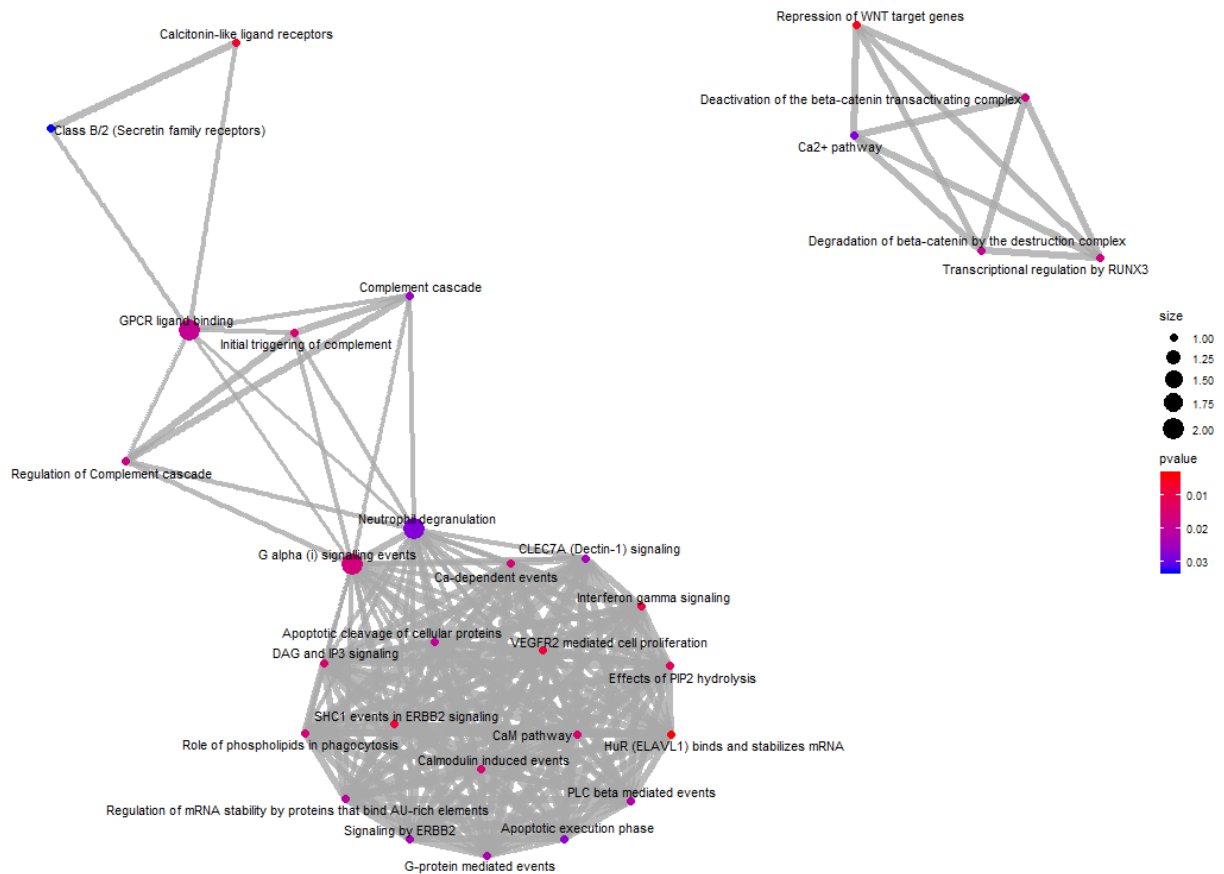


Figure 58 : Réseau relationnel entre les gènes dérégulés 1 semaine après la sonoporation par rapport à la condition contrôle. La taille des points correspond au nombre de gènes impliqués dans le processus biologique. La couleur est indexée à la valeur de la *p-value*.

Sur les 12 gènes identifiés comme significativement dérégulés, l'analyse des voies et des processus biologiques a permis de créer des réseaux entre seulement 5 d'entre eux (Figure 58). L'association entre les gènes *C3* et *Prkcd* met en évidence un *cluster* incluant l'**apoptose**, la **survie cellulaire**, la **transduction du signal**, et l'**endocytose**. Tous ces processus semblent être reliés à l'**immunité** à travers les mécanismes associées aux récepteurs RCPG. En effet, le gène *C3* est impliqué dans l'**activation** et la **modulation** du **complément**. De plus, l'association entre *C3* et *Ramp3* lie l'immunité à la **régulation** des **hormones peptidiques**. Enfin, un réseau associe les gènes *Lef1* et *Tcf7l2* impliqués dans la voie de **signalisation Wnt**, dans l'**adhérence cellulaire** (grâce aux cadhérines et aux caténines), et dans la **signalisation calcique**.

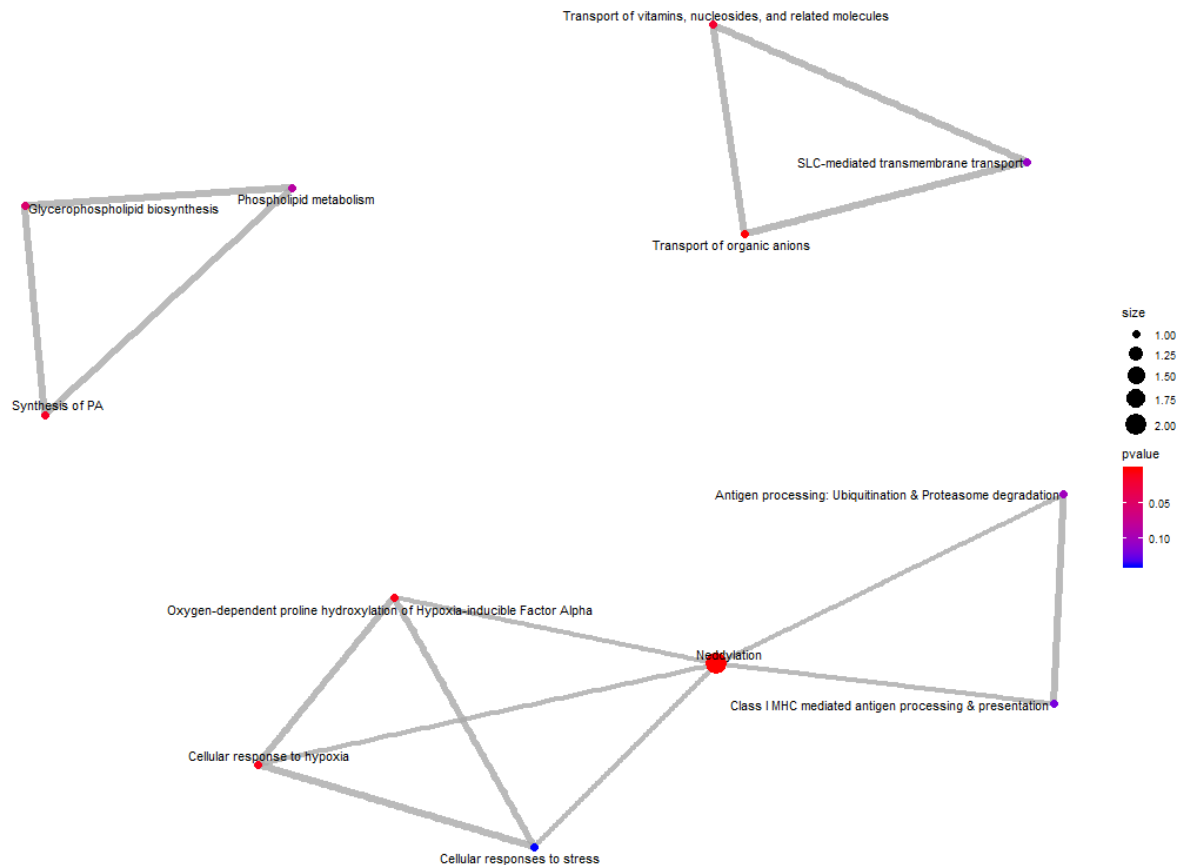


Figure 59 : Réseau relationnel des gènes dérégulés entre 3 h et 48 h après la sonoporation. La taille des points correspond au nombre de gènes impliqués dans le processus biologique. La couleur est indexée à la valeur de la *p-value*.

c) Comparaison entre les groupes 3 h post-sonoporation *vs* 48 h post-sonoporation

Deux gènes sont sous-exprimés entre les groupes 3 h et 48 h post-sonoporation (*Slco1c1* et *Neurog1*). *Neurog1* code pour un facteur de transcription, qui se lie aux *E-box* qui sont des courtes séquences d'ADN autorisant la liaison des protéines régulatrices de la transcription à l'ADN. Le gène *Slco1c1* codant pour le **transporteur de haute affinité des anions organiques** indépendant du sodium comme les hormones thyroïdiennes (thyroxine ou triiodothyronine) est surexprimé. De plus, à l'instar de la perturbation 3 h après la sonoporation, l'expression des gènes *Hif3a* et *Zbtb16* est de nouveau dérégulée. Ces gènes sont impliqués dans la réponse au stress oxydatif et dans la régulation de la transcription. Le **métabolisme énergétique** est perturbé à travers la dérégulation de l'expression du gène *Gpd1*. De plus, *Pex11a* est surexprimé et régule la formation et le maintien du peroxysoxe. Le peroxysoxe est responsable de la métabolisation des acides gras et des acides aminés, ainsi que de la réduction des espèces réactives de l'oxygène. Le gène *Sgk1* est une sérine/thréonine kinase qui est impliquée dans la régulation des **canaux ioniques**, des **transporteurs membranaires**, des **enzymes**, des **facteurs de transcription**; dans l'**excitabilité neuronale**, dans la **croissance cellulaire**, dans la **prolifération**, dans la **survie**, dans la **migration** et dans l'**apoptose**. Le facteur de transcription codé par le gène *Tfcp2l1*, est impliqué dans la suppression de l'activité transcriptionnelle de UBP1.

Sur les 7 gènes identifiés comme significativement dérégulés, l'analyse des voies et des processus biologiques a permis de créer des réseaux entre 4 d'entre eux. L'analyse relationnelle des gènes et de leur implication biologique parvient à identifier 3 processus biologiques. Le premier correspond au gène *Gpd1* qui est associé à la **synthèse des glycérophospholipides**. Le deuxième est associé au gène *Slco1c1* dont la protéine codée est chargée du **transport des anions organiques**. Le troisième constitué des gènes *Hif3a* et *Zbtb16* forme un module avec la réponse au **stress cellulaire hypoxique** et le **mécanisme post traductionnel de neddylation**.

2. Discussion

Notre approche de transcriptomique à travers le séquençage du transcriptome par *RNAseq*, a consisté à évaluer les variations de l'expression des gènes dans les striata ipsilatéraux des groupes 3 h, 48 h et 1 semaine après la sonoporation en comparaison avec les striata d'un groupe contrôle (*i.e.*, n'ayant pas été exposés aux ultrasons). Quatre études de référence ont caractérisé les variations de l'expression des gènes associés à l'inflammation et à sa résolution, à l'angiogenèse, au transport cellulaire, au stress oxydatif, à l'intégrité des jonctions serrées, et à l'endocytose. (Kovacs *et al.*, 2017; McMahon and Hynynen, 2017; McMahon *et al.*, 2017; Ji *et al.*, 2021). Kovacs *et al.*, ont étudié l'expression des gènes et des protéines à l'aide des techniques de biologie moléculaire (Western Blot, qRT-PCR, ELISA). McMahon *et al.*, ont caractérisé la transcription de ces gènes au sein des cellules endothéliales de la BHE à l'aide d'une technique de *microarray*. Ils ont également réalisé une étude par qRT-PCR en comparant 3 protocoles ultrasonores. Ji *et al.*, ont caractérisé la réponse génique de la sonoporation en corrélant l'expression des gènes avec un indicateur de sévérité de la perméabilisation de la BHE. Les résultats de toutes ces études sont détaillés précédemment dans l'état de l'art (pp. 61 - 68).

a) Perturbation de l'homéostasie cellulaire et de la réponse immunitaire

L'analyse du réseau relationnel produit à partir des gènes dérégulés 3 h après la sonoporation a mis en relief un processus biologique incluant la **régulation du cycle de cellulaire** associée aux voies de **signalisation PI3K/Akt et mTORC** (*Cdkn1a*, *Prr5*, *Tnfrsf11a*). On peut noter la surexpression de *Nek5*, qui code pour une protéine sérine/thréonine kinase impliquée dans la **régulation et la cohésion du centrosome** pendant la mitose (**transition de la phase G2 à M**), appuyant l'implication de la régulation du cycle cellulaire après la sonoporation (Ferezin *et al.*, 2021). De plus, cette régulation semble mobiliser la **protéine P53** responsable de l'intégrité de la cellule. La protéine AKT, ainsi que sa protéine sous-jacente GSK3, ont été décrites comme phosphorylées au sein des neurones présents dans la zone insonifiée (Jalali *et al.*, 2010), suggérant alors l'activation de la voie PI3K/Akt.

Nos résultats montrent également la surexpression d'un récepteur du TNF, suggérant l'**implication la voie NFκB**. La voie PI3K/Akt est susceptible d'être activée par les récepteurs TNF (Al-Lamki and Mayadas, 2015). Ces résultats sont conformes aux données de McMahon *et al.*, et Kovacs *et al.*, qui ont décrit la surexpression de la cytokine TNFα et de ses récepteurs après la sonoporation (*Tnfrsf1b*) (McMahon *et al.*, 2017).

Nos résultats montrent que le gène *Aebp1* est surexprimé 1 semaine après la sonoporation. Ce gène est responsable de l'**activation des macrophages via la voie NFκB** (Majdalawieh and Ro, 2010). Ce résultat est supporté par les travaux de Kovacs *et al.*, qui ont montré l'apparition d'une **neuroinflammation stérile**, médiée par l'**activation de la voie NFκB** et de la **voie de signalisation Akt**, identifiées *via* la surexpression de la protéine HSP70, des cytokines IL-1α, IL-18 et TNFα (Kovacs *et al.*, 2017). Ces changements durent jusqu'à 24 h après la procédure.

Nos résultats de séquençage du transcriptome montrent une surexpression, 3 h après la sonoporation, du gène codant pour la protéine CD163. Notre étude histologique a montré l'expression de cette protéine dans les striata des rats ayant subi la sonoporation. Une étude histologique a déterminé que cette protéine était exprimée par la microglie, et était chargée de **nettoyer le complexe hémoglobine/haptoglobine** après la perméabilisation de la BHE par sonoporation (Alonso *et al.*, 2011). Ces résultats suggèrent que, malgré l'élaboration et l'utilisation d'un protocole acoustique sûr, des érythrocytes pourraient extravasés dans le tissu nerveux, et donc être catabolisés par les cellules gliales.

De plus, le séquençage des ARN totaux met en évidence la surexpression du gène *C3*, impliqué dans l'**activation de la voie alternative du complément** 1 semaine après la procédure. Cette observation est corroborée par les travaux de Kovacs *et al.*, et McMahon *et al.* (Kovacs *et al.*, 2017; McMahon *et al.*, 2017) qui ont, eux aussi, observé la surexpression du gène *C3*. Le système du complément est un ensemble d'enzymes qui participe à la défense de l'organisme contre les pathogènes (Mathern and Heeger, 2015). Il fait le lien entre immunité innée et acquise. La protéine *C3* engendre la production des anticorps et donc participe à la mémoire immune. Le système enzymatique du complément permet la lyse des cellules exogènes, ainsi que l'**élimination des couples anticorps/antigènes et des cellules apoptotiques**. Le système du complément a deux modes d'activation : (i) le mode classique *via* *C1* ; et (ii) le mode alternatif *via* *C3*. L'activation de la voie alternative intervient lorsque les composants en surface des cellules pathogènes sont reconnus (endotoxines, immunoglobulines). Les deux voies d'activation convergent vers une voie finale commune. La convertase *C3* clive *C3* en *C3a* et *C3b*. Le clivage de *C3* abouti à la formation du complexe d'attaque de la membrane. C'est l'effecteur cytotoxique du système du complément, qui lyse les cellules pathogènes. *C3a* provoquent la dégranulation des mastocytes qui induit une augmentation de la perméabilité vasculaire et une contraction musculaire lisse. McDannold *et al.*, ont montré la présence de corps apoptotiques couplée à l'extravasation d'érythrocytes pour des pressions acoustiques de 0,7, 0,8 et 1 MPa. L'activation du système du complément pourrait être corrélée avec le nettoyage des cellules en apoptose au sein du tissu sonopéré.

Nos résultats ont également montré la dérégulation des gènes *Papln* et *Ccdc136* impliqués dans l'intégrité structurelle de la membrane plasmique (Kramerova *et al.*, 2000; Apte, 2009). Des travaux ont montré la perturbation des membranes plasmiques lors de la sonoporation, montrant la formation de pores membranaires et la translocation membranaire de la phosphatidylsérine (Meijering *et al.*, 2009; Escoffre *et al.*, 2017; Jia *et al.*, 2021).

L'ensemble de ces résultats montrent une perturbation de l'homéostasie cellulaire (régulation du cycle cellulaire, nettoyage de l'hémoglobine, élimination des cellules apoptotiques, perturbation de la

membrane plasmique), ainsi que l'activation de système immunitaire en réponse à un dommage non pathogénique.

b) Couplage entre le métabolisme énergétique et le choc hypoxique

Nos résultats révèlent la surexpression des gènes *Hif3a*, *Zbtb16*, *Pla2g3*, et *Pex11a* qui sont impliqués dans la réponse au **stress hypoxique et oxydatif** et dans la **formation du peroxyosome** pour la dégradation des radicaux libres de l'oxygène (Okumoto *et al.*, 2020). McMahon *et al.*, ont montré la surexpression de l'enzyme SOD2 responsable de la réduction des radicaux libres de l'oxygène dans la mitochondrie et dans le peroxyosome (McMahon *et al.*, 2017). Cette enzyme est impliquée dans la réponse au stress oxydatif. À l'inverse, Kovacs *et al.*, n'ont pas identifié de perturbation au niveau de la réponse au choc hypoxique.

De plus, une perturbation des gènes liés au **métabolisme énergétique cellulaire** est observée (*Gpd1*, *Pdk4*, *Pla2g3*, et *Slc19a3*). Malheureusement, Kovacs *et al.*, McMahon *et al.*, et Ji *et al.*, ont principalement ciblé leurs études sur les médiateurs et les effecteurs de l'inflammation. Ils n'ont pas étudié les gènes et les protéines associés au métabolisme cellulaire. Néanmoins, McMahon *et al.*, ont montré la **sous-régulation des transporteurs des acides monocarboxyliques** (MCT) dont le principal représentant est l'acide lactique (ou lactate). Les cellules endothéliales utilisent principalement le lactate comme substrat énergétique (Eelen *et al.*, 2018), suggérant la diminution de sa sortie cellulaire *via* son transporteur. De plus, le transporteur des thiamines SLC19A3 est surexprimé suggérant la nécessité d'un apport plus important de **thiamine pyrophosphate**, qui est le **cofacteur nécessaire à de nombreuses réactions métaboliques** au sein des voies de la glycolyse, de la décarboxylation oxydative, du cycle des acides tricarboxyliques et des pentoses phosphates. De plus, les gènes codant pour la kinase de la pyruvate déshydrogénase (PDK4) et pour l'enzyme glycérol-3-phosphate déshydrogénase (GPD1) sont surexprimées 3 h après la sonoporation, suggérant une **modulation du flux du métabolisme énergétique** et un rôle dans la **synthèse des acides gras**. En effet, la PDK4 freine le flux du métabolisme énergétique en inhibant la pyruvate déshydrogénase (PDH). Par conséquent, le pyruvate n'est pas oxydé en acétyl-CoA empêchant alors son entrée dans le cycle de Krebs ou dans la β -oxydation des acides gras (Zhang *et al.*, 2014). Dans ce cas, le pyruvate est transformé en lactate, qui sera utilisé par les cellules l'utilisant comme source d'énergie (Rabinowitz and Enerbäck, 2020). De plus, le glycérol-3-phosphate est impliqué dans un système de navette, qui permet de transférer les électrons du NAD⁺ vers la mitochondrie, en les échangeant avec le cofacteur FADH₂ de la chaîne respiratoire (Houstěk *et al.*, 1975). Elle constitue, avec la navette aspartate/malate, un des systèmes de transport d'électrons mitochondriaux pour la synthèse d'ATP. Tous ces éléments suggèrent un glissement du métabolisme énergétique vers un métabolisme énergétique économique, dans la mesure où les cellules utilisant le lactate comme source d'énergie (*i.e.*, neurones et cellules endothéliales) tendent à le synthétiser et à le stocker (*i.e.*, en freinant la conversion du pyruvate en acétyl-CoA ; et en diminuant sa sortie cellulaire *via* la sous-expression de son transporteur).

Enfin, la phospholipase A2, codée par *Pla2g3*, est impliquée dans le **métabolisme des acides gras**, et notamment dans la transformation de l'acide arachidonique en prostaglandine E₂ (Sato *et al.*, 2008;

Taketomi *et al.*, 2013). Cette prostaglandine est responsable d'**effets vasomoteurs** et de la **modulation immunologique** en tant que **médiateur de l'inflammation** (Martínez-Colón and Moore, 2018). En effet, la PGE₂ stimule la synthèse de la cytokine IL-1 β en stimulant la voie NF κ B. Elle semblerait donc faire le lien entre l'implication du système immunitaire et le métabolisme cellulaire.

En comparant les échantillons des groupes 3 h et 48 h après la sonoporation, l'analyse du réseau relationnel suggère que la **réponse au choc hypoxique** couplée à la **régulation du métabolisme énergétique** (*Hif3a*, *Gpd1*, *Pex11a*, *Zbtb16*) est toujours présente 48 h après la sonoporation. Les études de référence ont montré les effets biologiques jusqu'à 24 h après la sonoporation limitant, de ce fait, l'exploration des effets au long terme et l'identification des processus biologiques réactionnels tardifs.

Ces résultats mettent en lumière une perturbation qui associe l'adaptation du métabolisme énergétique cellulaire avec la réponse au stress hypoxique et/ou oxydatif lors de la perméabilisation de la BHE par sonoporation. De plus, cette perturbation semble perdurer jusqu'à 48 h après la procédure.

c) Perturbation de la transduction du signal et des voies de signalisation

Nos résultats ont montré une importante perturbation de la transduction du signal. En effet, 6 gènes impliqués dans la régulation des récepteurs RCPG sont dérégulés 1 semaine après la procédure (*Prkcd*, *Ramp3*, *Rgs16*, *Tcf7l2*, et *Mlnr*). Également, le gène codant pour la protéine sérine/thréonine kinase SGK1 est surexprimé et intervient dans bon nombre de processus biologiques en réponse à un stress cellulaire (régulation des canaux ionique, excitabilité neuronale et survie cellulaire) (Chen *et al.*, 2009; Won *et al.*, 2009).

Les résultats de notre étude ont montré la dérégulation de deux facteurs de transcription (surexpression de *Tfcp2l1* et sous-expression de *Neurog1*), respectivement impliqués dans les **voies de signalisation Wnt/ β -caténine et Notch** ; et dans l'**initiation de la neurogénèse** (Aguado-Llera *et al.*, 2010). Les voies de signalisation Wnt et Notch sont des voies de transduction du signal qui interviennent dans de nombreux mécanismes biologiques au cours du développement et pendant la vie adulte. Elles sont notamment impliquées dans le **développement de la vascularisation** (Reis and Liebner, 2013; Ho *et al.*, 2020). McMahan *et al.*, ont décrit une sur-représentation des processus biologiques relatifs à la régulation positive du développement vasculaire et de l'angiogénèse.

De plus, le gène *Lef1* est surexprimé 1 semaine après la sonoporation. La protéine codée par ce gène est impliquée dans l'**agrégation cellulaire** et participe à la **voie de signalisation Wnt** (Jesse *et al.*, 2010). Elle est également impliquée dans la **signalisation calcique**. Nos résultats montrent sa dérégulation 1 semaine après la sonoporation, associée à la surexpression du gène *Tcf7l2* qui régule le fonctionnement de la PKC δ . Un certain nombre d'études a exploré les effets *in vitro* de la sonoporation sur l'homéostasie du calcium dans la cellule. Ces études ont montré une augmentation transitoire de la concentration des ions calciques dans la cellule dans les secondes suivant la sonoporation (Park *et al.*, 2010; Liao *et al.*, 2020). De plus, Liao *et al.*, décrivent l'implication de la PKC δ dans les processus biologiques liés à l'afflux de calcium dans la cellule. Nos résultats confirment donc partiellement

l'implication du calcium. En effet, les gènes dérégulés supportent l'hypothèse de l'implication du calcium, mais la survenue de la dérégulation ne coïncide pas avec les délais observés dans les études précédemment citées. Ces résultats nécessitent donc de plus amples investigations.

Enfin, nos résultats relèvent la surexpression des gènes *Npas1*, *Nrn1*, respectivement impliqués dans la **plasticité synaptique** et la **modulation neuronale** ; et du gène *C1ql3* exprimé dans les structures cérébrales et dans les sous-ensembles neuronaux excitateurs. La protéine codée par le gène *C1ql3* est une protéine neuronale soluble qui se lie au récepteur d'adhérence BAI3. Elle contrôle la **formation** et l'**entretien des synapses excitatrices** (Martinelli *et al.*, 2016). Todd *et al.*, ont indirectement évalué par imagerie BOLD et par la mesure du flux sanguin cérébral, la réponse neurovasculaire en réponse à un stimuli sensoriel dans le cortex somatosensoriel, avant et après sa sonoporation (Todd *et al.*, 2019). Les résultats de cette étude montrent une **atténuation de la réponse neurovasculaire** à travers la diminution de l'amplitude et de la durée du signal BOLD, ainsi que du flux sanguin cérébral. Ces résultats témoignent alors d'une altération des processus neuronaux et endothéliaux après la sonoporation. De ce fait, cette altération suggère l'intervention d'une activité de **régulation de la formation et de l'entretien des synapses**. Nos résultats supportent cette hypothèse.

La perméabilisation de la BHE du striatum par sonoporation implique la déstabilisation de nombreuses voies de signalisation intracellulaires. De plus, l'homéostasie neuronale semble impactée, notamment au niveau de la plasticité et de l'entretien synaptique.

d) Avantages et limites de l'étude

Le point fort de notre étude demeure dans le fait que nous avons mis en œuvre une **technique de séquençage des ARN totaux**, alors que la plupart des études ont ciblé leurs approches sur certaines classes de gènes (*i.e.*, inflammation, jonctions serrées, vascularisation, *etc.*). Cette technique permet de couvrir l'**intégralité du transcriptome** dont l'ensemble des gènes peut être impacté par la sonoporation. De plus, les études de McMahon *et al.*, et Kovacs *et al.*, ont comparé les hémisphères ipsilatéraux avec les controlatéraux. Ces comparaisons ont donc été faites par rapport à une région cérébrale différente de la zone insonifiée. Deux remarques peuvent être faites : (i) la vascularisation des zones cérébrales peut être différente. En effet, le volume et l'intensité d'ouverture de la BHE dépendent de la densité des vaisseaux présents dans la zone visée ; et (ii) il est également largement admis que le cerveau suite à une agression développe des mécanismes de compensation, qui peuvent biaiser la comparaison des réponses physiopathologiques entre deux hémisphères d'un même cerveau (Hylín *et al.*, 2017). Nous avons comparé dans notre approche de transcriptomique, les striata des groupes ayant subi la sonoporation avec des striata contrôles (*i.e.*, injection de microbulles sans exposition aux ultrasons). De ce fait, nous comparons la même structure dans les mêmes conditions. Par conséquent, les résultats semblent plus représentatifs des effets biologiques de la sonoporation et, non ceux d'une potentielle compensation.

Cependant, nous avons vu que les échantillons présentaient une **importante hétérogénéité**, explicable par le nombre réduit d'individus par groupe, et par le séquençage des ARN de l'ensemble des types cellulaires présents dans le tissu nerveux. Par conséquent, il serait intéressant de reproduire ces expérimentations sur des groupes d'individus plus importants, permettant ainsi de consolider la

variabilité inter-groupe et de mettre en lumière d'autres gènes dérégulés. En effet, l'interprétation de la dérégulation de ces gènes mis en évidence dans ce travail n'est pas évidente sans avoir d'avantages d'intermédiaires dans les voies dérégulées. L'intérêt d'obtenir d'avantages d'intermédiaires réside dans la capacité à **affiner nos conclusions** pour clairement **décrire le(s) mécanisme(s) biologique(s)** responsable(s) de l'ouverture de la BHE par sonoporation. De plus, il serait pertinent de raccourcir les **délais** entre la perméabilisation de la BHE et l'exploration du transcriptome, afin d'évaluer la réponse « immédiate » de cette procédure. Également, nous avons utilisé l'ensemble du tissu sonopore lors du séquençage du transcriptome. L'ensemble des types cellulaires (neurones, cellules gliales, péricytes, cellules endothéliales, *etc.*) peut introduire une hétérogénéité dans la réponse génique. Kovacs *et al.*, ont réalisé leurs expérimentations sur l'ensemble du tissu sonopore, alors que McMahon *et al.*, ont utilisé une **technique de microdissection laser** pour ne récupérer que les cellules endothéliales. Bien que ces cellules soient les premières cibles de la sonoporation, les effets biologiques sur les tissus adjacents ne doivent pas être négligés (Preset *et al.*, 2020). En effet, la BHE fonctionne comme une **unité neurovasculaire** impliquant des **interactions fines et coordonnées** entre les différents types cellulaires la composant (Harder *et al.*, 2002). En d'autres termes, Kovacs *et al.*, ont d'avantage caractérisé les conséquences biologiques de la technique sur le tissu sonopore entier (nerveux, vasculaire, glial), tandis que McMahon *et al.*, ont étudié ses conséquences sur les cellules endothéliales. Ces travaux doivent donc être comparés avec précaution.

L'ensemble des résultats semblent conforter l'hypothèse de l'induction d'une hypoxie locale associée à une perturbation du métabolisme, qui pourrait augmenter transitoirement la perméabilité de la BHE. En effet, les études antérieures ont indiqué que les effets mécaniques de la sonoporation étaient confinés principalement dans l'endothélium et dans la paroi vasculaire. Ces effets mécaniques étaient associés à des vasospasmes de la vascularisation cérébrale (Raymond et al., 2007). Ces vasospasmes pourraient bloquer transitoirement la circulation sanguine et provoquer la baisse locale de la pression partielle en oxygène. De plus, plusieurs gènes relatifs à l'inflammation et à l'activation du système immunitaire ont été mis en évidence corroborant le fait que les cellules endothéliales pourraient subir des dommages non pathogéniques et donc provoquer une réponse immunitaire. Néanmoins, ces résultats doivent être confirmés par une exploration transcriptomique plus approfondie des gènes impactés par la sonoporation, et également dans des délais plus courts après la sonoporation, afin de capter la perturbation immédiate du transcriptome, voire la cause de l'ouverture de la BHE.

Partie III

Résultats et discussion

Chapitre 5

Caractérisation de la réponse métabolomique après l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique par sonoporation



III. Résultats et discussion	119
Chapitre 5. Caractérisation de la réponse métabolomique après l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique par sonoporation.....	183
1. Publication.....	185
2. Résultats complémentaires : exploration métabolique des striata controlatéraux.....	202
3. Synthèse.....	203
a) Neurotransmissions du striatum	204
b) Métabolismes des composants de l'unité neurovasculaire.....	206
(1) Neurones	206
(2) Astrocytes	207
(a) Réponse au stress oxydatif et hypoxique.....	207
(b) Régulation du flux sanguin en réponse à la demande métabolique	208
(3) Cellules endothéliales	209
c) Interprétation.....	210

Chapitre 5. Caractérisation de la réponse métabolomique après l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique par sonoporation

Bien que de nombreuses études décrivent les effets comportementaux, histologiques, et transcriptomiques de la perméabilisation de la BHE par sonoporation, une seule étude s'est intéressée aux perturbations métaboliques provoquées lors de la déstabilisation de la BHE induite par stimuli pro-inflammatoires (Brown *et al.*, 2016). Cette étude apporte de nouvelles informations sur le comportement de la BHE face à un stimulus inflammatoire dans un modèle *in silico/in vitro* de la BHE. En effet, lors de l'agression de la BHE par des cytokines, la vascularisation serait à l'origine des réponses pro-inflammatoires, tandis que le compartiment cérébral contre-attaquerait par une réponse anti-inflammatoire. Cependant, ces travaux se sont appuyés sur un modèle *in silico* et ces résultats doivent être vérifiés dans un modèle *in vivo* de l'ouverture de la BHE. En outre, en utilisant une technique d'imagerie fonctionnelle PET *in vivo*, l'étude de Sinharay *et al.*, a révélé l'augmentation de la liaison du radiomarqueur [¹⁸F] DPA-714 (marqueur de la protéine TSPO impliquée dans l'inflammation) après l'ouverture de la BHE (Sinharay *et al.*, 2019). Cependant, ces résultats ne sont pas significatifs et demandent à être confirmés. À ce jour, aucune étude n'a exploré *in vivo* les conséquences métaboliques centrales et périphériques de la perméabilisation de la BHE par sonoporation.

Nos travaux visant à évaluer par une approche analytique de haute performance les effets de la sonoporation sur le métabolisme de manière longitudinale et multimatricielle (Figure 60) ont été publiés dans le journal *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Preset *et al.*, 2022). Cette approche inclut deux méthodes analytiques complémentaires : la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie haute performance et à la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire du proton ¹H. Trois groupes composés de 4 rats reçoivent une injection intraveineuse de microbulles suivie d'une exposition aux ultrasons. Les paramètres acoustiques sont les suivants : fréquence centrale 1 MHz ; PRF 1 Hz ; BL 10 ms soit 10 000 cycles ; exposition 30 secondes ; 600 kPa PNP. Un volume de 100 µL est injecté à raison de 2,5 x 10⁸ MB/mL. Un groupe contrôle ne reçoit que l'injection de microbulles. Les urines, le sang, le LCS et le striatum sont prélevés, puis analysés sur notre plateforme analytique HPLC-MS et RMN. Nous avons parallèlement ciblé les dérivés du métabolisme du tryptophane par HPLC-MS quantitative, à travers le dosage des dérivés de la kynurénine et des dérivés de la sérotonine, qui sont impliqués dans l'inflammation et la transmission nerveuse. Les jeux de données obtenus sont traités et analysés par des méthodes bio-informatiques pour déterminer les métabolites qui sont impactés par la sonoporation. Ces métabolites servent ensuite à établir les voies métaboliques déstabilisées.

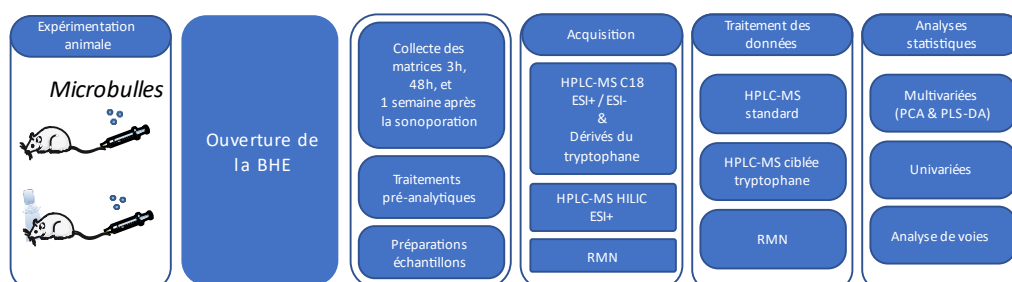


Figure 60 : *Workflow* utilisé pour l'approche métabolomique afin de déterminer des effets biologiques de l'ouverture de la barrière hématoencéphalique par sonoporation.

Référence bibliographique :

Preset, A., Bodard, S., Lefèvre, A., Millet, A., Oujagir, E., Dupuy, C., Iazourène, T., Bouakaz, A., Emond, P., Escoffre, J.-M., Nadal-Desbarats, L., 2022. First metabolomic signature of blood brain barrier opening induced by microbubble-assisted ultrasound. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 15.7

DOI : 10.3389/fnmol.2022.888318



First Metabolomic Signature of Blood-Brain Barrier Opening Induced by Microbubble-Assisted Ultrasound

Antoine Presset¹, Sylvie Bodard¹, Antoine Lefèvre^{1,2}, Anaïs Millet¹, Edward Oujagir¹, Camille Dupuy¹, Tarik lazourène¹, Ayache Bouakaz¹, Patrick Emond^{1,2,3}, Jean-Michel Escoffre^{1*†} and Lydie Nadal-Desbarats^{1,2*†}

OPEN ACCESS

Edited by:

Antonios N. Poullopoulos,
King's College London,
United Kingdom

Reviewed by:

Sophie Morse,
Imperial College London,
United Kingdom
Gerhard Leinenga,
The University of Queensland,
Australia

*Correspondence:

Lydie Nadal-Desbarats
lydie.nadal-desbarats@univ-tours.fr
Jean-Michel Escoffre
jean-michel.escoffre@univ-tours.fr

†These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Molecular Signaling and Pathways,
a section of the journal
Frontiers in Molecular Neuroscience

Received: 02 March 2022

Accepted: 06 May 2022

Published: 20 June 2022

Citation:

Presset A, Bodard S, Lefèvre A,
Millet A, Oujagir E, Dupuy C,
lazourène T, Bouakaz A, Emond P,
Escoffre J-M and Nadal-Desbarats L
(2022) First Metabolomic Signature
of Blood-Brain Barrier Opening
Induced by Microbubble-Assisted
Ultrasound.
Front. Mol. Neurosci. 15:888318.
doi: 10.3389/fnmol.2022.888318

¹ UMR 1253, iBrain, Inserm, Université de Tours, Tours, France, ² Département Analyses Chimique et Métabolomique, PST Analyses des Systèmes Biologiques, Université de Tours, Tours, France, ³ CHRU Tours, Serv Med Nucl in Vitro, Tours, France

Microbubble (MB)-assisted ultrasound (US) is a promising physical method to increase non-invasively, transiently, and precisely the permeability of the blood-brain barrier (BBB) to therapeutic molecules. Previous preclinical studies established the innocuity of this procedure using complementary analytical strategies including transcriptomics, histology, brain imaging, and behavioral tests. This cross-sectional study using rats aimed to investigate the metabolic processes following acoustically-mediated BBB opening *in vivo* using multimodal and multimatrices metabolomics approaches. After intravenous injection of MBs, the right striata were exposed to 1-MHz sinusoidal US waves at 0.6 MPa peak negative pressure with a burst length of 10 ms, for 30 s. Then, the striata, cerebrospinal fluid (CSF), blood serum, and urine were collected during sacrifice in three experimental groups at 3 h, 2 days, and 1 week after BBB opening (BBBO) and were compared to a control group where no US was applied. A well-established analytical workflow using nuclear magnetic resonance spectrometry and non-targeted and targeted high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry were performed on biological tissues and fluids. In our experimental conditions, a reversible BBBO was observed in the striatum without physical damage or a change in rodent weight and behavior. Cerebral, peri-cerebral, and peripheral metabolomes displayed specific and sequential metabolic kinetics. The blood serum metabolome was more impacted in terms of the number of perturbed metabolisms than in the CSF, the striatum, and the urine. In addition, perturbations of arginine and arginine-related metabolisms were detected in all matrices after BBBO, suggesting activation of vasomotor processes and bioenergetic supply. The exploration of the tryptophan metabolism revealed a transient vascular inflammation and a perturbation of serotonergic neurotransmission in the striatum. For the first time, we characterized the metabolic signature following the acoustically-mediated BBBO within the striatum and its surrounding biological compartments.

Keywords: microbubble, blood-brain barrier opening, metabolomics, HPLC-MS, NMR, ultrasound, inflammation, neurotransmission

INTRODUCTION

The blood-brain barrier (BBB) is one of the most selective and semi-permeable biological barriers in mammals. It isolates the central nervous system (CNS) from the whole body, creating a privileged environment for maintaining the homeostasis of the cerebral compartment (Pardridge et al., 1986). BBB is composed of endothelial cells, perivascular astrocyte end-feet, pericytes, neurons, and basal membrane. The permeability of this barrier is drastically reduced by the presence of tight junctions (TJs) between endothelial cells, abolishing any paracellular diffusion of molecules (Abbott et al., 2010). In addition, brain cells and blood vessel cells are provided with passive and active transporters that regulate the concentration of molecules within the cerebral tissue. Nutrients, gases (O₂ and CO₂), ions, water (through aquaporin-4), and small lipid-soluble molecules less than 400 Daltons can pass through this barrier by facilitated diffusions, such as glucose and large amino-acid transporters (Daneman and Prat, 2015). Nevertheless, active efflux proteins (ATP-binding cassette and solute carrier family transporters) transport any compound from the brain tissue to the vascular compartment. These active transporters limit the passage through the BBB of pathogens, toxins, solutes, and large hydrophilic molecules like therapeutics (Barar et al., 2016). Because of this barrier and its physiological functions, the BBB renders the treatment of neurological diseases challenging by reducing, if not abolishing, the biodistribution of therapeutics in the cerebral tissue. One way to bypass this barrier is to transiently disrupt endothelial cells by applying the microbubble (MB)-assisted ultrasound (US) method (also known as sonoporation), thus allowing a non-invasive and targeted delivery of therapeutics. MBs are intravenously injected and locally activated by focused US, thus increasing the permeability of the vascular endothelium and facilitating drug extravasation and its bioavailability in the targeted brain tissue (Presset et al., 2020). Importantly, this procedure enables precise BBB opening (BBBO) in deeper brain regions without resorting to surgical intervention. For instance, the striatum is a functional deep subcortical nucleus in the brain involved in the processing of motor and cognitive tasks. This cerebral structure is specifically implicated in several neurological and psychiatric pathologies, such as Parkinson's or Huntington's disease, addiction, bipolar or autism spectrum disorders, and attention deficit or hyperactivity disorders (Grahn et al., 2008). Hence, the striatum remains a prime target for studying the effect of neuroprotective treatment (Schober, 2004) or novel curative strategies, such as cellular therapies (Gaillard and Jaber, 2011).

Blood-brain barrier opening safety using US and MBs has been investigated using complementary analytical strategies including transcriptomics, histology, behavioral tests, and brain imaging, e.g., magnetic resonance imaging (MRI) and positron emission tomography/computed tomography (PET/CT). Transcriptomic studies showed overexpression of pro-inflammatory- and antiapoptotic-associated genes (Kovacs et al., 2017; McMahan and Hynynen, 2017; McMahan et al., 2017, 2020; Ji et al., 2021). Gene set enrichment analysis allowed describing classes of genes that are over- or under-represented in a large set of genes. These results revealed the involvement of

drug transporter activity, chronic inflammatory response, and antigenic stimuli associated with the inflammatory response. Immunohistochemistry (IHC) analysis of the brain tissue partly confirmed these results. Indeed, this approach revealed the presence of inflammatory proteins and scavenger receptors of complex hemoglobin/haptoglobin, an over-expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), and some apoptotic neurons. Electron microscopy allowed a deep investigation of TJ integrity and the cytoarchitectural consequences of acoustically-mediated BBBO, especially on clathrin- and caveolin-mediated endocytosis and paracellular adhesion. In addition, hematoxylin and eosin staining of brain sections only showed rare red-blood-cell extravasation and gliosis under severe acoustic conditions (Sheikov et al., 2004, 2006, 2008; McDannold et al., 2005; Baseri et al., 2010; Alonso et al., 2011; Kovacs et al., 2018), namely a very high dose of MBs (corresponding to 10-fold the conventional MB dose applied in clinical US imaging, i.e., 100 μ L of Definity MBs/kg) or a high mechanical index of 100. Several imaging studies, such as brain MRI, have confirmed the absence of hemorrhages or edema during the BBBO procedure under clinical acoustic conditions (Liu et al., 2008; Kim et al., 2013; Horodyckid et al., 2017; Mainprize et al., 2019). Behavioral studies on non-human primates (NHP) or rodents did not show significant differences between the experimental groups (Olumolade et al., 2016; Tsai et al., 2018). All these studies convey that acoustically-mediated BBBO induces low or no neurophysiological damage onto the targeted tissue. These potential damages are directly correlated to the acoustic parameters and MBs, i.e., their composition and concentration, specifically (McMahon and Hynynen, 2017; McMahon et al., 2019). To date, to the best of our knowledge, no study explored the neurophysiological aftermath of this procedure on the metabolic level. In addition, all studies cited above focused on the cerebral tissue or endothelial cells. The vascular compartment has been shown to be the first impacted matrix after BBBO by MB-assisted US (Presset et al., 2020). Therefore, the present study focused on the metabolomic fingerprint of the brain tissue and body fluids, such as the cerebrospinal fluid, the blood, and urine following acoustically BBBO.

Metabolomics is an omics-based discipline that investigates, at a large scale, small molecules (called metabolites) from metabolic processes of cells, biofluids, tissues, and organisms defined as biological matrices. This promising and powerful approach gives access to the molecular phenotype by identifying the metabolites and measuring their concentrations, thus enabling the direct readout of the underlying biochemical activity in contrast to other omics approaches (e.g., genomics, transcriptomics, among others). These metabolites and their interactions within a given biological system are defined as the metabolome. To cover most of the metabolome, a multiplatform metabolomics approach, including nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and mass spectroscopy (MS), is often implemented and allows exploring the influence of physical factors on the functioning of an organism by the description of its metabolome. Metabolomics showed a clear potential in the evaluation of biomarkers for diagnosis, prognosis, and therapeutic monitoring. In this context, the present study

aimed to investigate the metabolic consequences of acoustically-mediated BBBO targeted in the striatum region. As already described in transcriptomics approaches (Kovacs et al., 2017, 2018; McMahon and Hynynen, 2017; McMahon et al., 2017, 2020), short longitudinal studies were conducted; specifically, the maximum interval reported between sonoporation and transcriptomic investigations was 4 days after acoustically-mediated BBBO (McMahon and Hynynen, 2017). In this present study, a wide longitudinal study (up to a week after the procedure) of these metabolic consequences on brain tissue (i.e., striatum), cerebrospinal fluid (CSF), blood serum, and urine metabolomes was performed using NMR spectroscopy and high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (HPLC-MS).

Acoustically-Mediated Blood-Brain Barrier Opening Ultrasound Set-Up

As previously described, US waves were generated using a single element lab-made transducer with a center frequency of 1 MHz (Escoffre et al., 2013). The transducer had a diameter of 49 mm and was focused at 49 mm. It was driven with an electrical signal generated by an arbitrary waveform generator (Ref. 33220A; Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, United States), then amplified with a power amplifier (Ref. AAP-500-0.2-6-D; ADECE, Vallauris, France). The peak negative pressure was determined in a distinct setup using a capsule hydrophone (Ref. HGL-0200; ONDA Corporation, Sunnyvale, CA, United States) at the focal distance of the transducer.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Housing

All male rats Sprague Dawley (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) were 7 weeks old (about 250 g) before experiments. They were housed in groups of 4 under humidity and temperature-controlled conditions and a 12:12 light-dark cycle (light on at 7:00 AM) with *ad libitum* access to food and water. Animals were acclimated to their housing for 1 week before the *in vivo* procedures.

Blood-Brain Barrier Opening Protocol

Rats were anesthetized with a mixture of ketamine (70 mg/kg, Kétamine 1000®, Virbac, Carros, France) and xylazine (7 mg/kg, Rompun®, Elanco, Cuxhaven, Germany). Then, they were placed into a stereotactic frame and on a heating plate. The 1 MHz single element transducer (Figure 1A) was inserted in a degassed water-filled cone to ensure coupling with the head of the animals. This transducer was placed over the scalped skull at specific stereotactic coordinates of the region of interest (ROI), the right striatum, i.e., anteroposterior – AP –0.5 mm,

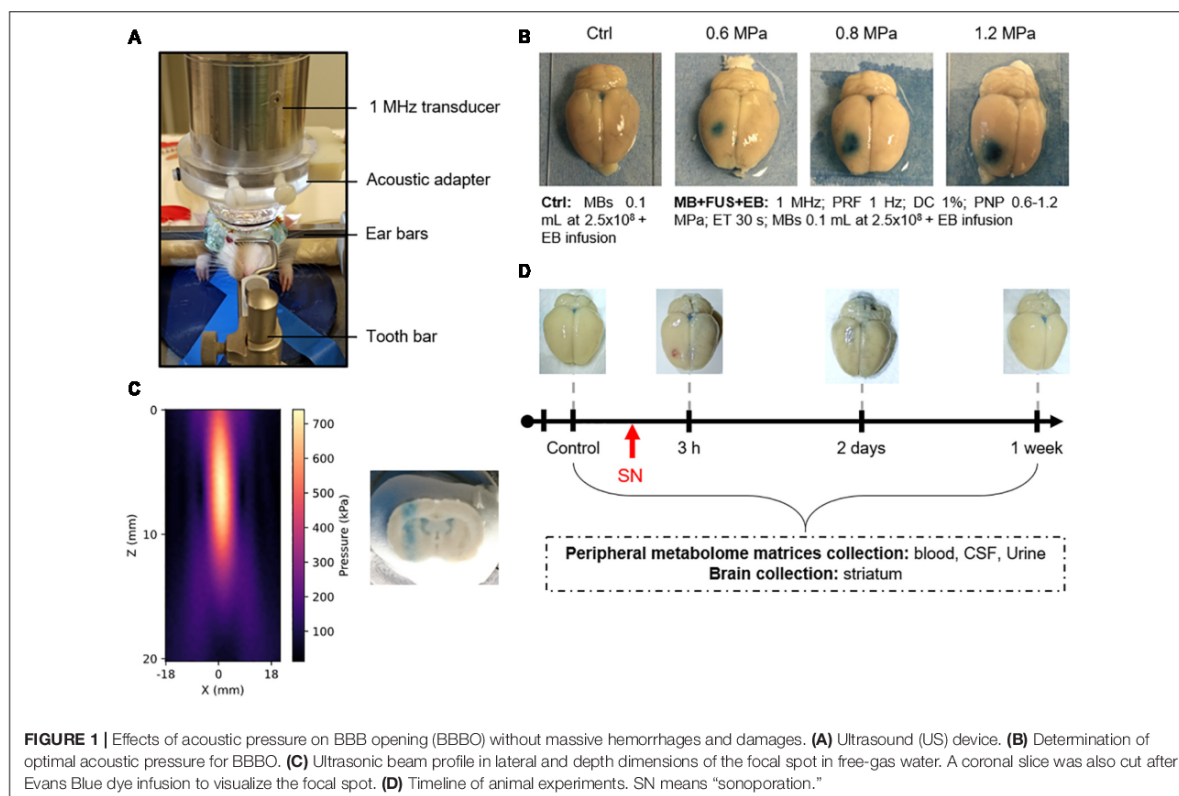


TABLE 1 | Summary of sample sizes by matrix and group and of animal weight (before and after the sonoporation).

		Number of samples			
Group		Control	3-h	2 days	1 week
Matrices	Striatum	8	8	8	8
	CSF	8	8	7	8
	Blood serum	11	10	9	10
	Urine	8	8	8	10
Weight (g)	Before MB-FUS	343 ± 15	332 ± 11	341 ± 22	344 ± 24
	After MB-FUS	367 ± 19	383 ± 22	378 ± 28	379 ± 28

Bodyweight of rats is expressed as mean ± standard deviation. MB-FUS: microbubble-assisted focused ultrasound.

Lateral – L ± 3.15 mm, and ventrodorsal – VD 5 mm. From now on, the right striatum will be called striatum ipsilateral. After a bolus injection of MBs (Vevo Micromarker; 100 µL at 2.5×10^8 MBs/mL; mean diameter in volume 2.3 to 2.9 µm; Fujifilm-Visualsonics Inc., Amsterdam, Netherlands), the ROI was exposed to 1 MHz sinusoidal US waves for 30 s with a pulse repetition frequency (PRF) of 1 Hz and 10,000 cycles per pulse (10 ms burst length). The peak negative pressure (PNP) ranged from 0 to 1.2 MPa in agreement with Gerstenmayer et al. (2018). Immediately after US exposure, a 2% Evans blue solution (EB; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, United States) was carefully intravenously injected at 5 ml/kg *via* the caudal vein to monitor the BBBO. After 1 h, animals were intraperitoneally injected with an overdose of the anesthetic mixture and transcardially perfused with a 0.9% saline solution. Then, brains were collected and observed under an optical stereomicroscope (MZ9.5; Leica, Wetzlar, Germany).

For metabolomics analysis, BBBO was achieved one time using the same protocol above described using a PNP of 0.6 MPa but the EB solution was not administered. As defined above, the animals were sacrificed for 3 h (3-h group), 2 days (2-days group), and 1 week (1-week group) after the BBBO. Animals from control groups were treated as described above with no US application. The group size is presented in **Table 1**.

Animal wellbeing has been assessed each day until sacrifice by monitoring variations in rat behaviors (i.e., respiratory deficiency, loss of locomotion, loss of appetite, loss of grooming, aggressiveness, fear, etc.) and in body weights. Rat weights before and after the procedure have been consigned in **Table 1**.

Collection and Preparation of Biological Samples

Striatum

Brains tissues were collected and striata were dissected by an expert in brain microsurgery. Then, tissues were lyophilized and homogenized. Dry residues were weighted to approximately 3 mg. Finally, metabolites were extracted using an extraction protocol described by Dieme et al. (2017).

Cerebrospinal Fluid

Cerebrospinal fluid (CSF) was collected from cisterna magna and was centrifugated at 10,000 g for 15 min at 4°C. Finally, the

extraction of metabolites was performed according to a protocol established by Blasco et al. (2013).

Blood Serum

Blood was collected directly from the right cardiac atria and was coagulated for 30 min at room temperature. Then, blood was centrifugated at 10,000 g for 15 min at 4°C. The supernatant was collected corresponding to blood serum. Metabolites were extracted as previously reported by Alshammari et al. (2015).

Urine

Urine was collected directly from the output of the bladder. For ^1H NMR analyses, samples were centrifuged and diluted to $1/4$ in D_2O with final concentration of 123 µM of trimethylsilylpropanoic acid (TSP) buffer (Dieme et al., 2015).

^1H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and High-Performance Liquid Chromatography Coupled With Mass Spectrometry Analysis

As previously reported by Dieme et al. (2015, 2017) ^1H NMR analyses were carried out on brain tissue, CSF, blood serum, and urine. Briefly, these analyses were performed on a Bruker DRX-600 Avance III HD (Bruker, Billerica, MA, United States) equipped with a TCI cryoprobe. Spectra were acquired using a “noesypr1d” pulse sequence with a relaxation delay of 20 s. Scans were acquired successively 64 times on each sample.

Striata, CSF, and blood serum were analyzed using HPLC-MS analysis as established by Dupuy et al. (2021). In brief, HPLC-MS analyses were performed on a UHPLC Ultimate WPS-3000 system (Dionex, Sunnyvale, CA, United States) coupled to a Q-Exactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) and operated in positive (ESI+) and negative (ESI-) electrospray ionization modes. HPLC was achieved using two different columns to increase the metabolic coverage: a Kinetex XB C18 column (150 mm × 2.1 mm × 1.7 µm; Phenomenex Inc., Torrance, CA, United States) and a Cortecs HILIC column (150 mm × 2.1 mm × 1.6 µm; Waters Corporation, Milford, MA, United States). During the full-scan acquisition (full MS, AGC target of 10^6 , maximum injection time of 250 ms), which ranged from 58 to 870 m/z, the instrument operated at 70,000 resolution ($m/z = 200$). Finally, tryptophan's derivatives were quantified within brain tissues, CSF, and blood serum as described in Lefevre et al. (2019); Alarcán et al. (2021).

Data Processing

Metabolite Identification

A targeted analysis was applied to the samples of each matrix, based on a library of standard compounds (Mass Spectroscopy Metabolite Library of standards; IROA Technologies, Sea Girt, NJ, United States). The following criteria were used to identify the metabolites: retention time of the detected metabolite within ± 20 s of the standard reference and exact measured molecular mass of the metabolite within a range of 10 ppm around the known molecular mass of the reference compound. The intensity value was calculated using Xcalibur 2.2 software

(ThermoFisher Scientific, San Jose, CA, United States) by integrating the chromatographic peak area corresponding to the selected metabolite. In addition, tryptophan derivatives were identified and quantified by the correspondence between isotopic ratios of the metabolite and the labeled internal standard. NMR spectra were preprocessed (phase correction, baseline correction, peak alignment, and normalization), and NMR peak identification and quantification were performed by fitting spectra with a library of pure quantified metabolite spectrum with R software 4.0.2 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) with ASICS package 2.6.1 (Lefort et al., 2019).

Normalization

Concentration and intensities of blood serum and CSF samples were normalized to the total area while cerebral tissue samples were normalized to the weighted dry masses. Creatinine concentration was determined using TSP as an internal standard compound. Urine samples were normalized to the creatinine concentration (Craig et al., 2006).

Quality Control

High-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry and ^1H NMR instruments' stability were evaluated by multiple injections of quality control (QC) samples obtained from a pool of 10 μl of all samples analyzed. QCs were analyzed at the beginning of the run, every 10 samples, and at the end of the run. Coefficients of variation, defined as $\text{CV} = (\text{the standard deviation}/\text{mean}) \times 100$, were calculated for all metabolites in the dataset. Metabolites detected with a CV greater than 30% in QC samples were discarded for further analysis.

High-Performance Liquid Chromatography Coupled With Mass Spectrometry and ^1H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Data Fusion

Each biological matrix was explored using HPLC-MS and ^1H NMR. For CSF samples, 181 metabolites in C18 column ESI+/ESI-, 119 metabolites in HILIC column ESI+, and 86 metabolites in NMR spectroscopy, were identified. For blood serum samples, 306 metabolites in C18 column ESI+/ESI-, 160 metabolites in HILIC column ESI+, and 109 metabolites in NMR spectroscopy, were identified. For brain samples, 224 metabolites in C18 column ESI+/ESI-, 161 metabolites in HILIC column ESI+, and 92 metabolites in NMR spectroscopy, were identified. Each metabolite of lists coming from the different platforms and modalities was associated with universal identifiers from online databases, such as Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG, Kyoto, Japan, accessed on 10 June 2021), Human Metabolome Database (HMDB, Ottawa, Canada, accessed on 10 June 2021), and PubChem (Bethesda, MD, United States, accessed on 10 June 2021) databases (Kanehisa et al., 2017; Wishart et al., 2018; Kim et al., 2021). The redundancy of unique identifiers was analyzed to keep only metabolites with the smallest CV found in the 4 explored modalities (C18-MS ESI+/ESI-, HILIC-MS ESI+, and NMR spectroscopy). After redundancy filtering, 214 metabolites were identified in CSF, 251 were identified in blood serum, and 199 were identified in the

striatum. The number of identified metabolites only with NMR spectroscopy in urine was 124.

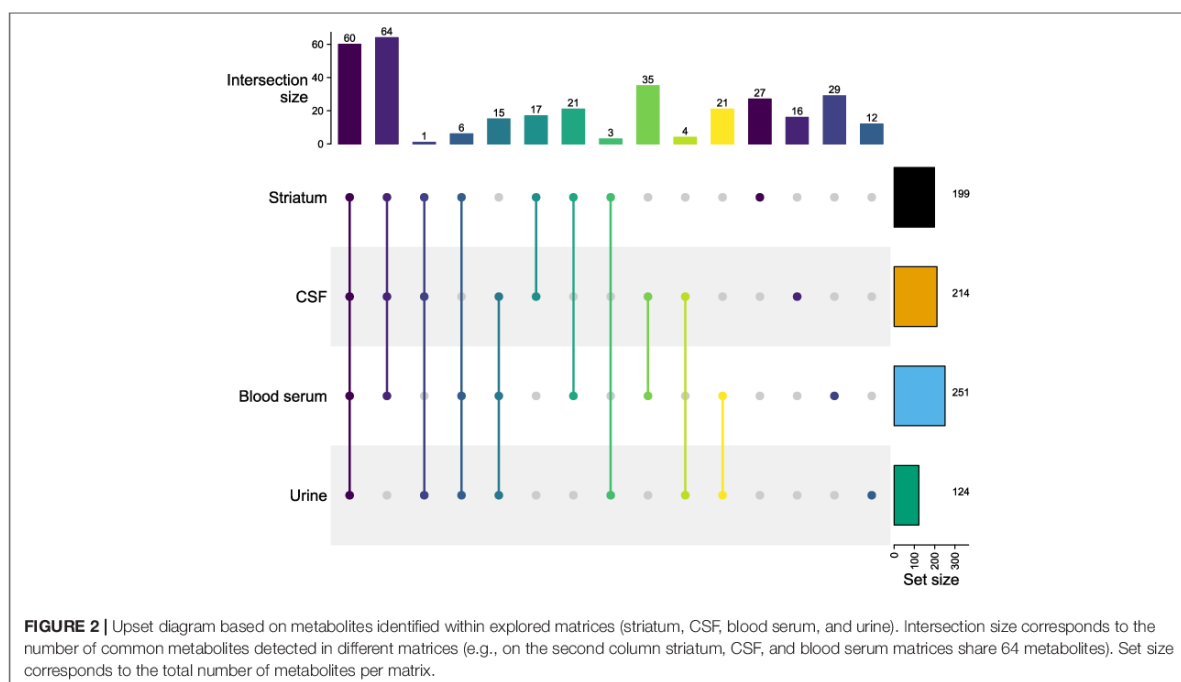
Statistical Analyses

Multivariate data analyses were achieved using unsupervised principal component analysis (PCA). PCA is commonly used for dimensionality reduction by projecting each data point onto only the first few principal components to obtain lower-dimensional data while preserving as much of the data's variation as possible. It allows summarizing data by reducing the number of variables and denoising the data. In addition, this statistical approach has several goals: (i) exploration of a large dataset characterized by several quantitative variables; (ii) identification of clusters by grouping samples that share nearly metabolic profiles, represented by score plot; and (iii) identification of aberrant samples called outliers. Supervised partial least square discriminant analysis (PLS-DA) was also used to establish predictive models between two-time groups by constraining the sample membership to specific groups. The model's significance is evaluated by two p -values: pR^2Y that assesses the significance of the model and pQ^2 that reflects the predictability of the model. These supervised analyses determine the metric termed variable importance in projection (VIP), which summarize the importance of each metabolite to define the predictive model. All of these multivariate analyses were performed using `ropls` R package 1.22 (Thevenot et al., 2015). After checking the normal distribution of samples (Shapiro test) and the homogeneity of variance (Fligner test), non-parametric pairwise multiple comparisons in independent groups using Dunn's test with Bonferroni p -value adjustment were performed. Metabolites were considered significant when the adjusted p -value was inferior to 0.05. Finally, significant metabolites identified by univariate analyses depending on the temporality comparisons were used to perform metabolic pathway analyses using a hypergeometric test with false discovery rate (FDR) p -value adjustment, based on definitions of the KEGG database. Each significant pathway (i.e., adjusted p -value inferior to 0.05) was reviewed to verify its pertinent involvement in the explanation of biological differences (i.e., metabolites that follow pertinent metabolic ways and biochemical reactions with other dysregulated metabolites).

RESULTS

Reversible Blood-Brain Barrier Opening Without Inducing Permanent Tissue Damages

Particular attention has been paid to animal well-being. The procedure is well tolerated by animals that did not show apparent physical signs of suffering and have not lost weight (**Table 1**) before and after the US application. The BBBO was assessed by EB extravasation immediately after the intravascular injection (i.v.) of MBs with or without US exposure. The results are shown in **Figure 1B**. As expected, the i.v. injection of MBs alone (i.e., control condition) induced neither an EB extravasation nor microhemorrhages in the target area. However, the exposure of



this target area to the MB-assisted US at 0.6 MPa resulted in EB extravasation, thus confirming the BBBO. The qualitative microscopic analysis of the brain tissue revealed the occasional presence of a few microhemorrhages. The increase of acoustic pressure from 0.8 to 1.2 MPa induced an enhancement of the tissue area where EB was extravasated. This BBBO was associated with a moderate to a high number of microhemorrhages at both 0.8 and 1.2 MPa, respectively. Taking this into consideration, an acoustic pressure of 0.6 MPa was retained for the investigation of metabolic consequences of acoustically-mediated BBBO using metabolomics approaches.

To assess the duration of BBBO at 0.6 MPa, EB was intravenously injected at different time points (immediately to 1 week) after the US exposure and then brains were collected and analyzed. Our data showed that the native BBB permeability was restored 1-h post-US exposure (**Supplementary Figure 1**). Few microhemorrhages were observed until 3 h after BBBO only (**Figure 1D**). As shown in **Figure 1**, the results demonstrate that our protocol induced a reversible BBBO without inducing irreversible damage to the tissue.

Multiplatform and Multimatrices Cross-Analyses Allow the Identification of Common Metabolites Between Matrices

As previously reported, an upset diagram of identified metabolites depending on the degree mode of intersections was generated to assess the complementarity in terms of metabolite coverage across all matrices (**Figure 2**; Lex et al., 2014). This

diagram allows efficient identification of the total number of metabolites per matrix (i.e., set size) and the number of common metabolites detected in different matrices (i.e., intersection set). In **Figure 2**, the horizontal bar graph indicates the total number of metabolites for each matrix: 124 in urines, 199 in the striatum, 214 in the CSF, and 251 in the blood serum. As expected, the blood serum metabolome provides the highest specificity. Indeed, the blood serum, and by extension the blood, is a biological matrix well known to be rich in metabolites (Psychogios et al., 2011).

Supplementary Table 5 shows the detailed list of metabolites identified in each intersection of the upset diagram. As shown in **Figure 2**, the vertical bar graph indicates the total number of only exclusive metabolites with one biological matrix: 12 in urines, 16 in the CSF, 27 in the striatum, and 29 in the blood serum. The presence of these unique metabolites displays the complementarity of the metabolic coverage supplied by each biological matrix. With 35 common metabolites, CSF and blood serum provide a higher score of intersection between the two matrices. This result is not surprising given the expected correlation between the CSF and the blood serum. Indeed, the CSF is an ultrafiltrate of blood, which is substantially similar to it, except that CSF is a nearly protein-free matrix, which has some different electrolytes concentrations (Segal, 2000; Bulat and Klarica, 2011). As expected, the intersection with brain tissue, CSF, and blood serum provides a higher number of metabolites shared between the three matrices (i.e., 64 metabolites). Indeed, these compartments are directly related to each other through biological barriers (i.e., blood-CSF barrier, glomerular filtration, etc.).

Cerebral and Peripheral Metabolomes Depict Specific and Sequential Kinetics After Acoustically-Mediated Blood-Brain Barrier Opening

The metabolomes' profiles of different biological matrices (e.g., striatum, CSF, blood serum, and urine) from control and sonicated groups at different time points (e.g., 3-h, 2-days, 1-week) post-BBBO were determined by using unsupervised multivariate analyses (PCA). Taking into consideration the temporal dimension of these profiles, the kinetics of metabolic changes after acoustically-mediated BBBO for each matrix is defined. As shown in **Figures 3–6** and **Tables 2–5**, each matrix showed specific kinetics of metabolic changes. The blood serum metabolome was more important than CSF, striatum, and urine metabolomes in terms of observed metabolic perturbations. Indeed, the CSF metabolome seems to return to the basal level more quickly than the blood serum metabolome. There is no longer any metabolic disruption in CSF 3 h after BBBO in comparison with the blood serum metabolome, which showed metabolic perturbations up to 1-week post-BBBO. In contrast, metabolic dysregulations within the striatum metabolome were greatest 2 days post-BBBO and persisted for up to a week, as well as urine metabolome showed metabolic perturbations up to a week after the BBBO procedure.

Pathway Analyses on Cerebral and Peripheral Metabolomes Reveal Several Metabolic Dysregulations Over Time Striatum Tissue

Taking the temporal dimension into consideration, the two first components of the PCA explained 33.5% of the total

variance (**Figure 3**). Control and 3-h post-BBBO groups would share the same metabolic profile, while 2-days and 1-week post-BBBO groups would share another one. The analysis of

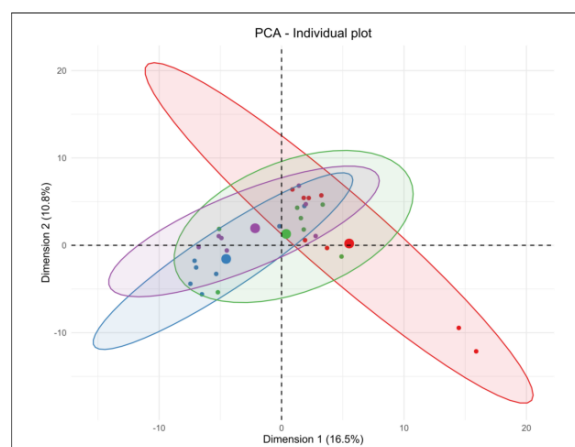


FIGURE 4 | Unsupervised multivariate analyses on CSF metabolome between control andinsonified groups. Score plot of principal component analysis (PCA) constructed with metabolites within the CSF metabolome after acoustically-mediated BBB opening (BBBO). Larger dots are inertial centers of ellipses (center of a sample group) plotted based on smaller dots representing each sample individually. Red dots are control samples; Blue dots are 3-h post-BBBO samples; Green dots are 2-days post-BBBO samples; Purple dots are 1-week post-BBBO samples. Two samples having the same metabolic profile will be clustered in the same dimensional space.

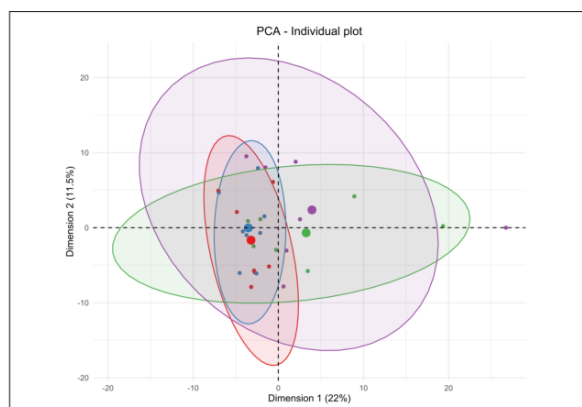


FIGURE 3 | Unsupervised multivariate analyses on striatum metabolome between control andinsonified groups. Score plot of principal component analysis (PCA) constructed with metabolites within the striatum metabolome after acoustically-mediated BBB opening (BBBO). Larger dots are inertial centers of ellipses (center of a sample group) plotted based on smaller dots representing each sample individually. Red dots are control samples; Blue dots are 3-h post-BBBO samples; Green dots are 2-days post-BBBO samples; Purple dots are 1-week post-BBBO samples. Two samples having the same metabolic profile will be clustered in the same dimensional space.

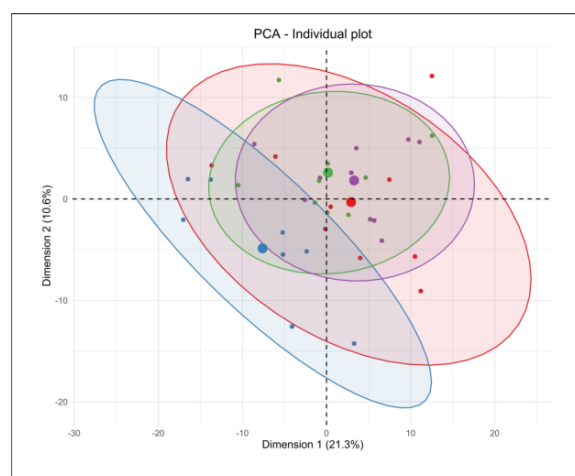


FIGURE 5 | Unsupervised multivariate analyses on blood serum metabolome between control andinsonified groups. Score plot of principal component analysis (PCA) constructed with metabolites within the blood serum metabolome after acoustically-mediated BBB opening (BBBO). Larger dots are inertial centers of ellipses (center of a sample group) plotted based on smaller dots representing each sample individually. Red dots are control samples; Blue dots are 3-h post-BBBO samples; Green dots are 2-days post-BBBO samples; Purple dots are 1-week post-BBBO samples. Two samples having the same metabolic profile will be clustered in the same dimensional space.

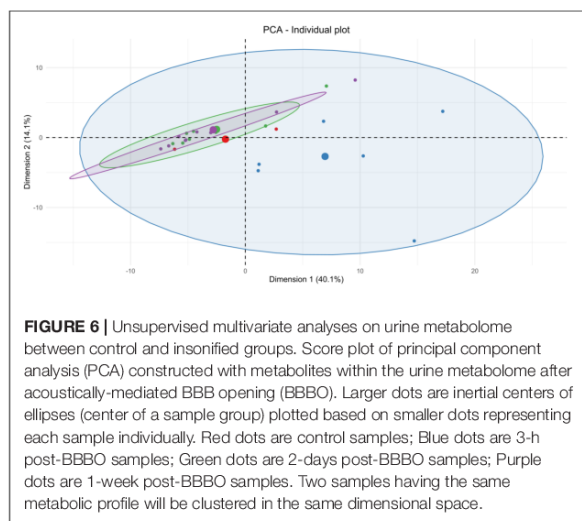


TABLE 2 | Supervised multivariate PLS-DA models computed from metabolites found in striatum metabolome differentiating two groups.

Model	R2X	R2Y	Q2	pR2Y	pQ2	VIP > 1
Control vs. 3-h	0.410	0.988	0.767	0.15	0.05	90
3-h vs. 2-days	0.396	0.991	0.764	0.10	0.05	113
2-days vs. 1-week	0.423	0.991	0.389	0.15	0.35	84
1-week vs. Control	0.491	0.981	0.782	0.40	0.05	100
Control vs. 2-days	0.416	0.995	0.763	0.10	0.20	98
3-h vs. 1-week	0.448	0.981	0.643	0.10	0.10	100

Model is considered significant if permutation metrics (pR2Y and pQ2, corresponding to the p-value of the permutation test) are inferior to 0.05 (in bold), as well as predictive metric (Q2) is higher than 0.5. Variable importance in projection (VIP) is exploitable if and only if the predictive model is significant. Only VIP superior to 1 has been counted (VIP > 1 column).

other principal component axes (i.e., 2nd and 3rd) confirmed this metabolic profile sharing (data not shown). It was noted that the samples of the 2-days group are more heterogeneous than the other groups. Nevertheless, these two clusters of experimental groups appear to have different metabolic profiles. No supervised model using the PLS-DA method has been significantly predictive (Table 2). The statistical analysis of the intensities of metabolites identified a few dysregulated metabolic pathways in the hours and days following the BBB opening (Figure 7). Indeed, upregulation of glycine, serine, and threonine metabolism was observed between control and 3-h post-BBBO groups, but also between 3-h post-BBBO and 2-days post-BBBO groups. In addition, phenylalanine, tyrosine, and tryptophan biosynthesis were also upregulated between 3-h and 2-days post-BBBO groups. Finally, the most important metabolic perturbations in the striatum were observed between the control and 1-week post-BBBO groups, where glutathione metabolism, arginine biosynthesis, alanine, aspartate, and glutamate metabolism, and D-glutamine/D-glutamate metabolism, were significantly upregulated.

TABLE 3 | Supervised multivariate PLS-DA models computed from metabolites found in CSF metabolome differentiating two groups.

Model	R2X	R2Y	Q2	pR2Y	pQ2	VIP > 1
Control vs. 3-h	0.504	0.992	0.848	0.05	0.05	86
3-h vs. 2-days	0.426	0.993	0.828	0.05	0.05	80
2-days vs. 1-week	0.407	0.959	0.171	0.80	0.60	74
1-week vs. Control	0.516	0.959	0.426	0.45	0.15	94
Control vs. 2-days	0.445	0.976	0.352	0.10	0.20	93
3-h vs. 1-week	0.397	0.998	0.840	0.15	0.05	71

Model is considered significant if permutation metrics (pR2Y and pQ2, corresponding to the p-value of the permutation test) are inferior to 0.05 (in bold), as well as predictive metric (Q2) is higher than 0.5. Variable importance in projection (VIP) is exploitable if and only if the predictive model is significant. Only VIP superior to 1 has been counted (VIP > 1 column).

TABLE 4 | Supervised multivariate PLS-DA models computed from metabolites found in blood serum metabolome differentiating two groups.

Model	R2X	R2Y	Q2	pR2Y	pQ2	VIP > 1
Control vs. 3-h	0.472	0.989	0.877	0.02	0.01	120
3-h vs. 2-days	0.449	0.989	0.858	0.01	0.01	106
2-days vs. 1-week	0.269	0.901	0.426	0.90	0.60	110
1-week vs. Control	0.182	0.960	0.368	0.80	0.05	111
Control vs. 2-days	0.315	0.898	0.392	0.15	0.15	115
3-h vs. 1-week	0.452	0.990	0.859	0.05	0.05	117

Model is considered significant if permutation metrics (pR2Y and pQ2, corresponding to the p-value of the permutation test) are inferior to 0.05 (in bold), as well as predictive metric (Q2) is higher than 0.5. Variable importance in projection (VIP) is exploitable if and only if the predictive model is significant. Only VIP superior to 1 has been counted (VIP > 1 column).

TABLE 5 | Supervised multivariate PLS-DA models computed from metabolites found in urine metabolome differentiating two groups.

Model	R2X	R2Y	Q2	pR2Y	pQ2	VIP > 1
Control vs. 3-h	0.603	0.905	0.286	1.00	0.80	53
3-h vs. 2-days	0.626	0.833	0.423	0.35	0.10	55
2-days vs. 1-week	0.612	0.910	-0.061	0.05	0.50	43
1-week vs. Control	0.706	0.981	0.532	0.05	0.25	40
Control vs. 2-days	0.659	0.969	-0.537	0.30	0.95	40
3-h vs. 1-week	0.645	0.897	0.719	0.05	0.05	48

Model is considered significant if permutation metrics (pR2Y and pQ2, corresponding to the p-value of the permutation test) are inferior to 0.05 (in bold), as well as predictive metric (Q2) is higher than 0.5. Variable importance in projection (VIP) is exploitable if and only if the predictive model is significant. Only VIP superior to 1 has been counted (VIP > 1 column).

Cerebrospinal Fluid

As shown in Figure 4, PCA on CSF metabolites explained 27.3% of the total variance on the first two components. The CSF metabolome profile shifts radically 3 h after the acoustically-mediated BBBO compared to the control condition. Then, the CSF metabolome at 2 days and 1-week post-BBBO seem to recover and shared a similar metabolite profile to the control condition. Supervised PLS-DA analyses identified two significantly predictive models, thus confirming the unsupervised PCA findings (Table 3). Indeed, significant predictive models were identified when comparing control with 3-h post-BBBO

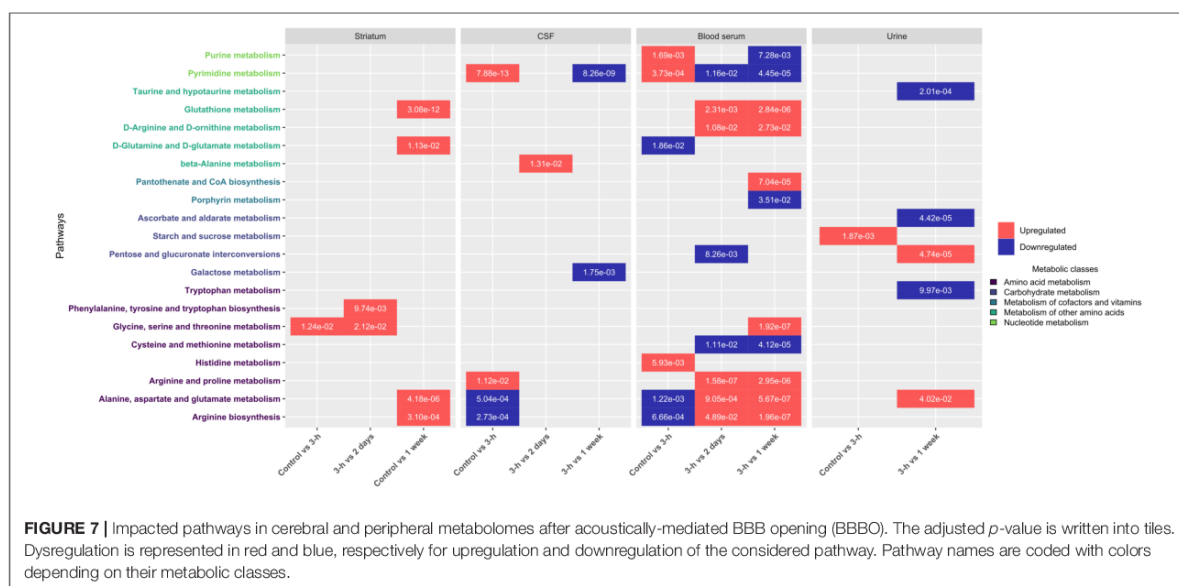


FIGURE 7 | Impacted pathways in cerebral and peripheral metabolomes after acoustically-mediated BBB opening (BBBO). The adjusted *p*-value is written into tiles. Dysregulation is represented in red and blue, respectively for upregulation and downregulation of the considered pathway. Pathway names are coded with colors depending on their metabolic classes.

groups and that of 3-h with 2-days post-BBBO groups. Then, univariate analyses were performed on CSF metabolites. Significantly different metabolites have been used to perform a metabolic pathway analysis as a function of post-BBBO time (Figure 7). The comparison of metabolic pathways between control and 3-h post-BBBO groups showed an upregulation of pyrimidine metabolism, arginine, and proline metabolisms, associated with a downregulation of arginine biosynthesis as well as alanine, aspartate, and glutamate metabolism. Then, an upregulation of beta-alanine metabolism occurred 2-days after BBBO. Finally, the comparative analysis of the results between 3-h and 1-week post-BBBO groups revealed the downregulation of galactose and pyrimidine metabolisms.

Blood Serum

Considering the blood serum samples of our four experimental groups, the two first components of the PCA explained 31.3% of the variance (Figure 5). On the score plot of this PCA, the blood serum metabolome profile shifts totally 3 h after BBBO compared to the control group. This metabolic profile undergoes another perturbation 2 days post-BBBO in comparison with the control group. Control and 1-week groups share the same metabolic profile. Supervised PLS-DA analyses showed three significant predictive models: control vs. 3-h post-BBBO group; 3-h post-BBBO group vs. 2-days post-BBBO group; 3-h post-BBBO group vs. 1-week post-BBBO group (Table 4). Univariate analysis of metabolite intensities in the blood serum allows determining of several significantly disrupt metabolites by the acoustically-mediated BBBO. Based on these significantly dysregulated metabolites, metabolic pathways analysis was performed and revealed that blood serum metabolome was the most disturbed biological matrices (Figure 7). The first perturbation of the blood serum metabolome was observed 3 h after BBBO in comparison with the control

group. Indeed, metabolisms of purine, pyrimidine, and histidine were significantly upregulated while alanine, aspartate, and glutamate, as well as D-glutamate/D-glutamine metabolism and arginine biosynthesis were downregulated. A second metabolic perturbation was noticed between 2 days post-BBBO and 3-h post-BBBO group. Indeed, glutathione, arginine and proline, alanine, aspartate, and glutamate metabolisms, as well as arginine biosynthesis and D-arginine and D-ornithine metabolism were upregulated, while metabolisms of pyrimidine, cysteine, and methionine along with pentose/glucuronate interconversion were downregulated. Finally, a comparative analysis of metabolic pathways between 3-h and 1-week post-BBBO groups revealed the downregulation of purine and pyrimidine metabolisms but also porphyrin metabolism, cysteine, and methionine metabolism. This comparison also highlighted the upregulation of glutathione, D-arginine and D-ornithine, glycine, serine and threonine, arginine and proline, alanine, aspartate and glutamate metabolisms, and biosynthesis of pantothenate and CoA.

Urine

Data on urine samples seem to be more heterogenous than other matrices. As shown in Figure 6, a shift of urine metabolic profile between 3-h post-BBBO group and a cluster constituted by control, 2-days, and 1-week groups was identified. By analyzing the three first components in the score plot of PCA (data not shown), these three experimental groups were always clustered together, suggesting that these groups would share the same metabolic profile. Supervised multivariate analyses showed only one significant predictive model: 3-h post-BBBO group vs. 1-week group (Table 5). However, univariate data analyses on the level of urine metabolites identified some disturbed metabolic pathways (Figure 7).

TABLE 6 | Concentrations of tryptophan derivatives in CSF samples using targeted HPLC-MS method.

Metabolites	Control	3-h	2-days	1-week	Significant
Quinolinic acid	0.021 ±0.008	0.023 ±0.007	0.017 ±0.006	0.015 ±0.005	n.s.
Serotonin	0.753 ±0.143	0.798 ±0.212	0.71 ±0.141	0.711 ±0.079	n.s.
Kynurenine	0.051 ±0.012	0.058 ±0.016	0.053 ±0.009	0.045 ±0.010	n.s.
Tryptophan	1.285 ±0.335	1.786 ±0.472	1.684 ±0.452	1.734 ±0.277	n.s.
5-hydroxyindoleacetic acid	0.499 ±0.104	0.535 ±0.071	0.739 ±0.147	0.593 ±0.122	*Control vs. 2-days *3-h vs. 2-days

Standard deviations are expressed as a mean value; n.s. means not significant for non-parametric pairwise multiple comparisons after Bonferroni p-value adjustment; * < 0.05; Groups showing significant differences are written (e.g., control vs 3-h). Concentrations are in micromolar (μM).

TABLE 7 | Concentrations of tryptophan derivatives in blood serum samples using targeted HPLC-MS method.

Metabolites	Control	3-h	2-days	1-week	Significant
Tryptophan	8.93 × 10 ² ±4.06 × 10 ²	1.18 × 10 ³ ±4.47 × 10 ²	1.05 × 10 ³ ±2.40 × 10 ²	9.30 × 10 ² ±2.52 × 10 ²	n.s.
Serotonin	5.77 ±2.84	6.82 ±1.98	7.19 ±1.81	6.73 ±2.67	n.s.
Kynurenine	6.10 ±2.28	6.91 ±2.64	5.77 ±2.32	4.91 ±1.15	n.s.
3-hydroxykynurenine	2.55 × 10 ⁻² ±1.91 × 10 ⁻²	3.45 × 10 ⁻² ±1.62 × 10 ⁻²	1.81 × 10 ⁻² ±8.01 × 10 ⁻³	1.66 × 10 ⁻² ±5.94 × 10 ⁻³	*3-h vs 1 week
Kynurenic acid	2.41 × 10 ⁻¹ ±1.16 × 10 ⁻¹	3.08 × 10 ⁻¹ ±1.33 × 10 ⁻¹	1.48 × 10 ⁻¹ ±4.04 × 10 ⁻²	1.76 × 10 ⁻¹ ±6.91 × 10 ⁻²	*3-h vs 2-days
Quinolinic acid	7.07 × 10 ⁻¹ ±3.30 × 10 ⁻¹	2.17 ±1.27	1.07 ±6.52 × 10 ⁻¹	7.65 × 10 ⁻¹ ±3.79 × 10 ⁻¹	*Control vs 3-h *3-h vs 1-week
Indole-3-lactic acid	5.57 × 10 ⁻¹ ±2.74 × 10 ⁻¹	8.17 × 10 ⁻¹ ±2.98 × 10 ⁻¹	4.28 × 10 ⁻¹ ±1.58 × 10 ⁻¹	4.65 × 10 ⁻¹ ±1.68 × 10 ⁻¹	*3-h vs 2-days *3-h vs 1-week
Indole-3-acetic acid	1.77 ±7.64 × 10 ⁻¹	9.71 × 10 ⁻¹ ±3.59 × 10 ⁻¹	1.49 ±5.20 × 10 ⁻¹	1.17 ±3.03 × 10 ⁻¹	*Control vs 3-h
5-hydroxyindoleacetic acid	2.14 × 10 ⁻¹ ±9.17 × 10 ⁻²	2.59 × 10 ⁻¹ ±8.29 × 10 ⁻²	1.99 × 10 ⁻¹ ±4.94 × 10 ⁻²	2.05 × 10 ⁻¹ ±5.57 × 10 ⁻²	n.s.

Standard deviations are specified under mean value; n.s. means not significant for non-parametric pairwise multiple comparisons after Bonferroni p-value adjustment; * < 0.05. Groups showing significant differences are writing (e.g., control vs. 3-h). Concentrations are in micromolar (μM).

An upregulation of starch and sucrose metabolism was only observed between control and 3-h post-BBBO groups. Finally, several metabolic pathways were dysregulated between 3 h and 1 week after acoustically-mediated BBBO. Thus, the upregulated ones were alanine, aspartate, glutamate metabolism, and pentose/glucuronate interconversions. In addition, tryptophan metabolism, ascorbate, and aldarate metabolism as well as taurine and hypotaurine metabolism were significantly downregulated.

Tryptophan Derivate Dosage Reveals Transient Changes in Biological Matrices

Tryptophan (TRP) is the precursor of biosynthesis pathways of serotonin (5-HT), kynurenine (KYN), and indole derivatives. TRP and its metabolites are strongly involved in the kynurenine

pathways (KP), which play a key role in the modulation of neurotransmission and neuroinflammation, thus influencing the physiology of the CNS (Cervenka et al., 2017). Taking it into consideration, TRP metabolism was explored in the three matrices including the striatum, CSF, and blood serum using HPLC-MS (Tables 6, 7). The analysis of TRP metabolism in the striatum showed that only the concentration of 5-HT decreased up to 2 days after BBBO (57.3 ± 14.6 nmol/g) and returned to normal level 1 week post-BBBO (63.9 ± 16.1 nmol/g). In addition, the 5-hydroxy indoleacetic acid (5-HIAA) is the single TRP metabolite in CSF whose the concentration significantly increased up to 2 days (0.739 ± 0.147 μM) after the BBBO, then returned to the control concentration (0.593 ± 0.122 μM) 1-week post-BBBO (Table 6). As expected, changes in TRP metabolism were more pronounced in the blood serum than in the other matrices (Table 7). In fact, 3-hydroxykynurenine

(3-HK) concentration significantly decreased between 3-h (34.5 ± 16.2 nM) and 1 week (16.6 ± 0.59 nM) after BBBO. In addition, quinolinic acid (QUIN) concentration was significantly enhanced between the control group (0.7 ± 0.33 μ M) and 3-h (2.17 ± 1.27 μ M) post-BBBO group, but its concentration significantly decreased 1 week after BBBO (0.76 ± 0.38 μ M) meaning the QUIN returns to its normal level 1 week post-BBBO in the blood serum. The dosage of TRP metabolite revealed an increasing trend in kynurenic acid (KYNA) level 3 h post-BBBO but then a significant decrease is observed between 3-h (0.31 ± 0.13 μ M) and 2-days (0.14 ± 0.4 μ M) after BBBO and finally a stabilization. Furthermore, a significant reduction in indole-3-acetic acid concentration was noticed between control (1.77 ± 0.76 μ M) and 3-h (0.97 ± 0.36 μ M) post-BBBO groups, while the indole-3-lactic acid concentration significantly decreased between 3-h (0.81 ± 0.3 μ M) and 2-days (0.43 ± 0.19 μ M) post-BBBO, then increased 1 week (0.46 ± 0.17 μ M) after BBBO. We have to highlight that these observed modifications return to normal levels within 1 week after the BBBO.

DISCUSSION

The present study aimed to unravel the metabolic events following BBBO using MB-assisted US by answering the following questions: (1) How can acoustically-mediated BBBO processes trigger a global metabolic perturbation in the brain tissue and body fluids, such as the cerebrospinal fluid, the blood, and urine following BBBO? (2) Can it induce neuroinflammation? and (3) Can it potentially lead to an impairment in the neurotransmission? To achieve these goals, we performed a well-established analytical workflow using ^1H NMR spectroscopy and HPLC-MS to assess metabolite levels and quantify tryptophan derivatives involved in inflammatory and neurotransmission processes after BBBO.

Metabolism of Central, Peri-Cerebral, and Peripheral Compartments

The effects of acoustically-mediated BBBO on brain metabolism were mainly investigated using fluorodeoxyglucose (^{18}F]FDG) PET/CT scan *via* the metabolism of intracerebral glucose (Yang et al., 2014; Horodyckid et al., 2017; Arif et al., 2020). Yang et al. (2014) described a reduction in ^{18}F]FDG uptake in sonicated brain tissues in rats immediately and 1 week after BBBO compared to rodents not exposed to US, suggesting a decrease in the metabolism of cerebral energy supply. In contrast to these findings, our metabolomic data did not show any significant change in glucose metabolism after BBBO, indicating alternative recruitment of energetic resources. Our findings are supported by Horodyckid et al. (2017) who reported an absence of significant change in glucose metabolism in NHP 14 days after BBBO.

Importantly, all these functional imaging studies only focused on energetic metabolism in the cerebral compartment. In the present study, the metabolic signature after acoustically-mediated BBBO is reported in the cerebral compartment, but also in the peripheral zones, which, to the best of our knowledge, has never been shown before. Based on PCA analyses (Figures 3–6) and

the identification of dysregulated metabolic pathways (Figure 7), metabolic perturbations are visible in both central and peripheral matrices. However, these changes in the metabolic signature of the brain, CSF, blood serum, and urine metabolomes show specific and sequential kinetics. Indeed, our multivariate data reveal that metabolic perturbations occur in the blood serum metabolome up to 2 days after BBBO with a peak at 3 h. In the CSF, the peak of metabolic dysregulation occurs 3 h post-BBBO. Metabolic perturbations in the brain metabolome and in the urine metabolome are more latent and the perturbation peak occurs 1 week post-BBBO. These data could be explained by the rapid CSF turnover. Indeed, the CSF is renewed around 12–13 times a day, which could rapidly wipe the metabolic perturbation (Simon and Iliff, 2016). In addition, the delayed response of brain tissue could be associated with the setup of compensatory mechanisms that could hide for a while the metabolic response (Hyllin et al., 2017). By analyzing metabolic pathways, data showed that arginine, proline, alanine, aspartate, and glutamate metabolisms are mainly and significantly disrupted in all matrices. All these metabolic pathways are interconnected with each other. It is known that alanine, aspartate, asparagine, glutamate, and glutamine are input metabolites for arginine-associated metabolic processes, i.e., urea cycle, tricarboxylic acid cycle, and nitrogen metabolism. Arginine plays a major role in the energetic cell supply and homeostasis by regulating nitrogen levels and immune processes (Tong and Barbul, 2004). This amino acid is also the immediate precursor of nitric oxide (NO) responsible for the vasodilation of blood vessels (Wiesinger, 2001). Indeed, Raymond et al. (2007) reported short-lived vasoconstriction of the blood vessel right after sonication. Thus, NO secretion could occur in response to BBBO vasomotor effects. In addition, several metabolic pathways, namely arginine and glutamate metabolism, involved in energetic metabolism were disrupted in the blood serum and CSF metabolomes immediately after the BBBO, but also in the brain metabolome, 1 week later. Despite BBB resealing, 1 h after US exposure (Supplementary Figure S1), this study evidences that metabolic pathways in the brain, blood serum, and urine metabolomes were durably modified more than a week after BBBO. Further exploration of time points greater than a week after BBBO is warranted to fully ascertain the time to complete recovery, i.e., a metabolome fingerprint similar to that in the physiological state. Altogether, these results indicate that acoustically-mediated BBBO induces significant metabolic changes, not only in the brain tissue but also in the CSF, blood serum, and urine. Based on these multi-compartment data that show more durable effects in comparison to the standard arsenal of readout modalities, this study warrants further application of this sensitive and powerful metabolomic readout in acoustically-mediated BBBO investigations.

By comparing the kinetic of blood serum metabolome perturbations and the number of dysregulated metabolisms within the brain, CSF, and urine metabolomes, the blood serum metabolome was shown to be the most impacted matrix after acoustically-mediated BBBO. These metabolic data are consistent with recent available literature evidencing the effects of MB-assisted US on endothelial cells, thus reporting MB-assisted US-induced bioeffects in the cerebrovascular system, mainly. Indeed, Sheikov et al. (2004) explored the

biophysical mechanisms involved in acoustically-mediated BBBO on brain endothelial cells using electron microscopy techniques and reported several cytoarchitectural changes including the disruption of TJs, the formations of intercellular cleft, and the fenestration on endothelial cells. In addition, exposure of the endothelial wall to acoustically-mediated mechanical stress might induce the secretion of pro-inflammatory agents and/or biologically active molecules by the endothelium or perivascular environment, thus leading to the degradation of TJ proteins and, ultimately, BBB alteration (Cucullo et al., 2003; Brown et al., 2016). Indeed, the metabolic changes observed in our study could be attributed to intra- and inter-cellular changes at the endothelial cell level that were induced by the MB-assisted US. In this, our data support the link between the biophysical effects reported in the available literature and the metabolic changes observed in our study.

Neuroinflammation

Using PET imaging and transcriptomics, previous preclinical studies described conflicting results regarding neuroinflammation processes induced by acoustically-mediated BBBO. Sinharay et al. (2019) observed an increase in the binding of [¹⁸F]DPA-714 (a biomarker of translocator protein involved in inflammatory processes) in sonicated brain regions compared to controls, regardless of the number of sonications (i.e., 1–6) and the duration after BBBO (i.e., 24 h or 10 days). Besides, transcriptomics studies of brain tissues showed overexpression of genes associated with cytokine biosynthesis, thus demonstrating that acoustically-mediated BBBO induces neuroinflammation. This inflammation may participate in the induction and/or maintenance of BBB permeability and the resulting metabolic changes (Kovacs et al., 2017; McMahon and Hynynen, 2017; McMahon et al., 2017, 2020).

To explore further tissue inflammation after acoustically-mediated BBBO, a previously described targeted metabolomic approach using HPLC-MS was applied (Lefevre et al., 2019; Alarcán et al., 2021). We dosed the TRP derivatives, especially metabolites from the KP cascade in the brain tissue, in the CSF, and in the blood serum. KP produces several neuroactive metabolites, which are synthesized following inflammatory events (Tanaka et al., 2021). In the CSF, QUIN is synthesized by microglia or infiltrated peripheral macrophages, while KYNA is produced by astrocytes. In the periphery, the major organ where the synthesis of kynurenines occur is the liver (Torok et al., 2020). 3-HK and 3-hydroxyanthranilic acid (3-HAA) are well known to induce oxidative stress and apoptosis (Cervenka et al., 2017). QUIN results in neurotoxicity by inducing excitotoxicity, free-radical formation, mitochondrial dysfunction, apoptosis or necrosis, and cytoskeletal destabilization (el-Defrawy et al., 1986). As neuroprotective compounds, picolinic acid (PIC) and KYNA inhibit excitotoxicity and modulate the immune response, respectively (Tanaka et al., 2021). TRP, 3-HK, and KYN can reach the CNS through the BBB, whereas QUIN and KYNA do not cross the BBB (Fukui et al., 1991). Our metabolomics results showed a significant increase in QUIN concentration in the blood serum metabolome 3 h after BBBO and a significant decrease in KYNA and 3-HK levels between 3-h and 2-days post-BBBO groups. These metabolic perturbations were only found

in the blood serum and not in other biological matrices (i.e., brain and CSF). These results could be ascribed (i) either to the production of these metabolites in the liver consecutively to an inflammatory injury or a classic endocrine response to stress, (ii) or to neuroinflammation and, therefore, a passage of the metabolites from the brain tissue to blood compartment through the opened BBB, or (iii) to a vascular inflammation caused by the mechanical action of oscillating MBs on the endothelial wall. This last explanation is supported by McMahon et al. (2017) who performed a transcriptomics analysis from 6 to 24 h after acoustically-mediated BBBO only on vascular endothelial cells after acoustically-mediated BBBO (McMahon and Hynynen, 2017). These authors showed significant overexpression of proinflammatory and antiapoptotic-associated genes, suggesting the initiation of vascular inflammation. This upregulation of gene expression implies the activation and/or repression of the genetic machinery, which requires the biosynthesis of metabolites, specifically nucleotides as reported in our metabolomics analysis. Indeed, this study pinpoints an upregulation of nucleotide metabolisms (i.e., purine and pyrimidine metabolisms) up to 3 h post-BBBO in the blood serum. These metabolisms return to a basal state 1 week post-BBBO. In addition, these transcriptomics data and our metabolomics results (Figure 7) are supported by Brown et al. (2016) who investigated the metabolic consequences of the exposure of an organ-on-a-chip model of the human neurovascular unit to a pro-inflammatory stimulus, defined as a cytokine cocktail. The exposure of this stimulus to the vascular compartment induced a significant increase in BBB permeability by disrupting TJs. Their metabolomics analysis revealed a significant perturbation in aspartate and asparagine, and glycine, serine, alanine, and threonine metabolisms, but also significant changes in valine, leucine, and isoleucine, tryptophan, tyrosine, and lysine metabolisms in both vascular and brain compartments. Besides, cytokine stimulus impacted the pyrimidine metabolism only in the vascular compartment. Their metabolic pathways analysis also revealed significant disruption of coenzyme A biosynthesis from pantothenate, and methionine and cysteine metabolism on the vascular side. Most of these disrupted metabolic pathways are also observed in our metabolomic data in central and peripheral metabolomes.

Altogether, these results suggest that the acoustically-mediated BBBO could induce vascular inflammation. In addition to the acoustically-mediated mechanical stress on the endothelial wall, this inflammation may contribute to the metabolic changes in the blood serum but also in other biological matrices. In our study, the absence of neuroinflammation may be explained by the lower acoustic regime applied, i.e., acoustic parameters, dose, and type of MBs, mainly, in comparison to those in previous preclinical studies (Kovacs et al., 2017; McMahon and Hynynen, 2017; McMahon et al., 2017; Sinharay et al., 2019). In our opinion, further metabolomic investigations exploring catecholaminergic derivatives, but also arachidonic acid derivatives (Wang et al., 2021) would provide key insights into the influence of the US regime and MB usage on inflammatory processes in the central (in the ipsilateral target and in its contralateral region) and peripheral compartments. These studies would provide highly detailed information on the transcriptomics profiles subsequent

to BBBO, as also initiated by McMahon and Hynynen (2017) and Kovacs et al. (2017, 2018) who clearly demonstrated that BBBO-induced inflammatory response is related to the dose of MBs; it was well-established that the bioeffects of the BBBO directly depend on BBBO regime and MB type and injection settings, such as infusion type and rate, i.e., bolus or slow injection, dose, and initial concentration. These results could be compared to complementary IHC studies using inflammation and BBB biomarkers.

Neurotransmission

To the best of our knowledge, the effects of acoustically-mediated BBBO on neurotransmission have never been investigated; this study explored these bioeffects by dosing 5-HT and its derivatives originating from the TRP metabolism by a targeted HPLC-MS approach (Lefevre et al., 2019; Alarcón et al., 2021). Indeed, the striatum is involved in dopaminergic, cholinergic, and GABAergic neurotransmissions. In addition, this functional region is widely innervated by the projections of serotonergic neurons from the dorsal raphe nucleus that are localized in the brain stem (Charnay and Leger, 2010; Nakamura, 2013). This nerve pathway is involved in the regulation of limbic processes such as behavior and mood, especially in stress response and stress-associated disorders (Wasselus et al., 2006). TRP dosage in the striatum showed a significant decrease in serotonin concentration between the control and 2 days post-BBBO groups. In addition, a significant increase in the concentration of main serotonin catabolite, i.e., 5-HIAA, was detected in the CSF between 3-h and 2 days post-BBBO groups, then its concentration decreased between 2-days and 1-week groups. Of note, no significant change of these 5-HT derivatives was found in the blood serum, suggesting that these variations only occur in the central compartment and are not due to peripheral gastrointestinal 5-HT metabolism (Stasi et al., 2019). These results demonstrated an upregulation of the serotonin catabolism in our experimental conditions, thus bringing the first evidence that acoustically-mediated BBBO could disrupt serotonergic neurotransmission. As previously described with regards to tissue inflammation, our study warrants a wider use of metabolomics to explore the influence of US- and MB-related parameters on serotonergic neurotransmission. These results could be confirmed by further PET/CT studies using radiotracers dedicated to the investigation of serotonergic neurotransmission (Buchecker et al., 2020; Colom et al., 2021). In the present study, only the serotonergic neurotransmission was investigated while the striatum is also involved in GABAergic and dopaminergic neurotransmission. Hence, additional metabolomics investigations are warranted to assess the potential effects of acoustically-mediated BBBO on these specific neurotransmission pathways, but also those operating in other brain regions.

CONCLUSION

In conclusion, our multimodal and multimatrix metabolomic investigations provided the first metabolic signature related to

the acoustically-mediated BBBO within the striatum tissue and its surrounding compartments. The stronger metabolic response to the acoustically-mediated BBBO was observed in the brain vascular compartment with especially the potential presence of vascular inflammation, but also metabolic modifications of serotonergic neurotransmission pathways in the striatum. These discrepancies in metabolic profiles in all biological matrices were present up to 1 week following BBBO, but no sign of discomfort could be observed. Nevertheless, further investigations are warranted to extensively evaluate the influence of the US and MB settings on brain metabolism and neurological processes such as neuroinflammation and neurotransmission.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found below: MetaboLights, accession number: MTBLS4423.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by the Animal Care and Regional Committee for Ethics in Animal Experiments, Centre Val-de-Loire (2018011016593068) in accordance with European Directive 2010/63/EU for animal experiments.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AP, J-ME, and LN-D designed the experiments and wrote the manuscript. AP, EO, and SB performed the *in vivo* experiments. AM, AP, and CD prepared the biological tissue and fluids for mass spectroscopy (MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. AL and CD took care of the development of MS targeted method and the MS acquisition of samples. TI provided the technical support. AP analyzed the metabolomic data. AB and PE reviewed the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

AP was the recipient of a Ph.D. fellowship from the President of Université de Tours. This work was funded by Inserm U1253, Université de Tours (J-ME and LN-D), and the Ligue Nationale Contre Le Cancer (J-ME, LN-D, and AP).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. Tartu (UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, Tours, France) and the “PST Animalerie” and “PST Analyses des Systèmes Biologiques” (Université de Tours, Tours,

France) for their technical support and Tronel, Serrière, Laumonnier, and Marrouillat (UMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, Tours, France) for fruitful discussions. We gratefully thank Derieppe (Utrecht, Netherlands) for his English proofreading.

REFERENCES

- Abbott, N. J., Patabendige, A. A., Dolman, D. E., Yusof, S. R., and Begley, D. J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.* 37, 13–25. doi: 10.1016/j.nbd.2009.07.030
- Alarcan, H., Chaumont, R., Emond, P., Benz-De Bretagne, I., Lefevre, A., Bakkouche, S. E., et al. (2021). Some CSF kynurenine pathway intermediates associated with disease evolution in amyotrophic lateral sclerosis. *Biomolecules* 11:691. doi: 10.3390/biom11050691
- Alonso, A., Reinz, E., Fatar, M., Hennerici, M. G., and Meairs, S. (2011). Clearance of albumin following ultrasound-induced blood-brain barrier opening is mediated by glial but not neuronal cells. *Brain Res.* 1411, 9–16. doi: 10.1016/j.brainres.2011.07.006
- Alshammari, T. M., Al-Hassan, A. A., Hadda, T. B., and Aljofan, M. (2015). Comparison of different serum sample extraction methods and their suitability for mass spectrometry analysis. *Saudi Pharm. J.* 23, 689–697. doi: 10.1016/j.sjps.2015.01.023
- Arif, W. M., Elsinga, P. H., Gasca-Salas, C., Versluis, M., Martinez-Fernandez, R., Dierckx, R., et al. (2020). Focused ultrasound for opening blood-brain barrier and drug delivery monitored with positron emission tomography. *J. Control Release* 324, 303–316. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.05.020
- Barar, J., Rafi, M. A., Pourseif, M. M., and Omid, Y. (2016). Blood-brain barrier transport machineries and targeted therapy of brain diseases. *Bioimpacts* 6, 225–248. doi: 10.15171/bi.2016.30
- Baseri, B., Choi, J. J., Tung, Y. S., and Konofagou, E. E. (2010). Multi-modality safety assessment of blood-brain barrier opening using focused ultrasound and definity microbubbles: a short-term study. *Ultrasound Med. Biol.* 36, 1445–1459. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2010.06.005
- Blasco, H., Corcia, P., Pradat, P. F., Bocca, C., Gordon, P. H., Veyrat-Durebex, C., et al. (2013). Metabolomics in cerebrospinal fluid of patients with amyotrophic lateral sclerosis: an untargeted approach via high-resolution mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 12, 3746–3754. doi: 10.1021/pr400376e
- Brown, J. A., Codreanu, S. G., Shi, M., Sherrrod, S. D., Markov, D. A., Neely, M. D., et al. (2016). Metabolic consequences of inflammatory disruption of the blood-brain barrier in an organ-on-chip model of the human neurovascular unit. *J. Neuroinflammation* 13:306. doi: 10.1186/s12974-016-0760-y
- Buchecker, V., Waldron, A. M., van Dijk, R. M., Koska, I., Brendel, M., von Ungern-Sternberg, B., et al. (2020). [(18)F]MPPF and [(18)F]FDG MuPET imaging in rats: impact of transport and restraint stress. *EJNMMI Res.* 10:112. doi: 10.1186/s13550-020-00693-3
- Bulat, M., and Klarica, M. (2011). Recent insights into a new hydrodynamics of the cerebrospinal fluid. *Brain Res. Rev.* 65, 99–112. doi: 10.1016/j.brainresrev.2010.08.002
- Cervenka, I., Agudelo, L. Z., and Ruas, J. L. (2017). Kynurenines: tryptophan's metabolites in exercise, inflammation, and mental health. *Science* 357:eaaf9794. doi: 10.1126/science.aaf9794
- Charnay, Y., and Leger, L. (2010). Brain serotonergic circuitries. *Dialogues Clin. Neurosci.* 12, 471–487. doi: 10.31887/DCNS.2010.12.4/ycharnay
- Colom, M., Vidal, B., Fieux, S., Redoute, J., Costes, N., Lavenne, F., et al. (2021). [(18)F]F13640, a 5-HT_{1A} receptor radiopharmaceutical sensitive to brain serotonin fluctuations. *Front. Neurosci.* 15:622423. doi: 10.3389/fnins.2021.622423
- Craig, A., Cloarec, O., Holmes, E., Nicholson, J. K., and Lindon, J. C. (2006). Scaling and normalization effects in NMR spectroscopic metabolomic data sets. *Anal. Chem.* 78, 2262–2267. doi: 10.1021/ac051931z
- Cucullo, L., Marchi, N., Marroni, M., Fazio, V., Namura, S., and Janigro, D. (2003). Blood-brain barrier damage induces release of Alpha2-macroglobulin. *Mol. Cell. Proteomics* 2, 234–241. doi: 10.1074/mcp.M200077-MCP200
- Daneman, R., and Prat, A. (2015). The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7:a020412. doi: 10.1101/cshperspect.a020412
- Dieme, B., Lefevre, A., Nadal-Desbarats, L., Galineau, L., Madji Hounoum, B., Montigny, F., et al. (2017). Workflow methodology for rat brain metabolome exploration using NMR, LC-MS and GC-MS analytical platforms. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 142, 270–278. doi: 10.1016/j.jpba.2017.03.068
- Dieme, B., Mavel, S., Blasco, H., Tripi, G., Bonnet-Brilhault, F., Malvy, J., et al. (2015). Metabolomics study of urine in autism spectrum disorders using a multiplatform analytical methodology. *J. Proteome Res.* 14, 5273–5282. doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00699
- Dupuy, C., Castelnau, P., Mavel, S., Lefevre, A., Nadal-Desbarats, L., Bodard, S., et al. (2021). SHR/NCRL rats as a model of ADHD can be discriminated from controls based on their brain, blood, or urine metabolomes. *Transl. Psychiatry* 11:235. doi: 10.1038/s41398-021-01344-4
- el-Defrawy, S. R., Boegman, R. J., Jhamandas, K., and Beninger, R. J. (1986). The neurotoxic actions of quinolinic acid in the central nervous system. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 64, 369–375. doi: 10.1139/y86-060
- Escoffre, J. M., Novell, A., de Smet, M., and Bouakaz, A. (2013). Focused ultrasound mediated drug delivery from temperature-sensitive liposomes: in vitro characterization and validation. *Phys. Med. Biol.* 58, 8135–8151. doi: 10.1088/0031-9155/58/22/8135
- Fukui, S., Schwarcz, R., Rapoport, S. I., Takada, Y., and Smith, Q. R. (1991). Blood-brain barrier transport of kynurenines: implications for brain synthesis and metabolism. *J. Neurochem.* 56, 2007–2017. doi: 10.1111/j.1471-4159.1991.tb03460.x
- Gaillard, A., and Jaber, M. (2011). Rewiring the brain with cell transplantation in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 34, 124–133. doi: 10.1016/j.tins.2011.01.003
- Gerstenmayer, M., Fellah, B., Magnin, R., Selingue, E., and Larrat, B. (2018). Acoustic transmission factor through the rat skull as a function of body mass, frequency and position. *Ultrasound Med. Biol.* 44, 2336–2344. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2018.06.005
- Grahn, J. A., Parkinson, J. A., and Owen, A. M. (2008). The cognitive functions of the caudate nucleus. *Prog. Neurobiol.* 86, 141–155. doi: 10.1016/j.pneurobio.2008.09.004
- Horodyckid, C., Canney, M., Vignot, A., Boisgard, R., Drier, A., Huberfeld, G., et al. (2017). Safe long-term repeated disruption of the blood-brain barrier using an implantable ultrasound device: a multiparametric study in a primate model. *J. Neurosurg.* 126, 1351–1361. doi: 10.3171/2016.3.JNS151635
- Hyllin, M. J., Kerr, A. L., and Holden, R. (2017). Understanding the mechanisms of recovery and/or compensation following injury. *Neural Plast.* 2017:7125057. doi: 10.1155/2017/7125057
- Ji, R., Karakatsani, M. E., Burgess, M., Smith, M., Murillo, M. F., and Konofagou, E. E. (2021). Cavitation modulated inflammatory response following focused ultrasound blood-brain barrier opening. *J. Control Release* 337, 458–471. doi: 10.1016/j.jconrel.2021.07.042
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y., and Morishima, K. (2017). Kegg: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* 45, D353–D361. doi: 10.1093/nar/gkw1092
- Kim, H., Park, M. A., Wang, S., Chiu, A., Fischer, K., and Yoo, S. S. (2013). PET/CT imaging evidence of FUS-mediated (18)F-FDG uptake changes in rat brain. *Med. Phys.* 40:033501. doi: 10.1118/1.4789916
- Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., et al. (2021). Pubchem in 2021: new data content and improved web interfaces. *Nucleic Acids Res.* 49, D1388–D1395. doi: 10.1093/nar/gkaa971
- Kovacs, Z. I., Burks, S. R., and Frank, J. A. (2018). Focused ultrasound with microbubbles induces sterile inflammatory response proportional to the blood brain barrier opening: attention to experimental conditions. *Theranostics* 8, 2245–2248. doi: 10.7150/thno.24181
- Kovacs, Z. I., Kim, S., Jikaria, N., Qureshi, F., Milo, B., Lewis, B. K., et al. (2017). Disrupting the blood-brain barrier by focused ultrasound induces sterile inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, E75–E84. doi: 10.1073/pnas.1614777114

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2022.888318/full#supplementary-material>

- Lefevre, A., Mavel, S., Nadal-Desbarats, L., Galineau, L., Attucci, S., Dufour, D., et al. (2019). Validation of a global quantitative analysis methodology of tryptophan metabolites in mice using LC-MS. *Talanta* 195, 593–598. doi: 10.1016/j.talanta.2018.11.094
- Lefort, G., Liaubet, L., Canlet, C., Tardivel, P., Pere, M. C., Quesnel, H., et al. (2019). ASICS: an R package for a whole analysis workflow of 1D 1H NMR spectra. *Bioinformatics* 35, 4356–4363. doi: 10.1093/bioinformatics/btz248
- Lex, A., Gehlenborg, N., Strobel, H., Vuilleumot, R., and Pfister, H. (2014). Upset: visualization of intersecting sets. *IEEE Trans. Vis. Comput. Graph.* 20, 1983–1992. doi: 10.1109/TVCG.2014.2346248
- Liu, H. L., Wai, Y. Y., Chen, W. S., Chen, J. C., Hsu, P. H., Wu, X. Y., et al. (2008). Hemorrhage detection during focused-ultrasound induced blood-brain-barrier opening by using susceptibility-weighted magnetic resonance imaging. *Ultrasound Med. Biol.* 34, 598–606. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2008.01.011
- Mainprize, T., Lipsman, N., Huang, Y., Meng, Y., Bethune, A., Ironside, S., et al. (2019). Blood-brain barrier opening in primary brain tumors with non-invasive MR-guided focused ultrasound: a clinical safety and feasibility study. *Sci. Rep.* 9:321. doi: 10.1038/s41598-018-36340-0
- McDannold, N., Vykhodtseva, N., Raymond, S., Jolesz, F. A., and Hynynen, K. (2005). MRI-guided targeted blood-brain barrier disruption with focused ultrasound: histological findings in rabbits. *Ultrasound Med. Biol.* 31, 1527–1537. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2005.07.010
- McMahon, D., and Hynynen, K. (2017). Acute inflammatory response following increased blood-brain barrier permeability induced by focused ultrasound is dependent on microbubble dose. *Theranostics* 7, 3989–4000. doi: 10.7150/thno.21630
- McMahon, D., Bendayan, R., and Hynynen, K. (2017). Acute effects of focused ultrasound-induced increases in blood-brain barrier permeability on rat microvascular transcriptome. *Sci. Rep.* 7:45657. doi: 10.1038/srep45657
- McMahon, D., Oakden, W., and Hynynen, K. (2020). Investigating the effects of dexamethasone on blood-brain barrier permeability and inflammatory response following focused ultrasound and microbubble exposure. *Theranostics* 10, 1604–1618. doi: 10.7150/thno.40908
- McMahon, D., Poon, C., and Hynynen, K. (2019). Evaluating the safety profile of focused ultrasound and microbubble-mediated treatments to increase blood-brain barrier permeability. *Expert Opin. Drug Deliv.* 16, 129–142. doi: 10.1080/17425247.2019.1567490
- Nakamura, K. (2013). The role of the dorsal raphe nucleus in reward-seeking behavior. *Front. Integr. Neurosci.* 7:60. doi: 10.3389/fnint.2013.00060
- Olumolade, O. O., Wang, S., Samiotaki, G., and Konofagou, E. E. (2016). Longitudinal motor and behavioral assessment of blood-brain barrier opening with transcranial focused ultrasound. *Ultrasound Med. Biol.* 42, 2270–2282. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2016.05.004
- Pardridge, W. M., Oldendorf, W. H., Cancilla, P., and Frank, H. J. (1986). Blood-brain barrier: interface between internal medicine and the brain. *Ann. Intern. Med.* 105, 82–95. doi: 10.7326/0003-4819-105-1-82
- Presset, A., Bonneau, C., Kazuyoshi, S., Nadal-Desbarats, L., Mitsuyoshi, T., Bouakaz, A., et al. (2020). Endothelial cells, first target of drug delivery using microbubble-assisted ultrasound. *Ultrasound Med. Biol.* 46, 1565–1583. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2020.03.013
- Psychogios, N., Hau, D. D., Peng, J., Guo, A. C., Mandal, R., Bouatra, S., et al. (2011). The human serum metabolome. *PLoS One* 6:e16957. doi: 10.1371/journal.pone.0016957
- Raymond, S. B., Skoch, J., Hynynen, K., and Backsai, B. J. (2007). Multiphoton imaging of Ultrasound/Optison mediated cerebrovascular effects in vivo. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 393–403. doi: 10.1038/sj.cbfm.9600336
- Schober, A. (2004). Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res.* 318, 215–224. doi: 10.1007/s00441-004-0938-y
- Segal, M. B. (2000). The choroid plexuses and the barriers between the blood and the cerebrospinal fluid. *Cell. Mol. Neurobiol.* 20, 183–196. doi: 10.1023/a:1007045605751
- Sheikov, N., McDannold, N., Jolesz, F., Zhang, Y. Z., Tam, K., and Hynynen, K. (2006). Brain arterioles show more active vesicular transport of blood-borne tracer molecules than capillaries and venules after focused ultrasound-evoked opening of the blood-brain barrier. *Ultrasound Med. Biol.* 32, 1399–1409. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2006.05.015
- Sheikov, N., McDannold, N., Sharma, S., and Hynynen, K. (2008). Effect of focused ultrasound applied with an ultrasound contrast agent on the tight junctional integrity of the brain microvascular endothelium. *Ultrasound Med. Biol.* 34, 1093–1104. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2007.12.015
- Sheikov, N., McDannold, N., Vykhodtseva, N., Jolesz, F., and Hynynen, K. (2004). Cellular mechanisms of the blood-brain barrier opening induced by ultrasound in presence of microbubbles. *Ultrasound Med. Biol.* 30, 979–989. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2004.04.010
- Simon, M. J., and Iliff, J. J. (2016). Regulation of cerebrospinal fluid (CSF) flow in neurodegenerative, neurovascular and neuroinflammatory disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1862, 442–451. doi: 10.1016/j.bbadis.2015.10.014
- Sinharay, S., Tu, T. W., Kovacs, Z. L., Schreiber-Stainthorpe, W., Sundby, M., Zhang, X., et al. (2019). In vivo imaging of sterile microglial activation in rat brain after disrupting the blood-brain barrier with pulsed focused ultrasound: [18f]DPA-714 PET study. *J. Neuroinflammation* 16:155. doi: 10.1186/s12974-019-1543-z
- Stasi, C., Sadalla, S., and Milani, S. (2019). The relationship between the serotonin metabolism, gut-microbiota and the gut-brain axis. *Curr. Drug Metab.* 20, 646–655. doi: 10.2174/1389200220666190725115503
- Tanaka, M., Toth, F., Polyak, H., Szabo, A., Mandi, Y., and Vecsei, L. (2021). Immune influencers in action: metabolites and enzymes of the tryptophan-kynurenine metabolic pathway. *Biomedicines* 9:734. doi: 10.3390/biomedicines9070734
- Thevenot, E. A., Roux, A., Xu, Y., Ezan, E., and Junot, C. (2015). Analysis of the human adult urinary metabolome variations with age, body mass index, and gender by implementing a comprehensive workflow for univariate and OPLS statistical analyses. *J. Proteome Res.* 14, 3322–3335. doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00354
- Tong, B. C., and Barbul, A. (2004). Cellular and physiological effects of arginine. *Mini Rev. Med. Chem.* 4, 823–832. doi: 10.2174/1389557043403305
- Torok, N., Tanaka, M., and Vecsei, L. (2020). Searching for peripheral biomarkers in neurodegenerative diseases: the tryptophan-kynurenine metabolic pathway. *Int. J. Mol. Sci.* 21:9338. doi: 10.3390/ijms21249338
- Tsai, H. C., Chen, W. S., Insera, C., Wei, K. C., and Liu, H. L. (2018). Safety evaluation of frequent application of microbubble-enhanced focused ultrasound blood-brain-barrier opening. *Sci. Rep.* 8:17720. doi: 10.1038/s41598-018-35677-w
- Wang, B., Wu, L., Chen, J., Dong, L., Chen, C., Wen, Z., et al. (2021). Metabolism pathways of arachidonic acids: mechanisms and potential therapeutic targets. *Signal Transduct. Target Ther.* 6:94. doi: 10.1038/s41392-020-00443-w
- Waselus, M., Galvez, J. P., Valentino, R. J., and Van Bockstaele, E. J. (2006). Differential projections of dorsal raphe nucleus neurons to the lateral septum and striatum. *J. Chem. Neuroanat.* 31, 233–242. doi: 10.1016/j.jchemneu.2006.01.007
- Wiesinger, H. (2001). Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Prog. Neurobiol.* 64, 365–391. doi: 10.1016/s0301-0082(00)00056-3
- Wishart, D. S., Feunang, Y. D., Marcu, A., Guo, A. C., Liang, K., Vazquez-Fresno, R., et al. (2018). HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res.* 46, D608–D617. doi: 10.1093/nar/gkx1089
- Yang, F. Y., Chang, W. Y., Chen, J. C., Lee, L. C., and Hung, Y. S. (2014). Quantitative assessment of cerebral glucose metabolic rates after blood-brain barrier disruption induced by focused ultrasound using FDG-MicroPET. *Neuroimage* 90, 93–98. doi: 10.1016/j.neuroimage.2013.12.033

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.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Presset, Bodard, Lefèvre, Millet, Onjagir, Dupuy, Iazourène, Bouakaz, Emond, Escoffre and Nadal-Desbarats. 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.

Ce travail a confirmé une nouvelle fois que le compartiment vasculaire était la principale cible de la sonoporation. En effet, les analyses métabolomiques montrent un nombre de voies métaboliques impactées supérieur aux autres compartiments qui ont été explorés (*i.e.*, tissu nerveux, LCS, urines). De plus, la cinétique des perturbations des métabolomes semble être séquentielle et les uns par rapport aux autres. En effet, le métabolome du sérum est immédiatement perturbé après la sonoporation, alors que le tissu nerveux, le LCS et les urines semblent répondre avec un délai. Ces résultats peuvent être expliqués par : (i) le rapide renouvellement du LCS (environ 12 à 13 fois par jour chez le rat), ce qui pourrait atténuer rapidement la perturbation observée après la sonoporation (Simon and Iliff, 2016) ; et (ii) et l'agression du SNC qui conduit à la mise en place de mécanismes de compensation qui peuvent transitoirement masquer la perturbation métabolique.

Le dosage des dérivés de la kynurénine a révélé une potentielle inflammation vasculaire transitoire. En effet, nos résultats montrent l'augmentation de la concentration en acide quinoléique dans le sérum, ainsi qu'une diminution de la concentration d'acide kynurénique. La balance entre ces deux métabolites pourrait être le témoin de l'apparition et/ou de la résolution d'une inflammation (Tanaka *et al.*, 2021). De plus, nous observons une perturbation transitoire de la neurotransmission sérotoninergique reflétée par une diminution de la concentration de sérotonine dans le striatum et l'augmentation de la concentration de ses catabolites dans le LCS. Le striatum est le siège d'un important nombre de neurotransmissions (*e.g.*, dopaminergique, cholinergique, et GABAergique). Cette structure fonctionnelle est innervée par les noyaux raphés dorsaux, et est impliquée dans plusieurs processus limbiques, notamment dans la gestion de l'humeur et dans la réponse au stress (Waselus *et al.*, 2006; Charnay and Leger, 2010; Nakamura, 2013). L'inférence des voies métaboliques révèle que le métabolisme de l'arginine, ainsi que ses métabolismes associés, auraient un rôle dans la réponse métabolique à la sonoporation. En effet, l'arginine est impliquée dans la réduction des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, dans le métabolisme énergétique, dans la vasotonie et dans l'immunité (Morris, 2007). De plus, nos résultats montrent l'activation des métabolismes liés aux pyrimidines et aux purines. Ces métabolismes sont impliqués dans les processus génétiques (*e.g.*, transcription et réplication). Les travaux sur les conséquences de l'ouverture de la BHE ont montré la surexpression des gènes liés à l'inflammation, à l'immunité et à l'angiogenèse (McMahon and Hynynen, 2017; McMahon *et al.*, 2017, 2018, 2019). De plus, les travaux de Raymond *et al.*, ont révélé l'apparition de vasospasmes après la sonoporation, correspondant à une vasoconstriction suivie d'une vasodilatation, ce qui suggérerait une réponse des vaisseaux sanguins par la sécrétion d'oxyde nitrique pour induire une vasodilatation (Raymond *et al.*, 2007).

Pour la première fois, nos travaux montrent les conséquences métaboliques au sein de 4 matrices biologiques de la sonoporation sur le tissu cérébral. Ces résultats mettent en relief l'interconnexion existante entre les compartiments biologiques, et met en exergue l'importance d'une exploration intégrative des métabolomes pour la caractérisation d'un phénotype. De plus, nous avons avancé des éléments concrets suggérant la présence d'une inflammation vasculaire transitoire, alors que les études transcriptomiques montrent une neuroinflammation stérile après la procédure. Enfin, nos résultats montrent que les perturbations rencontrées dans les métabolomes reviennent à un état basal au moins 1 semaine après la sonoporation.

2. Résultats complémentaires : exploration métabolique des striata controlatéraux

Lors de la dissection des cerveaux après la perméabilisation de la BHE, les striata ipsilatéraux et controlatéraux ont été collectés. Les résultats des analyses menées sur les striata ipsilatéraux sont présentés dans l'article ci-dessus. Le *workflow* de l'exploration des conséquences métaboliques de la sonoporation a été également appliqué sur les striata controlatéraux. Les échantillons ont été analysés en HPLC-MS et en RMN, et les dérivés du tryptophane ont été dosés.

Les analyses en PCA montrent une homogénéité des profils métabolomiques entre les groupes expérimentaux (Figure 61). Les centres d'inertie des ellipses formées par les échantillons des groupes expérimentaux, semblent se regrouper au centre du repère témoignant de profils métaboliques identiques.

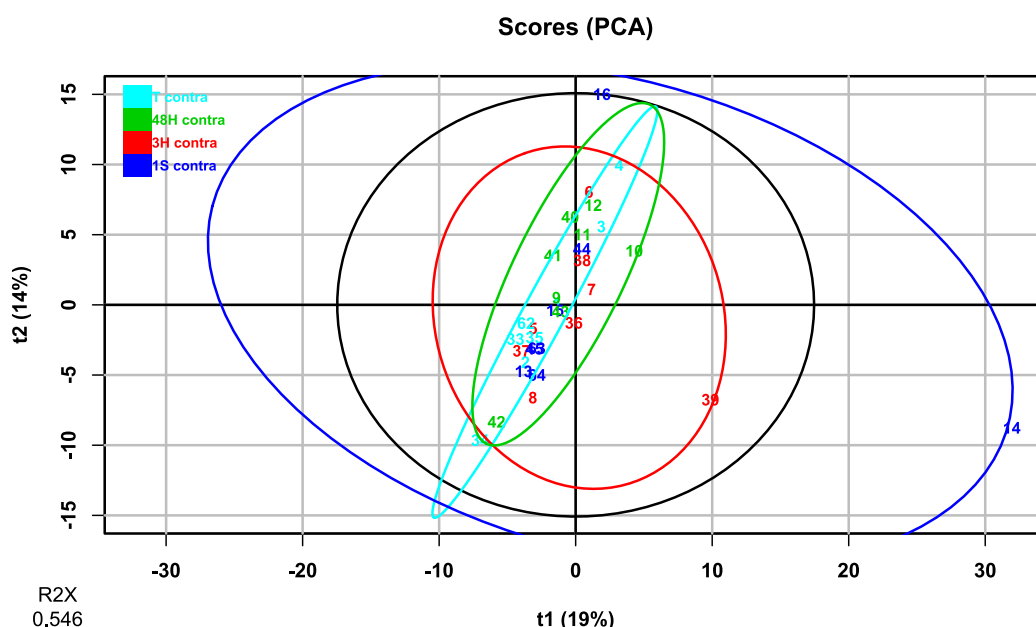


Figure 61 : Analyse en composantes principales des métabolites identifiés dans les striata controlatéraux après ouverture de la BHE par sonoporation.

De même, les analyses multivariées supervisées (PLS-DA) ont été réalisées sur les données métaboliques issues des striata controlatéraux (Tableau 19). Les résultats de ces analyses ne permettent pas d'établir des modèles prédictifs (échec aux tests de permutations). Ces résultats confirment le fait que les échantillons présentent des profils métaboliques semblables.

Tableau 19 : Récapitulatif des métriques et des valeurs de significativité provenant des analyses discriminantes de la régression des moindres carrés partiels (PLS-DA) établies à partir des métabolites retrouvés dans les striata controlatéraux.

Comparaisons	R2X(cum)	R2Y(cum)	Q2(cum)	pR2Y	pQ2	VIP
T vs 3H	0,364	0,982	0,48	0,10	0,10	91
3H vs 48H	0,415	0,985	0,782	0,15	0,05	106
48H vs 1S	0,416	0,974	0,371	0,30	0,40	106
1S vs T	0,382	0,963	0,26	0,65	0,60	107
T vs 48H	0,384	0,981	0,479	0,30	0,25	102
3H vs 1S	0,372	0,981	0,169	0,15	0,55	69

Malgré l'homogénéité des profils métaboliques constatée par les analyses multivariées, les statistiques univariées mettent en évidence la variation significative des intensités de 24 métabolites, notamment de la dopamine dont le niveau est significativement augmenté entre 48 h et 1 semaine après la sonoporation (Annexe 14). Les analyses de voies métaboliques à partir de ces métabolites révèlent la perturbation de la **biosynthèse de la valine, de la leucine et de l'isoleucine** ; du **métabolisme de la glycine, de la sérine et de la thréonine** ; et de la **dégradation de la lysine** (Figure 62).

Les métabolismes de la glycine, de la sérine et de la thréonine, et biosynthèse de la valine, de la leucine et de l'isoleucine sont surrégulés entre les groupes contrôle et 3 h après la sonoporation. Les voies métaboliques de la glycine, de la sérine et de la thréonine reviennent à leur état basal 48 h après la sonoporation comme le montre leur sous-régulation entre les groupes 3 h et 48 h après la sonoporation. Enfin, la voie de dégradation de la lysine est sous-régulée entre les groupes 3 h et 48 h post sonoporation.

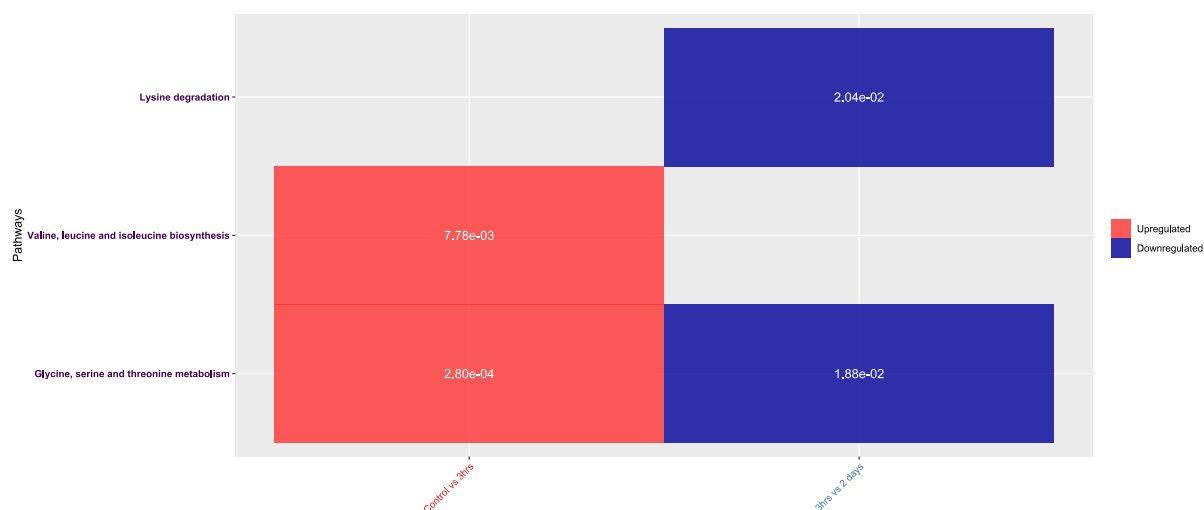


Figure 62 : Voies dérégulées établies à partir des intensités des métabolites significativement différents entre les groupes expérimentaux dans le. La classe des voies métaboliques perturbées sont celles du métabolisme des acides aminés.

Le dosage des dérivés du tryptophane ne montre pas de différences significatives au sein des métabolites détectés entre les différents groupes expérimentaux.

La comparaison entre le métabolome des striata controlatéraux des animaux ayant subi la sonoporation et celui des animaux contrôles (*i.e.*, sans exposition aux ultrasons) a révélé des voies métaboliques perturbées. En effet, les résultats de l'analyse des voies dérégulées comparés aux animaux contrôles mettent en lumière la perturbation du métabolome à partir de 3 h. Ces données montrent l'importance d'avoir un contrôle dit « sham » et de ne pas comparer deux hémisphères entre eux.

3. Synthèse

Notre approche métabolomique a consisté à déterminer les variations du niveau des métabolites dans 4 matrices biologiques (striata contro- et ipsi- latéraux, LCS, sérum et urine) 3 h, 48 h et 1 semaine après la perméabilisation de la BHE par sonoporation. Pour atteindre cet objectif, nous avons mis en œuvre des méthodes analytiques basées sur l'utilisation de la spectrométrie de masse couplée à la

chromatographie liquide, et la spectroscopie par RMN. De plus, une méthode mise au point par notre équipe, permettant de doser les dérivés du tryptophane, a été mise à profit pour explorer la neurotransmission sérotoninergique et la voie des kynurénines (*i.e.*, inflammation).

Brièvement, les résultats montrent une **perturbation générale** du métabolisme **central** et **périphérique**. Le sérum est la principale matrice perturbée par la sonoporation (en termes de nombre de voies métaboliques perturbées et au cours du temps). Les autres matrices présentent des perturbations de **manière séquentielle** au cours du temps. D'un point de vue global, le métabolisme de **l'arginine** et de **ceux qui lui sont associés** sont les principaux métabolismes **au centre des perturbations** causées par la sonoporation : **biosynthèse de l'arginine ; métabolisme de l'arginine et de l'ornithine ; métabolisme de l'arginine et de la proline ; métabolisme de l'alanine, de l'aspartate et du glutamate ; et métabolisme de la glutamine et du glutamate.**

De plus, les résultats de l'analyse métabolomique des striata controlatéraux montrent une légère perturbation des voies métaboliques, indiquant qu'un **phénomène de compensation** pourrait se mettre en place. Ces perturbations interviennent dans le métabolisme de la **glycine, de la sérine et de la thréonine**, dans la **biosynthèse de la valine, de la leucine et de l'isoleucine** et dans la **dégradation de la lysine**.

L'ensemble de nos résultats ne montrent pas de perturbations directes du métabolisme des glucides, et plus particulièrement de la glycolyse, comme décrit par Yang *et al.* En effet, ces auteurs ont réalisé une étude d'imagerie fonctionnelle PET au [¹⁸F] FDG chez le rat (Yang *et al.*, 2014). Ils ont montré une diminution de l'absorption de glucose après la sonoporation dans l'hémisphère cérébral droit. Cette diminution a été associée à la sous-expression du récepteur GLUT1 responsable du transport du glucose du compartiment sanguin vers le compartiment cérébral. *A contrario*, Horodyckid *et al.*, n'ont pas observé de changements significatifs dans l'absorption du [¹⁸F] FDG dans le cortex moteur des PNH (Horodyckid *et al.*, 2017). Ces études d'imagerie TEP constituent les seules données disponibles sur les conséquences métaboliques de la perméabilisation de la BHE.

Face à ce manque de données, nous allons ici aborder les principaux métabolismes utilisés par les trois principaux types cellulaires de l'unité neurovasculaire. Ensuite, nous tenterons de mettre en parallèle les résultats de notre étude avec les connaissances acquises sur les principaux métabolismes de ces cellules.

Pour rappel, l'unité neurovasculaire est composée des neurones, des cellules gliales (astrocytes, microglie) et des cellules endothéliales. Elle maintient l'intégrité de la BHE et régule le flux sanguin pour l'approvisionnement des neurones en nutriments. Il est important de comprendre que le fait d'avoir réalisé les analyses métabolomiques sur le tissu entier nous oblige à interpréter la dérégulation du métabolisme de l'ensemble des types cellulaires de l'unité neurovasculaire.

a) Neurotransmissions du striatum

Dans ce travail, le striatum est la zone cérébrale fonctionnelle visée par la sonoporation. Cette zone est la structure d'entrée des fibres nerveuses vers les ganglions de la base, qui régissent les

fonctions motrices et cognitives. Ces afférences excitatrices (*i.e.*, glutamatergiques) proviennent principalement des neurones corticaux et thalamiques. De même, une dense innervation dopaminergique provient du mésencéphale ventral (substances noires). La population neuronale majoritaire dans cette structure est constituée des neurones de projections (neurones épineux de taille moyenne – MSNs) et des interneurons de type GABAergique. Il existe également une petite population d'interneurones cholinergiques (utilisant l'acétylcholine comme neurotransmetteur). Les MSNs sont séparés en deux populations, en fonction des récepteurs présents à leur surface. Nous distinguons les neurones MSNs exprimant les récepteurs dopaminergiques de type D1 et les récepteurs muscariniques de type M4 ; et les neurones MSNs exprimant les récepteurs dopaminergiques de type D2 et les récepteurs à l'adénosine A2A.

Rappelons que l'acide gamma-aminobutyrique (GABA), le principal neurotransmetteur inhibiteur, est un dérivé du glutamate, un des principaux neurotransmetteurs excitateurs du SNC (Figure 63). La principale source de glutamate est la glutamine, qui par désamination oxydative, donne le glutamate. La transamination de l'acide α -cétooglutarique provenant du cycle de Krebs (ou cycle des acides tricarboxyliques) peut également produire du glutamate à partir de l'alanine. Le glutamate est toxique pour les neurones et ne franchit pas la BHE. Il est rapidement capté par les astrocytes qui vont le métaboliser en glutamine et, par cette même réaction métabolique, réduire la quantité d'ammoniac dans le SNC. Il est à noter que contrairement au glutamate, la glutamine franchit la BHE et constitue une molécule de transport des groupements amines.

La synthèse du GABA fait intervenir la décarboxylation du glutamate par la glutamate décarboxylase en présence de phosphate de pyridoxal (dérivé de la vitamine B₆). Le GABA est catabolisé en acide semialdéhyde succinique puis en acide succinique, qui va rejoindre le cycle de Krebs (processus neurobiologique du GABA *shunt*). Il existe donc une boucle métabolique entre le glutamate et le GABA constituant un équilibre entre ces deux neurotransmetteurs (Patel *et al.*, 2005; Andersen *et al.*, 2021). Ces deux neurotransmetteurs sont également des métabolites du métabolisme général des neurones, notamment au niveau de la synapse.

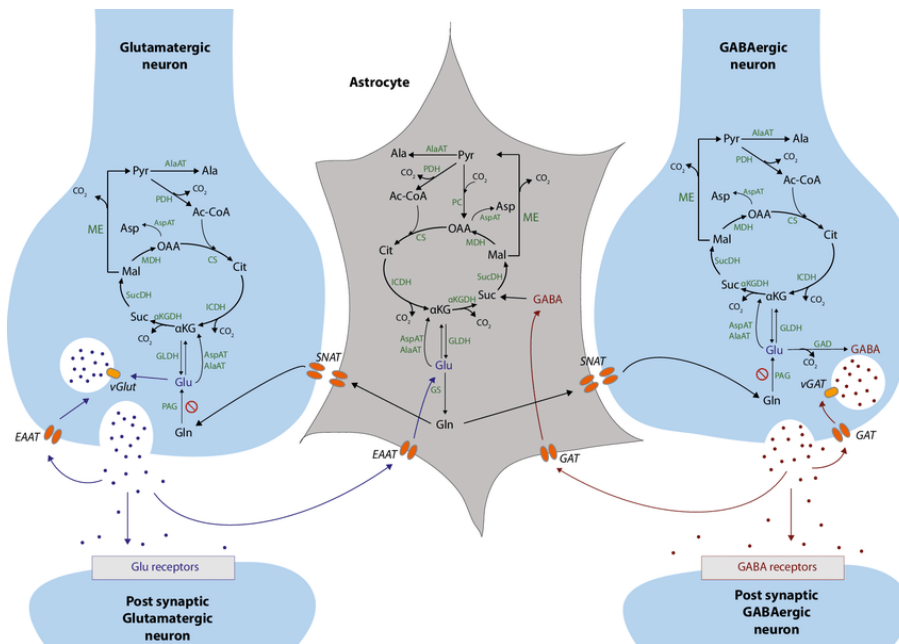


Figure 63 : Métabolisation après la recapture des neurotransmetteurs excitateurs (glutamate) et inhibiteurs (GABA). D'après (Kosten *et al.*, 2019).

b) Métabolismes des composants de l'unité neurovasculaire

(1) Neurones

Les neurones dans le SNC utilisent principalement le glucose et le métabolisme oxydatif organotrophe pour satisfaire leurs besoins métaboliques. Le cerveau constitue par ailleurs l'organe le plus consommateur de glucose chez les mammifères (Howarth *et al.*, 2012; Mergenthaler *et al.*, 2013). Lorsque le glucose est phosphorylé par l'hexokinase pour rentrer dans les voies métaboliques, le glucose-6-phosphate (G6P) peut suivre deux voies métaboliques : la glycolyse, ou bien la voie des pentoses phosphates. La **glycolyse** produit du pyruvate. En condition aérobie, le pyruvate est décarboxylé en acétyl-CoA pour être intégré dans le cycle des acides tricarboxyliques. À l'inverse, en condition anaérobie, le pyruvate est déshydrogéné en lactate. Dans les deux cas, de l'ATP est produit grâce aux cofacteurs qui sont réduits par la chaîne respiratoire. Cependant, l'intégration de l'acétyl-CoA dans le cycle de Krebs produit beaucoup d'ATP comparée à la fermentation lactique (jusqu'à 18 fois plus). Cette différence est explicable tout le long du cycle de Krebs par la régénération d'un plus grand nombre de cofacteurs NADH et FADH₂ qui alimente la chaîne respiratoire pour la synthèse d'ATP. La **voie des pentoses phosphates** est principalement utilisée par les neurones pour la synthèse du cofacteur NADPH et du ribose-5-phosphate, qui garantissent respectivement l'équilibre redox (avec le métabolisme du glutathion) et la synthèse des nucléotides.

Il a été montré que les neurones utilisaient le lactate comme substrat énergétique. L'apport du lactate résulte de la coopération entre les neurones et les astrocytes (Figure 64A). Il existe une balance métabolique dans les neurones entre le pyruvate et le lactate. En effet, lors de l'activation neuronale et en fonction de la **disponibilité immédiate** du glucose et de la **pression partielle en O₂**, le métabolisme du neurone bascule de la phosphorylation oxydative à partir du lactate (dans la phase précoce d'une

demande métabolique) vers la phosphorylation oxydative issue de la glycolyse et du cycle de Krebs (dans la phase tardive).

Le métabolisme énergétique des cellules utilisant le lactate comme substrat énergétique, suit les mêmes étapes glycolytiques des cellules utilisant le glucose comme substrat énergétique (Rabinowitz and Enerbäck, 2020). À l'inverse, le flux de la réaction catalysée par la lactate déshydrogénase est inversé, oxydant le lactate en pyruvate, avec la réduction du NAD^+ en NADH , qui alors est transporté dans la mitochondrie par la navette glycérol-3-phosphate (Figure 64).

(2) Astrocytes

Les astrocytes fournissent un soutien métabolique aux neurones. Leur métabolisme est principalement glycolytique pour produire le lactate dont les neurones ont besoin. En effet, l'activation de la neurotransmission (notamment celle du glutamate) stimule la production de lactate et son transfert *via* la navette neurones-astrocytes du lactate. Le lactate est capté par les transporteurs MCT, puis est converti en pyruvate par la lactate déshydrogénase 1. Ce pyruvate intègre le cycle de Krebs pour régénérer les cofacteurs, qui vont être introduits dans la chaîne respiratoire pour produire de l'ATP.

L'ATP produit par les phases successives de la glycolyse est utilisé par les astrocytes pour faire fonctionner ses pompes ioniques et ses transporteurs actifs. Les astrocytes sont des acteurs clés dans l'approvisionnement du lactate (à travers la navette lactate – MCT1 ou MCT4) et dans le recyclage des neurotransmetteurs (glutamate, GABA). En effet, ces métabolites seront intégrés dans le cycle de Krebs, ou dans le métabolisme du glutathion. Les astrocytes contiennent également des réserves de glycogène, qui sont mobilisées en cas d'urgences (*i.e.*, hypoglycémie, forte demande métabolique, *etc.*).

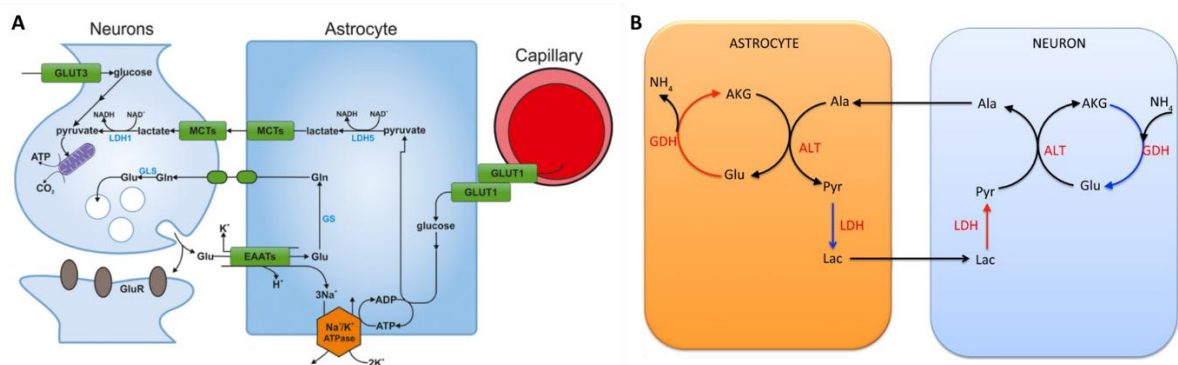


Figure 64 : Coopération métabolique entre les astrocytes et les neurones. En A, description synthétique du métabolisme au niveau d'une synapse glutamatergique et de la formation du lactate par la glycolyse. En B, schéma du cycle lactate-alanine partagé entre les neurones et les astrocytes pour la régénération du pyruvate. Adapté d'après (Somersalo and Calvetti, 2013; Falkowska *et al.*, 2015)

(a) Réponse au stress oxydatif et hypoxique

Le métabolisme oxydatif particulier des neurones, qui pourrait être comparé à un dérivé de l'effet Warburg (*i.e.*, utilisation de glucose pour former du lactate au lieu de suivre la voie physiologique du cycle de Krebs, puis de la phosphorylation oxydative) est susceptible de produire des espèces réactives

de l'oxygène (ERO). Les neurones sont très peu armés face au stress oxydatif, à l'opposé des astrocytes qui possèdent tous les anti-oxydants et les enzymes réductrices des ERO, comprenant le glutathion, l'hème oxygénase 1 (HO-1), la glutathion peroxydase, la glutathion-S-transférase, la catalase et la thioredoxine réductase. Cet arsenal astrocytaire suggère que les neurones, peu résistants au stress oxydatif, sont dépendants des astrocytes pour gérer ce type d'agression. Les métabolismes du glutathion et de la cystéine sont principalement présents dans les astrocytes. Par conséquent, il existe un système de transporteur du glutathion (*i.e.*, par l'intermédiaire du EEAC1), afin que les neurones synthétisent les molécules antioxydantes. La défense contre les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ERA) et le métabolisme énergétique sont étroitement liés. En effet, le traitement des ERO et des ERA met en jeu des réactions d'oxydo-réduction (redox), nécessitant des groupements donneurs et accepteurs d'électrons (*i.e.*, NADPH, NADH, FAD, *etc.*). L'une des voies métaboliques responsables de la synthèse des cofacteurs des réactions redox est la voie des pentoses phosphates. Le glutathion est un tripeptide formé par la condensation de l'acide glutamique, de la cystéine et de la glycine pour former le γ -L-Glutamyl-L-cystéinyglycine. La synthèse du glutathion sollicite donc les métabolismes de la glycine et de la cystéine. Son pouvoir réducteur lui permet de réduire une molécule oxydante en une molécule inoffensive pour les neurones, tout en formant un dimère de glutathion qui sera par la suite régénéré en glutathion. Un autre système basé sur l'acide ascorbique permet une réponse au stress oxydatif neuronal. L'acide ascorbique relargué par les astrocytes permet aux neurones de réduire les peroxydes ou les peroxy-nitrites. L'acide ascorbique est ensuite recapté par les astrocytes pour être réduit et rejouer son rôle de protection.

(b) Régulation du flux sanguin en réponse à la demande métabolique

L'astrocyte est également un médiateur dans la régulation du flux sanguin pour le bon fonctionnement de la transmission nerveuse. En effet, les récepteurs métabotropiques présents à la surface de ces cellules sont capables de transmettre le signal pour permettre la vasomotricité des vaisseaux avoisinants (Harder *et al.*, 2002; Bélanger *et al.*, 2011). En effet, l'augmentation du calcium intra-astrocytaire active la phospholipase A2 (PLA₂) qui produit l'acide arachidonique (AA). L'AA produit plusieurs molécules vasoactives : (i) des métabolites vasodilatateurs, la prostaglandine E₂ (PGE₂) produite par les cyclo-oxygénases, et l'acide époxyeicosatriénoïque produit par le cytochrome P450 ; et (ii) des métabolites vasoconstricteurs par l'intermédiaire du passage de l'AA dans les cellules musculaires lisses vasculaires où il est métabolisé en acide 20-hydroxyeicosatétraénoïque (20-HETE) par la ω -hydroxylase.

Une diminution de la concentration en O₂ provoque une vasodilatation, d'une part *via* l'action du lactate empêchant la recapture de la PGE₂, responsable de la vasodilatation ; et d'autre part *via* l'inhibition de l'action du 20-HETE par l'adénosine, responsable de la vasoconstriction.

En cas d'absence de glucose ou d'O₂, les neurones ont la possibilité d'utiliser des sources alternatives de substrats énergétiques, notamment celui du métabolisme des corps cétoniques. Cette source alternative est régulée par la concentration sanguine de ses métabolites (3-hydroxybutyrate, acétoacétate et acétone) et la quantité des transporteurs MCT à la surface des cellules de la BHE. Les

corps cétoniques sont métabolisés en glutamine et en glutamate, ou directement métabolisés en acétyl-CoA pour être intégrés au cycle de Krebs.

(3) Cellules endothéliales

À l'instar des neurones, les cellules endothéliales vasculaires utilisent la glycolyse pour préférentiellement produire du lactate et minimiser leur production d'ATP. Une faible quantité de glucose est métabolisée en pyruvate, qui suivra le cycle de Krebs pour activer la phosphorylation oxydative. La cellule endothéliale est capable de *shunter* certains métabolites intermédiaires de la voie de la glycolyse (*i.e.*, le glucose-6-phosphate et le fructose-6-phosphate) pour intégrer la **voie des pentoses phosphates** et la **voie de biosynthèse des hexosamines**. Ces deux voies métaboliques sont impliquées : pour la première, dans l'anabolisme des nucléotides, dans la biosynthèse des acides nucléiques et dans la production du cofacteur NADPH utilisé par les enzymes et les métabolites responsables de la détoxification des radicaux libres oxydatifs ; et pour la deuxième, dans la production de la UDP-N-acétylglucosamine, qui est la seconde forme nucléotidique la plus abondante dans l'organisme après l'ATP, et qui est responsable de la O- et N-glycosylation des protéines. Le lactate produit par les cellules endothéliales permet également d'alimenter les péricytes (Lee *et al.*, 2022).

D'autres voies attenantes à la glycolyse sont utilisées par la cellule endothéliale. Il s'agit de la **voie des polyols** et la **voie uronique et glucuronique** qui sont étroitement liées à la voie des pentoses phosphates. La première voie est responsable de la production de sorbitol, de fructose et de 3-désoxyglucosone. Le fructose produit dans cette voie est introduit dans la voie des hexosamines. La deuxième voie est responsable de la production de l'UDP-glucose, précurseur de l'acide UDP-glucuronique. Ce métabolite est ensuite converti en acide uronique, en xylitol, en xylulose-5-phosphate et finalement en ribose-5-phosphate, pour reprendre la voie des pentoses phosphates. De plus, l'acide UDP-glucuronique est responsable du **processus de détoxification par glucuronidation** des composés thérapeutiques, xénobiotiques et endogènes, comme les acides gras, la bilirubine, les acides biliaires et les hormones stéroïdiennes. Ce processus est largement présent dans les cellules endothéliales vasculaires cérébrales.

Les cellules endothéliales mettent également en œuvre plusieurs métabolismes associés aux acides aminés, comme ceux du glutamate, de la glutamine et de l'alanine, et celui de l'arginine et du cycle de l'urée.

Le **métabolisme du glutamate et de la glutamine** intervient dans le métabolisme énergétique à travers la production de pyruvate, à partir d'alanine et d'acide α -cétoglutarique, qui intègre alors le cycle des acides tricarboxyliques après sa décarboxylation en acétyl-CoA (Figure 64A et B). Ce métabolisme est également impliqué dans la biosynthèse des nucléotides puriques et pyrimidiques par l'intermédiaire du transfert du groupement amine (NH_2) sur la 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate pour donner le 5-phosphoribosyl-1-amine. La glutamine est utilisée pour produire du glucosamine-6-phosphate à partir du fructose-6-phosphate et du groupement amine de la glutamine, qui intégrera la voie des hexosamines. Finalement, le glutamate est converti en GABA, qui aurait un rôle dans la régulation de l'oxydation des acides gras, dans la protection contre les ERO et les ERA, et dans la

réduction de la pression sanguine (DiMicco *et al.*, 1987; Panov *et al.*, 2014; Choe *et al.*, 2021). De plus, le GABA aurait des propriétés anti-inflammatoires (Crowley *et al.*, 2016).

L'arginine est un acide aminé polyvalent qui intervient dans beaucoup de processus biologiques (Figure 65). Il est métaboliquement inter-convertible avec la proline et le glutamate. À travers son métabolisme et ceux qui lui sont associés, il intervient dans la **synthèse des protéines**, dans la synthèse de l'**oxyde nitrique** (NO), dans la synthèse de la **créatine**, dans la **voie de synthèse des polyamines** (intervenant dans la prolifération, la croissance et la différenciation cellulaire) et dans la détoxification des molécules azotées grâce au **cycle de l'urée** (Morris, 2007). Dans les cellules endothéliales, l'arginine est le substrat de l'arginase, qui la métabolise pour l'utiliser dans le cycle de l'urée et la voie des polyamines, ainsi que pour la production de la proline ou de glutamate à partir de l'ornithine. L'arginine est catabolisée par l'oxyde nitrique synthase (NOS) pour former le NO et la citrulline. Cette enzyme est dépendante des cofacteurs NADPH, FMN, FAD ou de la tetrahydrobioptérine. La synthèse de NO est régulée par la concentration intracellulaire en glutamine, en glucosamine, en ornithine, en lysine, en homoarginine, en leucine, en glutamine, et en sérine. L'arginine a également un rôle dans la **différentiation de la réponse M1 ou M2 des macrophages** (Martí i Líndez and Reith, 2021).

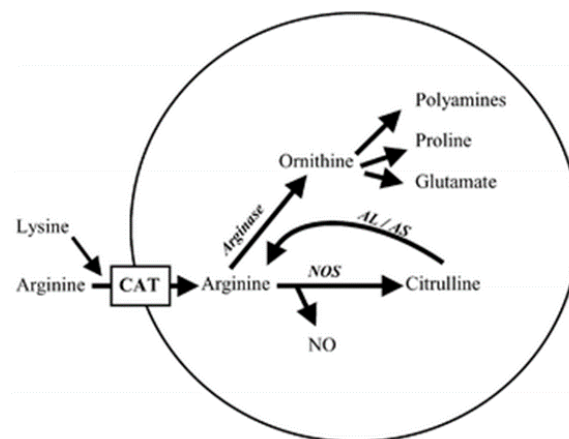


Figure 65 : Principales voies dans le métabolisme de l'arginine au sein d'une cellule endothéliale. D'après (Schnog *et al.*, 2004).

Les cellules endothéliales métabolisent également les lipides, afin de synthétiser les acides gras (*e.g.*, palmitate) et de les stocker sous forme de **gouttelettes lipidiques**. Ces dernières constituent un véritable réservoir d'énergie au sein des cellules endothéliales, et sont échangées entre ces cellules à travers des tunnels membranaires les reliant. En effet, les acides gras contenus dans les gouttelettes lipidiques rentrent dans les mitochondries pour subir la β -oxydation et fournir les substrats énergétiques pouvant être intégrés au cycle de Krebs.

c) Interprétation

Globalement, d'après nos résultats, les métabolismes associés aux acides aminés, aux cofacteurs et aux nucléotides sont les plus impactés. Ces trois classes métaboliques sont surtout retrouvées dans les cellules endothéliales, ce qui est cohérent avec l'ampleur de la perturbation retrouvée dans le sérum. Nous pouvons donc avancer l'hypothèse que les cellules endothéliales sont les premiers acteurs de la réponse métabolique suite à la sonoporation. Le principal métabolisme perturbé est celui de l'arginine,

ainsi que ceux qui lui sont associés (*i.e.*, métabolisme du glutamate et de la glutamine ; métabolisme de l'alanine, de l'aspartate et du glutamate ; métabolisme de l'arginine et de l'ornithine, *etc.*). Le métabolisme de l'alanine, de l'aspartate et du glutamate constitue une voie intermédiaire de la biosynthèse des métabolites du cycle de Krebs et fait le lien entre les autres métabolismes. L'aspartate et le glutamate constituent en quelque sorte un *hub* par lequel transite un certain nombre de voies métaboliques. De plus, d'après nos données, un ensemble de métabolismes constitué des métabolismes de la cystéine et de la méthionine, et du glutathion, est également dérégulé dans le sérum. Ces métabolismes, qui sont étroitement liés, sont à la base des mécanismes de défense contre les espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. Ces métabolismes semblent fortement sollicités dans le sérum jusqu'à 1 semaine après la sonoporation, mais aussi dans le striatum. L'arginine est le métabolite précurseur pour la synthèse de NO. Le NO est responsable d'effets vasodilatateurs, mais est aussi impliqué dans l'angiogenèse et dans l'immunité par son action cytotoxique (Cooke, 2003). Nos résultats montrent une surrégulation du métabolisme des purines 3 h après la sonoporation, puis son retour à l'état basal à partir de 48 h après la procédure. Le métabolisme des purines est impliqué dans la synthèse de l'adénosine. Nous avons vu que les astrocytes étaient responsables de la régulation du flux sanguin *via* la sécrétion d'acide arachidonique et de PGE₂. Cette régulation est *shuntée* par les métabolites lors d'un stress hypoxique (*i.e.*, concentration élevée de lactate et d'adénosine lors d'une hypoxie ou d'une anoxie cérébrale). En effet, le lactate empêche la recapture de la PGE₂ et l'adénosine inhibe l'action vasoconstrictrice du 20-HETE, ce qui a pour but de bloquer la vasodilatation des vaisseaux cérébraux.

En outre, la surrégulation du métabolisme de la glycine, de la sérine et de la thréonine dans les striata contro- et ipsilatéraux semble subir une perturbation globale au sein du tissu cérébral dans nos expérimentations. La glycine est un acide aminé servant de neurotransmetteur impliqué dans les synapses inhibitrices *via* le récepteur à la glycine, et également dans les synapses excitatrices *via* le récepteur N-méthyl-D-aspartate. De plus, la sérine est un acide aminé qui intervient dans la synthèse des phospholipides et des sphingolipides dont le métabolisme est lié à celui de la glycine. La choline est un précurseur dérivant du métabolisme de la glycine et de la sérine. En effet, la glycine est transformée en sérine, puis en éthanamine, et finalement en phosphatidyléthanamine. La phosphatidyléthanamine subit trois méthylations pour donner la phosphatidylcholine, et enfin la choline. Cette choline est acétylée pour donner l'acétylcholine, participant à la neurotransmission cholinergique. Cette neurotransmission est présente dans le striatum et représente 2% des neurones (Lim *et al.*, 2014). Par conséquent, la perturbation interhémisphérique du métabolisme de la glycine, de la sérine et de la thréonine pourrait constituer une déstabilisation de la neurotransmission, ainsi qu'un phénomène de compensation à partir de 48 h après la sonoporation (surrégulation dans le striatum ipsilatéral vs sous-régulation dans le striatum controlatéral).

Partie IV

Conclusions et perspectives



IV. Conclusions et perspectives

La transcription des gènes implique l'utilisation des molécules associées aux processus génétiques (*i.e.*, bases azotées, nucléotides, *etc.*). Ainsi, la réponse transcriptionnelle à un événement extracellulaire capté par des récepteurs membranaires est déclenchée et mène à la traduction de protéines de réponses spécifiques. Nos analyses métabolomiques ont montré la dérégulation des métabolismes des purines et des pyrimidines, suggérant l'activation de la machinerie génétique (*i.e.*, réplication, transcription et traduction). De nombreuses études de biologie moléculaire ont montré l'apparition d'une réponse transcriptionnelle et protéique après la perméabilisation de la BHE par sonoporation.

Les gènes dérégulés révélés par notre approche de transcriptomique après la perméabilisation de la BHE par sonoporation apportent des éléments caractéristiques de l'implication d'un phénomène d'hypoxie locale associée à un basculement du métabolisme énergétique, notamment à travers l'intervention des enzymes régulant le flux de la glycolyse (*i.e.*, *Gpd1*, *Pkd4*, *Sgk1*, *etc.*). En effet, les études antérieures ont indiqué que les effets mécaniques des microbulles lors de la sonoporation étaient confinés principalement dans l'endothélium vasculaire, et étaient associés à des vasospasmes de la vascularisation cérébrale (Raymond *et al.*, 2007). Ces vasospasmes qui se propagent le long des vaisseaux, pourraient bloquer transitoirement la circulation sanguine et provoquer la baisse locale de la pression partielle en oxygène. De ce fait, la chute de pression partielle en oxygène contraindrait les cellules de l'unité neurovasculaire à changer leur stratégie métabolique. En outre, les cellules n'ayant pas changé le mode de fonctionnement de leur métabolisme ou observant un métabolisme plus important, pourraient subir des dommages de type oxydatif causés par les espèces réactives de l'oxygène (ERO). Notre approche de transcriptomique et la littérature ont fait état de la surexpression de plusieurs gènes relatifs à l'inflammation et à l'activation du système immunitaire. De ce fait, certaines cellules sont endommagées par le stress oxydatif et le système immunitaire s'active en réponse. Cette hypothèse est corroborée par le fait que les métabolismes du glutathion, de la cystéine et de la méthionine, et de ceux associés à l'arginine sont dérégulés, constituant ainsi un ensemble de métabolites réactifs face au stress oxydatif. Ces métabolites ont pour rôle de détoxifier les composés néfastes pour la cellule, de promouvoir la différenciation des macrophages et de déclencher les réponses vasomotrices. Les ERO jouent un rôle dans les mécanismes biologiques de la sonoporation. En effet, Escoffre *et al.*, ont montré que l'exposition des microbulles aux ultrasons favorise la production de ERO (Escoffre *et al.*, 2020). En outre, nous avons identifié un ensemble de dérivés du tryptophane, à travers leur dosage dans le sérum et qui serait à l'origine d'une inflammation vasculaire, appuyant donc la possible réponse inflammatoire caractérisée précédemment par la littérature.

L'ensemble du métabolome des rats est perturbé lors de la perméabilisation de la BHE par sonoporation. La principale matrice déstabilisée par la sonoporation est le sérum. Les analyses des voies métaboliques ont révélé l'implication majeure du métabolisme de l'arginine et de ces métabolismes associés dans l'ensemble des matrices explorées. En effet, en intégrant les conclusions de l'approche de transcriptomique dans les conditions hypoxiques engendrés par la vasoconstriction locale des vaisseaux perméabilisés, deux types de réponses cellulaires pourraient être observées : (i) les

astrocytes pourraient synthétiser la PGE₂ pour provoquer la vasodilatation des vaisseaux et améliorer l'apport de l'oxygène dans le tissu cérébral ; ou (ii) les cellules endothéliales pourrait synthétiser du NO à partir de l'arginine afin d'induire une vasodilatation. Ces hypothèses sont corroborées par : (i) la surexpression de la phospholipase A2 impliquée dans la synthèse de l'acide arachidonique, lui-même précurseur de la PGE₂; (ii) par la surexpression du facteur induit de l'hypoxie ; (iii) par la dérégulation des gènes associés à la glycolyse ; (iv) par la surrégulation des métabolismes de l'arginine et de ses métabolismes associés ; et (v) par la surrégulation des métabolismes du glutathion et des purines. Ces arguments en faveur d'un choc hypoxique soulignent les relations entre les observations faites lors de l'approche de transcriptomique et celles des approches métabolomiques.

De plus, les résultats de l'approche transcriptomique ont mis en évidence des gènes impliqués dans la formation et l'entretien de la synapse. De même, nous avons mis en exergue une perturbation potentielle de la neurotransmission sérotoninergique, suggérant alors une déstabilisation des processus neuronaux.

Cependant, une interrogation subsiste : Est-ce que cette réponse transcripto-métabolique est une conséquence de la perméabilisation ou bien une cause ? En effet, les délais choisis entre la sonoporation et l'évaluation des variables biologiques par notre groupe et les autres groupes rendent la comparaison des résultats plus délicate. Les processus génétiques étant rapides, de même que le *turn-over* des matrices biologiques liquidiennes, les perturbations causées par la sonoporation pourraient être masquées rapidement. De plus, la métabolomique ne peut pas à elle seule expliquer les processus plus complexes et plus fins que représente, par exemple, l'endocytose. En effet, il a été montré que l'endocytose est stimulée lors de la sonoporation, mais ces mécanismes mettent principalement en jeu des complexes protéiques non observables par métabolomique (Sheikov *et al.*, 2006). C'est pourquoi cette approche ne peut pas être suffisante pour explorer les conséquences biologiques d'une perturbation physique ou chimique. En effet, la métabolomique est l'étude des métabolites issus des voies métaboliques d'un organisme et/ou d'une cellule. Elle constitue le dernier niveau des sciences omiques et reflète l'activité des protéines et enzymes responsables des réactions du métabolisme. Ces mêmes protéines et enzymes sont issues de la traduction des ARNm qui ont été transcrits en réponse aux besoins de la cellule ainsi qu'au stimuli extracellulaires. C'est pourquoi les observations faites en métabolomique doivent être confrontées à une autre technique d'exploration, comme la protéomique, la transcriptomique, l'histologie, voire l'imagerie moléculaire et/ou fonctionnelle. Les méthodes omiques sont complémentaires et doivent être considérées comme une approche intégrative pour répondre à une question biologique.

Une des difficultés à interpréter ces résultats par rapport à la littérature demeure dans le fait qu'aucun protocole de perméabilisation de la BHE ne soit standardisé ou standardisable, bien que les paramètres acoustiques utilisés chez le rat soient généralement homogènes. La détection de la cavitation et le suivi de la perméabilisation de la BHE en temps réel constituent un réel élément de sécurité non négligeable et ajoutent de nouvelles métriques pour contrôler la cavitation des microbulles, qui sont les principales responsables des effets secondaires de la perméabilisation de la BHE par sonoporation.

Dans ce travail de thèse nous avons apporté de nouveaux éléments biologiques quant à la réponse transcriptionnelle et métabolique suite à la perméabilisation de la BHE par sonoporation chez le rat sain. Nous les avons apportés en mettant en œuvre des techniques d'exploration qui n'ont jamais été utilisées pour déterminer les conséquences neurophysiologiques dans le cadre de la perméabilisation de la BHE par sonoporation.

Nous avons ouvert avec succès la BHE du striatum chez le rat sain, sans pour autant induire d'hémorragies, de dommages ni d'œdèmes. Cette perméabilisation a été confirmée par l'extravasation de bleu d'Evans dans la zone d'intérêt. Les observations microscopiques faites sur les coupes de cerveaux après sonoporation ne mettent pas en évidence de dommages au tissu nerveux ni d'œdèmes. Les résultats de la cinétique de fermeture de la BHE montrent le retour à sa perméabilité native une heure après la procédure. L'interprétation et l'intégration des résultats de l'approche transcriptomique et métabolomique mettent en relief l'apparition d'une perturbation globale des métabolismes (énergétique, des acides aminés, des nucléotides), associée à la dérégulation des gènes relatifs à l'hypoxie et au stress oxydatif. Pour compléter l'évaluation des conséquences neurophysiologiques de la sonoporation, il serait également intéressant d'ouvrir la BHE d'une autre structure cérébrale afin de comparer les réponses transcripto-métabolique de la procédure. De plus, il faudrait de compléter ce travail en caractérisant la réponse transcripto-métabolique de l'ouverture de la BHE à la suite de l'utilisation d'un protocole acoustique sévère. En effet, cette étude complémentaire permettrait de jalonner les conséquences neurophysiologiques pour évaluer une fenêtre thérapeutique.

Il est toutefois nécessaire et important de reproduire ces expérimentations *via* ces approches exploratoires sur un plus grand nombre d'animaux, afin d'améliorer la puissance, la robustesse et la répétabilité de nos observations. Les données apportées par ce travail de thèse sont également à compléter par des expériences complémentaires, notamment dans différentes conditions en faisant varier les paramètres acoustiques, en répétant la procédure sur une plus courte ou plus longue période, ou en associant l'ouverture de la BHE avec une autre application, comme la délivrance de molécules thérapeutiques. De plus, nous avons caractérisé les réponses transcriptomiques et métabolomiques chez des individus mâles sains. Il serait pertinent de vérifier l'homogénéité des résultats par rapport au sexe (*i.e.*, entre mâles et femelles) et également en fonction de l'âge des animaux. De même, il serait intéressant de compléter ce travail en explorant les conséquences métaboliques de la perméabilisation de la BHE chez des sujets mimant une pathologie. En outre, il serait également important de tester le *workflow* transcriptomique et métabolomique sur une autre espèce animale que le rat. Enfin, nous avons exploré le striatum en ne ségréant pas les différents types cellulaires présents dans l'échantillon tissulaire. En conséquence, nous avons caractérisé la réponse globale du tissu face à la sonoporation. Il serait approprié de caractériser la réponse unique de chaque type cellules *in vitro* ou en mettant en œuvre des techniques de séparation des différents types cellulaires.

L'avantage de la métabolomique est sa grande flexibilité. En effet, comme nous avons pu le voir dans ce manuscrit, il est possible d'appliquer une méthode de dosage ciblée sur une certaine classe de métabolites (*i.e.*, dérivé du tryptophane, englobant la voie des kynurénines et de la sérotonine). Il serait également intéressant de compléter nos données de métabolomique en dosant les dérivés de l'acide arachidonique ou les dérivés des catécholamines par des méthodes ciblés de LC-MS ou de lipidomique.

L'un des intérêts de la métabolomique est la possibilité de déterminer des biomarqueurs prédictifs des conséquences d'un procédé ou d'une maladie. En effet, à partir des profils métaboliques et des métabolites qui les composent, il est statistiquement possible de définir des métabolites qui peuvent aider à diagnostiquer une maladie. Dans ce cas, ces approches pourraient être utilisées pour déterminer un biomarqueur de l'ouverture de la BHE, notamment pour le diagnostic d'un incident vasculaire cérébral, par exemple.

De plus, la métabolomique explore les matrices biologiques solides et liquidiennes. Hormis le tissu nerveux et le liquide cébrospinal, le sérum, les urines et les fèces sont des matrices particulièrement « facile » à prélever. On pourrait imaginer d'appliquer le *workflow* métabolomique sur des échantillons provenant de patients ayant des affections neurologiques où la BHE est connue pour être endommagée (*e.g.*, maladie d'Alzheimer, tumeur cérébrale, *etc.*).

Partie V

Annexes



Liste des publications

Liste des congrès

Liste des enseignements

Revue : « *Delivery of anti-cancer drugs using microbubble-assisted ultrasound in digestive oncology from preclinical to clinical studies* »

Article : « *Serum and Soleus Metabolomics Signature of Klf10 Knockout Mice to Identify Potential Biomarkers* »

Table des annexes

Annexe 1 : Liste des gènes dérégulés après ouverture de la barrière hématoencéphalique par sonoporation selon les comparaisons entre les groupes.	257
Annexe 2 : Classification hiérarchique suivant le <i>consensus clustering</i> des échantillons basée sur les 1000 gènes les plus variants.	258
Annexe 3 : <i>Score plot</i> des trois premières dimensions (1 vs 2 ; 1 vs 3 ; 2 vs 3) des analyses en composantes principales des 1000 gènes les plus variants.	259
Annexe 4 : <i>Loadings</i> des trois premières dimensions (1 vs 2 ; 1 vs 3 ; 2 vs 3) des analyses en composantes principales des 1000 gènes les plus variants.	260
Annexe 5 : Profils axial (en A) et latéraux, en latéral X et en élévation Y (en B et C) de la tâche focale du transducteur 1 MHz.	261
Annexe 6 : Paramètres de la régression linéaire entre la pression acoustique générée par le transducteur et la tension appliquée au générateur.	262
Annexe 7 : Etude des relations entre les gènes dérégulés entre les groupes contrôle et 3 h après la sonoporation.	263

Annexe 8 : Etude des relations entre les gènes dérégulés entre les groupes 3 h et 48 h après la sonoporation.	264
Annexe 9 : Etude des relations entre les gènes dérégulés entre les groupes contrôle et 1 semaine après la sonoporation.....	264
Annexe 10 : <i>Heatmap</i> représentant les métabolites significativement dérégulés dans les striata ipsilatéraux des rats en fonction des comparaisons temporelles inter-groupes.....	266
Annexe 11 : <i>Heatmap</i> représentant les métabolites significativement dérégulés dans le liquide cébrospinal des rats en fonction des comparaisons temporelles inter-groupes.....	267
Annexe 12 : <i>Heatmap</i> représentant les métabolites significativement dérégulés dans le sérum sanguin des rats en fonction des comparaisons temporelles inter-groupes.....	268
Annexe 13 : <i>Heatmap</i> représentant les métabolites significativement dérégulés dans les urines des rats en fonction des comparaisons temporelles inter-groupes.....	269
Annexe 14 : <i>Heatmap</i> représentant les métabolites significativement dérégulés dans les striata controlatéraux des rats en fonction des comparaisons temporelles inter-groupes.....	270
Annexe 15 : Observation microscopique d'une coupe sagittale controlatérale d'un cerveau de rat 48 h après la sonoporation obtenue <i>via</i> la reconstruction par mosaïque.....	271
Annexe 16 : Observation microscopique de coupes sagittales de cerveaux 3 h après la sonoporation (à gauche) ; et 1 semaine après la sonoporation (à droite).....	272

V. Annexes

I) Liste des publications

Baroukh, N., Canteleux, N., Lefèvre, A., Dupuy, C., Martias, C., **Presset, A.**, Subramaniam, M., Hawse, J.R., Emond, P., Pouletaut, P., Morandat, S., Bensamoun, S.F., Nadal-Desbarats, L., 2022. *Serum and Soleus Metabolomics Signature of Klf10 Knockout Mice to Identify Potential Biomarkers*. *Metabolites* 12, 556. <https://doi.org/10.3390/metabo12060556>

Presset, A., Bodard, S., Lefèvre, A., Millet, A., Oujagir, E., Dupuy, C., Iazourène, T., Bouakaz, A., Emond, P., Escoffre, J.-M., Nadal-Desbarats, L., 2022. *First metabolomic signature of blood brain barrier opening induced by microbubble-assisted ultrasound*. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 15. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.888318>

Escoffre, J.-M., Sekkat, N., Oujagir, E., Bodard, S., Mousset, C., **Presset, A.**, Chautard, R., Ayoub, J., Lecomte, T., Bouakaz, A., 2022. *Delivery of anti-cancer drugs using microbubble-assisted ultrasound in digestive oncology: from preclinical to clinical studies*. *Expert Opinion on Drug Delivery* 19, 421-433. <https://doi.org/10.1080/17425247.2022.2061459>

Presset, A., Bonneau, C., Kazuyoshi, S., Nadal-Desbarats, L., Mitsuyoshi, T., Bouakaz, A., Kudo, N., Escoffre, J.M., Sasaki, N., 2020. *Endothelial Cells, First Target of Drug Delivery Using Microbubble-Assisted Ultrasound*. *Ultrasound in Medicine and Biology* 46, 1565-1583. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2020.03.013>

II) Liste des congrès

Poster – *First metabolomic signature of blood-brain barrier opening induced by microbubble-assisted ultrasound*; IEEE International Ultrasonics Symposium ; Venice, IT ; **octobre 2022**

Présentation – *First in-vivo metabolomics characterization of acoustically-mediated blood-brain barrier opening*; 27th European symposium on Ultrasound Contrast Imaging ; Rotterdam, NL (visioconférence) ; **janvier 2022**

Présentation - *The Serum and CSF Metabolomes after Acoustically-mediated Blood-Brain Barrier Opening: a Metabolic Investigation*; IEEE International Ultrasonics Symposium ; Xi'an, CN (visioconférence) ; **octobre 2021**

Présentation – *Metabolic Shock Wave after Acoustically-mediated Blood-Brain Barrier Opening : CSF and Serum Metabolomes Investigation* ; 181th Meeting of the Acoustical Society of America: Acoustic in Focus ; Seattle, US (visioconférence) ; **juin 2021**

Poster – *New Insights Into Acoustically-mediated Blood-Brain Barrier Disruption: A Metabolomics Investigation* ; 16th Annual Conference of the Metabolomics Society ; Singapour, SG (visioconférence) ; **octobre 2020**

Présentation – *Acoustically-mediated blood-brain barrier opening: investigation of neurophysiological consequences by neurotranscriptomics*; 25th European Symposium on Ultrasound Contrast Imaging ; Rotterdam, NL ; **janvier 2020**

Poster – *A transport model for quantitative CEUS imaging of tumor perfusion*; IEEE International Ultrasonics Symposium ; Glasgow, SC ; **octobre 2019**

Poster – *Consequences of acoustically-mediated blood-brain barrier opening: A Transcriptomics Overview*; Journée de la Recherche Biomédicale de la Faculté de Médecine de Tours ; Tours, FR ; **décembre 2019**

Poster - *Ultrasound imaging and therapeutic ultrasound for brain diseases*; Journée scientifique de la SFR Neuroimagerie Fonctionnelle ; Tours, FR ; **juin 2019**

III) Listes des enseignements

Vacation sur 2 ans au sein du département de Biochimie (section 64) de la faculté de Sciences et Techniques de l'université de Tours :

- L1 : Biochimie structurelle, **TP oses** – 64 heures
- L1 : Biochimie structurelle, **TP protéines** – 64 heures

Contrat Attaché Temporaire d'Enseignements et de Recherche (ATER) rattaché au département de Biochimie (section 64) de la faculté de Sciences et Techniques de l'université de Tours – contrat de 192 heures :

- L1 : Biochimie structurelle, **TD acides aminés et protéines**
- L1 : Biochimie structurelle, **TD glucides**
- L1 : Biochimie structurelle, **TP protéines**
- L2 : Métabolisme cellulaire, **TD métabolisme**
- L3 : Unité d'enseignement transdisciplinaire : **TD et TP projet expérimental transdisciplinaire et outils d'analyse scientifique**
- L3 : Pharmacologie et Biochimie Cellulaire, **TP dosage du glucose en réponse à des stimuli pharmacologiques**

IV) **Revue :** « *Delivery of anti-cancer drugs using microbubble-assisted ultrasound in digestive oncology from preclinical to clinical studies* »

EXPERT OPINION ON DRUG DELIVERY
2022, VOL. 19, NO. 4, 421–433
<https://doi.org/10.1080/17425247.2022.2061459>



REVIEW



Delivery of anti-cancer drugs using microbubble-assisted ultrasound in digestive oncology: from preclinical to clinical studies

Jean-Michel Escoffre ^a, Najib Sekkat^a, Edward Oujagir^a, Sylvie Bodard^a, Coralie Mousset^a, Antoine Presset^a, Romain Chautard^{b,c}, Jean Ayoub^{a,d}, Thierry Lecomte^{b,c} and Ayache Bouakaz ^a

^aUMR 1253, iBrain, Université de Tours, Inserm, Tours, France; ^bInserm UMR 1069, Nutrition, Croissance et Cancer (N2C), Université de Tours, Tours, France; ^cDepartment of Hepato-Gastroenterology & Digestive Oncology, CHRU de Tours, Tours, France; ^dDepartment of Echography & Doppler, CHRU de Tours, Tours, France

ABSTRACT

Introduction: The combination of microbubbles (MBs) and ultrasound (US) is an emerging method for the noninvasive and targeted enhancement of intratumor chemotherapeutic uptake. This method showed an increased local drug extravasation in tumor tissue while reducing the systemic adverse effects in various tumor models.

Area covered: We focused on preclinical and clinical studies investigating the therapeutic efficacy and safety of this technology for the treatment of colorectal, pancreatic, and liver cancers. We discussed the limitations of the current investigations and future perspectives.

Expert opinion: The therapeutic efficacy and the safety of delivery of standard chemotherapy regimen using MB-assisted US have been mainly demonstrated in subcutaneous models of digestive cancers. Although some clinical trials on pancreatic ductal carcinoma and hepatic metastases from various digestive cancers have shown promising results, successful evaluation of this method in terms of US settings, chemotherapeutic schemes, and MBs-related parameters will need to be addressed in more relevant preclinical models of digestive cancers, in small and large animals before fully and successfully translating this technology for clinic use. Ultimately, a clear evidence of the correlation between the enhanced intratumoral concentrations of therapeutics and the increased therapeutic response of tumors have to be provided in clinical trials.

ARTICLE HISTORY

Received 23 November 2021
Accepted 30 March 2022

KEYWORDS

Digestive cancer; drug delivery; anti-cancer drugs; ultrasound; microbubble

1. Introduction

The digestive system (also known gastrointestinal system) consists of the esophagus, stomach, small and large intestines, liver, pancreas, and gallbladder. Altogether, these organs break down food into nutrients, which are absorbed by the blood circulation and transported to all of the cells in the organism. Digestive cancers refer to the set of malignant tumors that develop from these organs and glands. For the majority of them, these tumors are adenocarcinomas, which originate in the mucous membranes that line the walls of the digestive tract or excretory ducts of the glands [1]. In the world, about 4.8 million new cases of digestive cancers and 3.4 million related deaths were registered in 2018 [2,3]. Digestive cancers represented 26% of the global cancer incidence and 35% of all cancer-related deaths. The most common digestive cancers are colorectal and pancreatic cancers [2]. Treatments for digestive cancers depend on the location of the tumor, its local and distant extension, and the general patient history [4]. Thus, primary lesions are removed most often using minimally invasive surgical techniques. The loco-regional lesions are treated with chemotherapy, possibly combined with radiotherapy, while metastases are mainly treated with chemotherapy. Using a combination of anti-cancer drugs, chemotherapy destroy or slow-down the growth of fast-

proliferating digestive cancer cells, wherever they are in the organism. The chemotherapy is mainly delivered intravenously for the treatment of digestive cancer, but it can also be administered orally [4,5]. In addition, chemotherapy can be used in three different ways: (i) as neoadjuvant treatment; (ii) as adjuvant treatment and (iii) when surgery and/or radiotherapy is contraindicated for the patient [4,5]. This is ascribed to the tumor microenvironment, which restrains both effective drug extravasation and the targeting of digestive cancer cells [6,7]. In addition, the systemic delivery of unspecific chemotherapeutics is also associated to major off-target effects. To overcome these limitations, the development of safe, efficient, and targeted drug delivery systems is required to enhance the intratumor (i.t.) bioavailability of these chemotherapeutics, thus increasing their therapeutic efficacies, while minimizing side effects in normal tissues. Such drug delivery methods might have a great profit as neoadjuvant but also palliative care. They might decrease the tumor burden, thus either making it easier for surgical resections or offering symptom relief.

Microbubble-assisted ultrasound (i.e. sonoporation or sonopermeabilization) is an emerging method for the noninvasive and targeted delivery of chemotherapeutic drugs, immunotherapeutic agents, photo/sonodynamics agents, and nucleic acids into

CONTACT Ayache Bouakaz ayache.bouakaz@univ-tours.fr Inserm UMR 1253, Université de Tours, 10 bd Tonnellé, 37044 Tours Cedex, France; Jean-Michel Escoffre jean-michel.escoffre@univ-tours.fr Inserm UMR 1253, Université de Tours, 10 bd Tonnellé, 37044 Tours Cedex, France

© 2022 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

Article highlights

- MB-assisted US is an emerging and promising method for non-invasive and targeted delivery of chemotherapeutics.
- MB-assisted US promotes the permeabilization of blood-tumor barriers, thus increasing the extravasation and the i.t. bioavailability of therapeutics; the enhanced i.t. accumulation of therapeutics increases their treatment efficacies, while reducing side effects in healthy tissues.
- Acoustically mediated drug delivery is mainly developed and validated in s.c. animal models of digestive cancers. Further preclinical additional studies have to be performed on orthotopic and metastasis animal models of digestive cancers in small and large animals to confirm the potential therapeutic benefit of this strategy.
- Few Phase I/II clinical trials have reported promising results for the treatment of inoperable pancreatic ductal adenocarcinoma (primary lesions and metastases) and hepatic metastases; and new results are expected on the treatment of hepatic metastases from colorectal and pancreatic cancers.
- Careful evaluation of efficacy and tolerability of therapeutic schemes including the choice of chemotherapy regimen, US settings, choice of MBs is required to facilitate translation of this US technology to the clinic.
- Clinical investigations have to bring a clear evidence of the correlation between the enhanced intratumor concentrations of therapeutics and the increased therapeutic response of tumors to the therapeutics.

digestive cancers [8–10]. These therapeutics are either co-injected intravenously with microbubbles (MBs) or loaded on or into the MBs before their intravenous (i.v.) administration [11]. Subsequently, the volumetric oscillations of MBs under the action of ultrasound (US) generate a number of local acoustic phenomena near the endothelial wall of blood–tumor barrier (BTB), which promote its transient permeabilization [12]. The BTB permeabilization increases the extravasation of therapeutics into the targeted tumor tissues through the stimulation of paracellular and transcellular pathways, thus increasing their i.t. bioavailability [13]. In addition, the permeabilization of endothelial cells increases the intracellular uptake of therapeutics through the formation of membrane pores, which promotes the destruction of tumor microvasculature and the reduction of the nutrient supply [12,13]. As previously described [14], the efficiency of MB-assisted US depends on multiple factors: (i) sufficient accumulation of therapeutics and MBs into the tumor microvasculature, which is directly influenced by their pharmacological properties as well as the physiological properties of tumor tissues; (ii) US parameters, probes and devices; and (iii) treatment schemes, which is influenced by the pharmacological properties of therapeutics and MBs, and the duration of BTB permeabilization. The influence of some of these factors on the delivery of chemotherapeutics has been investigated in murine models of digestive cancers but also in pilot clinical studies [14]. Both preclinical and clinical investigations mainly focused on colorectal, pancreatic, and liver cancers [8,15–17]. In this review, we provide a survey on preclinical and clinical studies investigating the therapeutic efficacy and safety of delivery of chemotherapeutics using MB-assisted US for the treatment of colorectal, pancreatic, and liver cancers. The limitations of these investigations and future perspectives are also discussed.

2. Methods

PubMed®, Web of Science™ and ClinicalTrials.gov electronic databases were screened using pre-defined search dates (January 1995 to August 2021) and terms: The PubMed® database search terms used were: (digestive cancer [MeSH terms]) AND (esophageal cancer [MeSH terms]) AND (stomach cancer [MeSH terms]) AND (intestine cancer [MeSH terms]) AND (gallbladder cancer [MeSH terms]) AND (colorectal cancer [MeSH terms]) AND (pancreatic cancer [MeSH terms]) AND (liver cancer [MeSH terms]) AND (microbubbles [MeSH terms]) OR ultrasound contrast agents [MeSH terms]) AND (ultrasound [MeSH terms] AND Sonoporation [MeSH terms] AND microbubble-assisted ultrasound [MeSH terms]) AND ('English' [language]). The research terms ('digestive cancer') AND ('esophageal cancer') AND ('stomach cancer') AND ('intestine cancer') AND ('gallbladder cancer') AND ('colorectal cancer') AND ('pancreatic cancer') AND ('liver cancer') AND ('microbubbles OR ultrasound contrast agents') OR ('ultrasound' OR 'microbubble-assisted ultrasound') were used on the Web of Science™. The ClinicalTrials.gov database search terms used were: 'digestive cancer' AND 'esophageal cancer' AND 'stomach cancer' AND 'pancreatic cancer' AND 'liver cancer' AND 'microbubbles OR ultrasound contrast agents' AND 'Ultrasound.' The research term 'ultrasound AND digestive cancer' was used on these three databases. The inclusion and exclusion criteria are summarized in Table 1. Thirty-three publications were identified.

3. Preclinical investigations

In this section, we focused specifically on these different aspects in preclinical studies investigating the performance of MB-assisted US as a drug delivery method for the treatment of colorectal, pancreatic, and liver tumors.

3.1. Colorectal cancer (CRC)

CRC is the third most commonly diagnosed cancer and remains the second-leading cause of cancer death worldwide in 2020 [2,3]. In this context and as previously mentioned, many drug delivery methods have been designed to improve the therapeutic effectiveness of chemotherapeutics. Among these methods, the efficacy of MB-assisted US to deliver free chemotherapeutics as well as drug-loaded nanoparticles was mainly investigated in subcutaneous (s.c.) mouse models of CRC (Table 2) [18–29]. Among these therapeutics, doxorubicin

Table 1. Inclusion and exclusion criteria used to select studies.

Inclusion criteria	Exclusion criteria
Involving MB-assisted US	US without MBs
Delivery of chemotherapeutics and immunotherapeutics in digestive cancers	Delivery of nucleic acids and photo/sonodynamics agents in digestive cancers
Preclinical and clinical studies	<i>In-vitro</i> studies
Original articles	Review papers, comments, Letters
English	Other languages

Table 2. Preclinical studies on colorectal cancer.

References	Drug	Drug-loaded MBs	Tumor model	Increase in therapeutic effectiveness	Enhancement of i.t. drug biodistribution	Reduction of drug concentration in normal organs	Reduction of side effects
[18]	Cisplatin	N	s.c.	Y	ND	ND	ND
[20]	Doxil®	N	s.c.	Y	ND	ND	ND
[21]	Camptothecin/ fluorouridine	Y	s.c.	Y	ND	ND	N
[22]	Doxil®	N	s.c.	Y	Y	ND	ND
[23]	Combrestatin	Y	s.c.	Y	Y	ND	ND
[24]	Irinotecan and SN38	Y	s.c.	Y	Y	ND	ND
[29]	Cetuximab	N	s.c.	N	Y	ND	ND
Unpublished data	Irinotecan	N	Liver metastases	Y	ND	ND	ND

Y, yes; N, No; ND, non-determined; s.c. subcutaneous tumor.

(DOX) is one of the most powerful anti-cancer drugs prescribed on its own or in combination with other drugs for the treatment of solid tumors [21]. However, the current use of free DOX clinically is still rather limited because of its severe systemic side effects. To overcome these main issues, DOX has been encapsulated inside pegylated liposomes (Doxil® or Caelyx®) or polymeric nanoparticles [22,23]. Although these formulations strongly reduced the cardiotoxicity of DOX, other adverse effects and a limited i.t. DOX concentration have been reported [24]. One of the strategies to increase the therapeutic effectiveness of DOX and in particular in its liposomal form consists in its coadministration with MBs and then in exposing the tumor tissues to US. Thus, Lin *et al.* investigated the therapeutic effectiveness of Doxil® delivery using MB-assisted US (lab-made US device; 1 MHz, 50 Hz PRF, 50% DC, 10 ms pulse length, 0.6 MPa, for 60 s; 100 µL/kg SonoVue® MBs) on the growth of early (15 mm³) and medium (50 mm³) in s.c. murine colorectal adenocarcinoma (CT-26) in mouse [25]. Mice with early-stage tumors received an intravenous (i. v.) injection of 10 mg/kg Doxil®. Then, MBs were intravenously administered and tumors were exposed to US pulses. Tumors were treated once a week for 3 weeks. The results showed that acoustically mediated Doxil® delivery further and earlier inhibited tumor growth as compared to Doxil® treatment alone. Similarly, a 6 mg/kg Doxil® dose was delivered once a week for 2 weeks using MB-assisted US in mice with medium-stage tumors. The inhibition of tumor growth was more effective after acoustically mediated Doxil® delivery than Doxil® treatment alone, and the tumors almost disappeared after acoustically mediated Doxil® delivery. Using the same therapeutic scheme, the authors demonstrated that MB-assisted US significantly increased the therapeutic efficacy of a 4 mg/kg Doxil® dose, which did not inhibit the tumor growth when this dose was administered alone [25].

Moreover, Ingram *et al.* investigated the therapeutic effectiveness of acoustically mediated irinotecan delivery using VEGFR2-targeted and irinotecan-loaded MBs (thMBs) in the same murine model of CRC [28]. Seven days after tumor inoculation, mice received an i.v. injection of the thMBs (150–200 µL of 10⁸ thMBs, *i.e.* 2 mg/kg irinotecan), or free irinotecan (2 mg/kg). Then, tumors were exposed to US pulses (lab-made US device; 2.2 MHz, 260 kPa PNP, 1 kHz PRF, 10 µs tone burst US pulse, for 5 s) 4 min post-MB injection. Mice received 5 treatments in total over 3 weeks. The acoustically

mediated irinotecan delivery using thMBs inhibited significant tumor growth compared to free irinotecan alone. Indeed, the percentage of tumor growth inhibition compared to the non-treatment was 38% for free irinotecan alone and 50% for acoustically mediated irinotecan delivery using thMBs. In addition, this latter treatment exhibited a 19% tumor growth inhibition compared to free irinotecan alone. By assessing the concentrations of irinotecan and SN38 (active metabolite of irinotecan) in the tumors, the authors demonstrated that the therapeutic efficacy of acoustically mediated irinotecan delivery using thMBs was directly correlated to a significant increase of i.t. irinotecan and SN38 concentrations. These results demonstrated that the combination of drug-loaded MBs with US is an efficient strategy to deliver chemotherapeutics in colorectal cancer.

It is questionable whether the exploitation of drug-loaded MBs for acoustically mediated drug delivery is a promising strategy, since their clinical use will require additional pharmacological and toxicological evaluations, which are time consuming and expensive. To avoid this issue and to respect the clinical procedures for chemotherapy, our research group investigated the delivery of irinotecan using MB-assisted US in human CRC (HCT-116) liver metastases in mouse model. A 20 or 40 mg/kg irinotecan dose was intravenously administered once every 3 days for 9 days. Thirty minutes later, MBs (BG8214; Bracco Research SA, Geneva, Switzerland) were intravenously injected, and the liver metastases were exposed to US pulses (lab-made US device; 1.3 MHz, 10 kHz PRF, 40% DC, 0.4 MPa PNP, for 3 min) using a dedicated 1.5-D US phased array probe connected to a modified Aixplorer US scanner (Supersonic Imagine, Aix-en-Provence, France). As shown in Figure 1, the results show that the combination of MBs/US with 20 or 40 mg/kg irinotecan dose both induced a significant decrease in tumor growth compared to 40 mg/kg irinotecan treatment alone. No significant difference was observed between both mice groups treated with 20 mg/kg and 40 mg/kg irinotecan doses delivered by MB-assisted US. This result suggests that an acoustically mediated delivery of 20 mg/kg irinotecan dose is sufficient to induce a significant inhibition of tumor growth. To our knowledge, this is the first demonstration that MB-assisted US provide a synergetic effect for potentiating a targeted delivery of low irinotecan doses in CRC liver metastases in a mouse model. In a separate study, we also investigated the efficacy of MB-assisted US to deliver

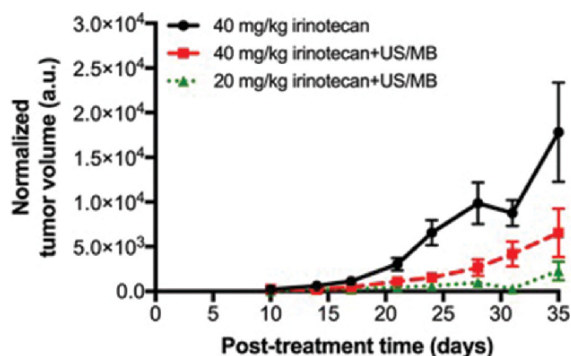


Figure 1. *In-vivo* delivery of irinotecan using MB-assisted US in liver metastases from colorectal cancer (HCT-116) in mice. A 20 or 40 mg/kg irinotecan dose was intravenously administered once a week for three weeks. Thirty minutes later, MBs (BG8214; Bracco Research SA, Geneva, Switzerland) were intravenously injected and the liver metastases were exposed to US pulses (lab-made US device; 1.3 MHz, 10 kHz PRF, 40% DC, 0.4 MPa PNP, for 3 min) using a dedicated 1.5-D US phased array probe connected to a modified Aixplorer US scanner (Supersonic Imagine, Aix-en-Provence, France). As a control, mice received an i.v. injection of 40 mg/kg irinotecan dose only. Tumor volume was measured using anatomical US imaging. Data expressed as mean \pm SD was calculated from 6 to 8 tumors.

cetuximab in a subcutaneous CRC (HT-29) in a mouse model [29]. Cetuximab is a therapeutic monoclonal antibody, which binds to the epidermal growth factor receptor overexpressed at the surface of many CRC cells. To achieve this goal, we designed three US settings at 1 MHz frequency using a lab-made US device: (i) Setting 1–100 μ s burst length, 40% DC, 600 kPa for 3 min; (ii) Setting 2–10 ms burst length, 20% DC, 500 kPa for 5 min; and (iii) Setting 3–1 s burst length, 5% DC, 350 kPa for 15 min. Mice received a i.v. injection of fluorescently AF750-labeled cetuximab. Subsequently, MBs (BG8214, Bracco Research SA) were intravenously administered and tumors were exposed to US pulses. The results showed that MB-assisted US significantly improved the i.t. accumulation of the fluorescently-labeled cetuximab in comparison with the i.v. administration of fluorescently-labeled cetuximab alone for all the US sequences (Figure 2). Additional experiments are required to confirm these encouraging results and to demonstrate the full potential of this method for the targeted delivery of therapeutic antibody in digestive tumors. Altogether, these preclinical studies show that MB-assisted US significantly improve the therapeutic effectiveness of chemotherapeutics and immunotherapeutics in CRC.

3.2. Pancreatic cancer (PC)

PC is responsible for almost as many deaths as cases due to its poor prognosis and represents the seventh-leading cause of cancer death worldwide in 2020 [2,3]. The chemotherapy as a first-line treatment or in combination with the surgery is the core of treatment for PC. Drug resistance, high metastasis occurrence, poor prognosis, and tumor relapse contribute to the complications in treating PC. Since 2010, many investigations have been performed to design therapeutic protocols for the acoustically mediated delivery of chemotherapeutics [30–43] (Table 3). Gemcitabine is one of the chemotherapeutic molecules that has attracted a large number of drug delivery studies using MB-assisted US [35,39–43]. Indeed, although this drug is consid-

ered as the most effective chemotherapeutics for the treatment of PC, the benefit remains relatively modest because of its pronounced systemic side effects [44–46]. Kotopoulos *et al.* reported the delivery of gemcitabine using MB-assisted US in an orthotopic PC (MIA PaCa-2) xenograft [41]. Three weeks after tumor inoculation, mice received an intraperitoneal (i.p.) injection of gemcitabine (125 mg/kg). Thirty minutes later, SonoVue[®] MBs (50 μ L) were intravenously injected and tumors were exposed to US pulses (lab-made US device; 1 MHz, 40% DC, 0.2 MPa PNP) for 4 min total cumulated US time. This treatment was administered weekly for a total of 8 weeks. Tumor volume decreased by a factor of 4 following two treatments using MB-assisted US compared to gemcitabine treatment alone. Both gemcitabine alone or in combination with MB-assisted US significantly increased the survival rate in comparison with no treatment. However, no significant difference in survival rate was observed between both treatments. More recently, Bressand *et al.* described the therapeutic benefit of nab-paclitaxel (albumin nanoparticle of paclitaxel) delivery using MB-assisted US in s.c. human pancreatic adenocarcinoma (BxPC3) in a mouse model [36]. Nab-paclitaxel (5 or 20 mg/kg) was intravenously injected in tumor-bearing mice. Subsequently, a bolus of MBs (70 μ L) was intravenously administered, and the tumors were exposed to US pulses (lab-made US device; 1 MHz, 100 μ s PRP, 40% DC, 400 kPa PNP) for 3 min. The treatment was performed twice a week until protocol endpoints were reached. The results showed that MB-assisted US potentiated the therapeutic efficacy of both low (5 mg/kg) as well as high (20 mg/kg) nab-paclitaxel doses in the s.c. PC mouse model. Interestingly, the acoustically mediated delivery of nab-paclitaxel at the highest dose did not impact the animal well being as no body weight loss was observed which is commonly reported when using such high drug dose [36]. This result suggests that the delivery of nab-paclitaxel into the tumor tissue limits the nonspecific drug accumulation into healthy tissues and its systemic toxicity. Altogether, these data demonstrated that MB-assisted US improves the therapeutic effectiveness of free or nanoformulated chemotherapeutics in s.c. and orthotopic PC mouse models [33,34,36,41,42].

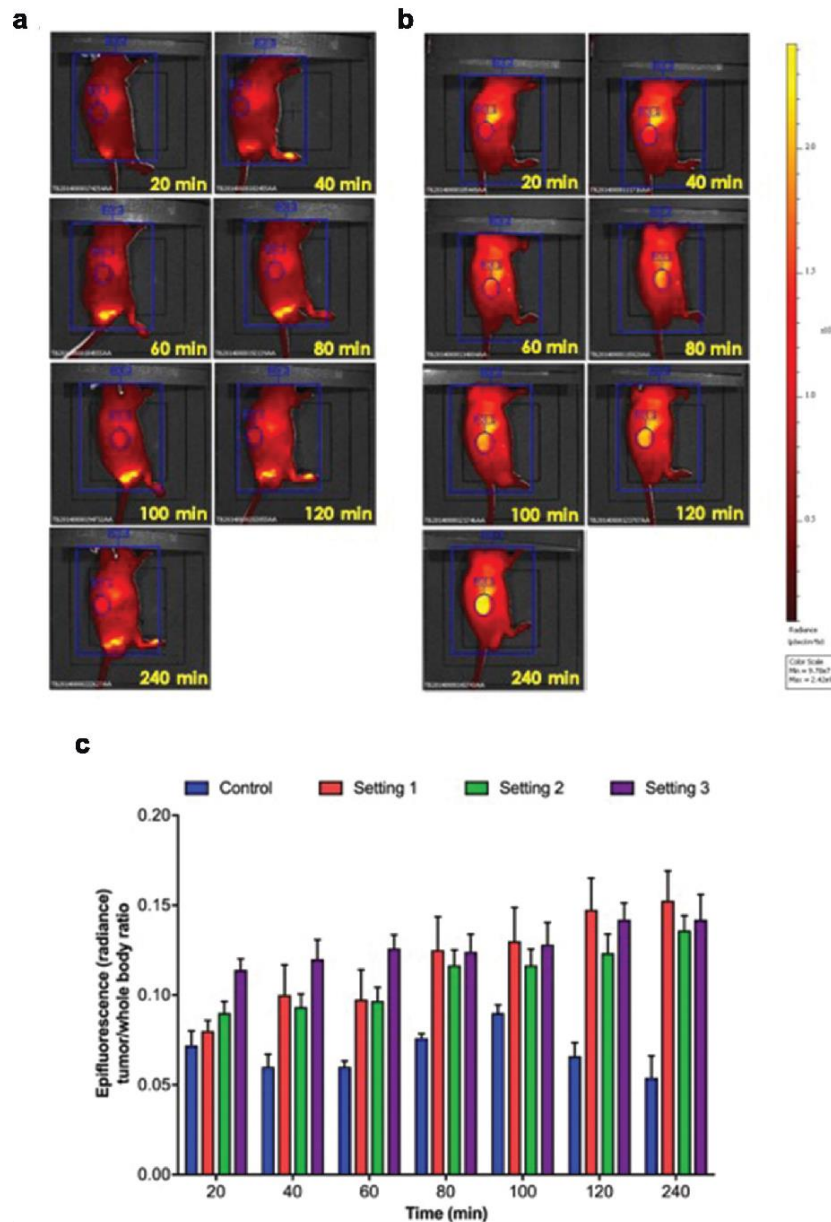


Figure 2. In-vivo delivery of AF750-labeled cetuximab using MB-assisted US in s.c. colorectal (HT-29) cancer in a mouse model. In group group, mice received an i.v. injection of fluorescently AF750-labeled cetuximab only (Control). In treated groups, the i.v. injection of AF750-labeled cetuximab is followed by an i. v. administration of MBs (BG8214, Bracco Research SA) and the tumors were exposed to US pulses using three US settings at 1 MHz frequency: (i) 100 μ s burst length, 40% DC, 600 kPa for 3 min (Setting 1); (ii) 10 ms burst length, 20% DC, 500 kPa for 5 min (Setting 2); and (iii) 1 s burst length, 5% DC, 350 kPa for 15 min (Setting 3). The i.t. biodistribution of AF750-labeled cetuximab was assessed *in-vivo* using whole-body fluorescence imaging. Representative images of control mouse (A) and treated mouse using the US setting 1 (B) are presented. Quantitative fluorescence analysis of i.t. biodistribution of AF750-labeled cetuximab. Data expressed as mean \pm SD was calculated from 5 to 6 tumors.

Another approach that has attracted much attention consists in loading or co-loading chemotherapeutics into MBs [35,37,38,43]. Indeed, Gao *et al.* described a new formulation of liposome-loaded MBs carrying irinotecan and oxaliplatin [38]. The two chemotherapeutics are usually associated with 5-fluoruracil for the treatment of advanced PC. As previously

reported for other chemotherapeutics, the FOLFIRINOX regimen has shown a great benefit on patient survival, but it is only indicated for patients with good physical condition because of its severe off-target toxicity [44–46]. The efficacy of the acoustically mediated codelivery of irinotecan and oxaliplatin using this formulation was evaluated in s.c. human PC

Table 3. Preclinical studies on pancreatic cancer.

References	Drug	Drug-loaded MBs	Tumor model	Increase in therapeutic effectiveness	Enhancement of i.t. drug biodistribution	Reduction of drug concentration in normal organs	Reduction of side effects
[25]	Doxorubicin	Y	i.m.	Y	ND	ND	N
[26]	Doxorubicin	Y	s.c.	Y	Y	ND	ND
[27]	Doxorubicin	Y	s.c.	Y	Y	ND	ND
[28]	Gemcitabine	N	s.c.	Y	ND	ND	ND
[30]	Paclitaxel	Y	s.c.	Y	Y	ND	Y
[31]	Gemcitabine	Y	s.c.	Y	ND	ND	Y
[32]	Nab-paclitaxel	N	s.c.	Y	ND	ND	Y
[33]	5-Fluorouracil	Y	Orthotopic	Y	ND	ND	N
[34]	Irinotecan and oxaliplatin	Y	s.c.	Y	ND	ND	N
[35]	Gemcitabine	Y	s.c.	Y	ND	ND	ND
[36]	Gemcitabine	N	s.c.	Y	ND	ND	Y
[37]	Gemcitabine	N	Orthotopic	Y	ND	ND	ND
[38]	Gemcitabine	N	s.c.	Y	ND	ND	N
[39]	Gemcitabine	Y	s.c.	Y	ND	ND	Y

Y, yes; N, No; ND, non-determined; s.c. subcutaneous tumor; i.m., intramuscular.

(BxPC3) mouse model. The Ir/Ox-loaded MBs (irinotecan dose: 4.75 mg/kg; oxaliplatin dose: 0.91 mg/kg) were intravenously injected in tumor-bearing mice. Then, tumors were exposed to US pulses (Sonidel SP100 device; 1 MHz, 100 Hz PRF, 30% DC, 0.48 MPa) during and after administration of MBs for a total duration of 3.5 min. Mice were treated four times at one-day interval during one week. The tumors treated with this therapeutic protocol were 136% smaller than those treated with irinotecan/oxaliplatin-based chemotherapy conventionally delivered in a free form. In addition, no severe toxic effects or body weight loss were observed during the treatment, thus indicating the protocol was well tolerated. These data demonstrated that MB-assisted US induced a more effective delivery of irinotecan/oxaliplatin and by that enhancing the overall effectiveness of this drug combination. This preclinical study is the first to report on the acoustically mediated codelivery of two chemotherapeutics using liposome-loaded MBs.

3.3. Liver cancer

Primary liver cancer is the sixth most commonly diagnosed cancer and the third leading cause of cancer death worldwide in 2020 [2,3]. As previously introduced, chemotherapy, in

combination with radiotherapy and/or surgery, remains the most common therapeutic strategy for treating most types of primary liver cancer [47]. However, many biological barriers limit the i.t. bioavailability of chemotherapeutics, thus impairing their therapeutic effectiveness [6,7]. Several therapeutic procedures using MB-assisted US have been developed for the targeted delivery of various anti-cancer drugs [48–60] in s.c. and orthotopic liver tumors models (Table 4).

Thus, Zhu *et al.* investigated the efficacy of MB-assisted US to deliver the Doxil® in hepatocellular carcinoma (H22) mouse model [55]. Four days after tumor transplantation, mice received an i.v. injection of Doxil® (10 mg/kg), then an i.v. injection of MBs (200 µL at 4×10^9 MB/mL). The tumors were insonified with US pulses (lab-made US device: 1.1 MHz, 50% DC, 2.06 W/cm²) for a total exposure time of 150 s. This treatment induced a significant tumor inhibition (79.7% vs 62.4%) and hence a lower tumor volume growth (9.7% vs 26.1%) than Doxil® alone. The acoustically mediated Doxil® delivery significantly increased the i.t. concentration of DOX compared with tumors treated with Doxil® on its own. These data clearly demonstrated a positive correlation between the acoustically mediated enhancement of i.t. DOX bioavailability and the increase in its therapeutic effectiveness. Despite an increase in the i.t. DOX

Table 4. Preclinical studies on liver cancer.

References	Drug	Drug-loaded MBs	Tumor model	Increase in therapeutic effectiveness	Enhancement of i.t. drug biodistribution	Reduction of drug concentration in normal organs	Reduction of side effects
[44]	Doxorubicin	Y	Orthotopic	Y	ND	ND	ND
[45]	Doxorubicin	Y	Orthotopic	Y	Y	Y	ND
[46]	Doxorubicin	Y	Orthotopic	ND	Y	Y	ND
[47]	Doxorubicin	Y	Orthotopic	Y	Y	ND	ND
[48]	Doxorubicin	N	Orthotopic	ND	Y	ND	ND
[49]	Doxorubicin	Y	Orthotopic	Y	ND	ND	N
[50]	Doxorubicin	Y	Orthotopic	Y	ND	ND	N
[51]	Doxorubicin	N	Orthotopic	Y	Y	ND	N
[52]	Docetaxel	Y	Orthotopic	Y	ND	ND	ND
[53]	Docetaxel	Y	s.c.	Y	Y	ND	N
[54]	Docetaxel	Y	s.c.	Y	ND	ND	ND
[55]	Resveratrol	Y	s.c.	Y	ND	ND	ND
[56]	Cisplatin, mitomycin and 5-fluorouracil	N	s.c. and orthotopic	Y	ND	ND	ND

Y, yes; N, No; ND, non-determined; s.c. subcutaneous tumor.

concentration after MB-assisted US, the DOX concentration in normal tissues has not decreased. Nevertheless, the assessment of liver function by dosing of alanine and aspartate aminotransferases showed that the acoustically mediated enhancement of DOX concentration in the liver tissue did not induce hepatic side effects. In addition, the acoustically mediated Doxil® delivery significantly increased the mouse survival rate in comparison with Doxil® alone (30 days *versus* 26 days). This preclinical study clearly demonstrated that MB-assisted US improved the therapeutic effectiveness of Doxil®.

Docetaxel (DOC) is an anti-cancer agent of the taxane class currently used to treat a variety of advanced unresectable metastatic gastric carcinoma and hepatocellular carcinoma [61,62]. However, its clinical use requires its solubilization in polysorbate 80 because of its poor water solubility. The use of such solvent usually caused adverse events. As previously reported, the encapsulation of DOC into nanoparticles could be the best strategy to overcome these issues and for a safe and efficient use in clinics [63]. In this context, different research groups designed DOC-loaded MBs for the treatment of s.c. [53,55] and orthotopic [56] liver tumors. Kang *et al.* explored the anti-tumor effects of DOC-loaded MBs combined with US on VX2 rabbit liver tumors [56]. DOC-loaded MBs were intravenously administered (2 mg DOC in 6 mL saline) US pulses were directed to the tumors (lab-made US device; 300 kHz, 50% DC, 2 W/cm²) for 6 minutes. The treatments were performed thrice and every 3 days. Twenty-four hours after the last treatment, liver tumors treated with DOC-loaded MBs combined with US had the lowest tumor volume (621.7 ± 134.4 mm³) than those received DOC treatment alone (797.2 ± 191.2 mm³) or no treatment (897.4 ± 201.1 mm³). Acoustically-mediated DOC delivery using DOC-loaded MBs induced a significant decrease of extensive metastatic rate (0%) in comparison with DOC alone (80%) or no treatment (100%). In addition, the acoustically mediated DOC delivery using DOC-loaded MBs significantly prolonged the mice survival (36.8 ± 2.77 days) compared to the DOC treatment alone (28.4 ± 2.88 days) or no treatment (23.6 ± 3.05 days). The results demonstrate that DOC-loaded MBs combined with US inhibit the growth of liver tumor by deferring cell proliferation and promoting cell apoptosis, thus prolonging the mice survival. The therapeutic effectiveness of acoustically mediated DOC delivery using DOC-loaded MBs has also been confirmed on s.c. liver tumor in mouse model [57,58]. Nevertheless, the present study did not evidence a correlation between an enhanced therapeutic efficacy of DOC and an increase in DOC concentration in the tumor tissues as reported by Ren *et al.* [57].

The acoustically mediated delivery of multiple chemotherapeutics to treat liver tumors has not been extensively explored. Shen *et al.* investigated the efficacy of MB-mediated US to deliver cisplatin, mitomycin, and 5-fluorouracil for the treatment of s.c. HepG2 liver tumor in a mouse model [60]. Mice received an i.v. infusion of cisplatin (1 mg/kg), mitomycin (0.5 mg/kg) and 5-fluorouracil (5 mg/kg). Subsequently, a bolus of SonoVue® MBs was intravenously administered, and the tumors were exposed to US pulses (commercial US device from Jiangsu Han

Mei Biotechnology, China; 20 kHz, 40% DC, 2 W/cm²) for 1 min. The treatment was repeated once every other day for 2 weeks. One can already note that the center frequency of US pulses, i.e. 20 kHz, is far below the conventionally used frequencies in other preclinical scenarios (around 1 MHz). The authors showed that the acoustically mediated delivery of this drug cocktail induced a significant increase in tumor cell apoptosis compared to the chemotherapy alone (79 ± 11% *versus* 47 ± 11%). In addition, they demonstrated that the acoustically mediated delivery of the drug cocktail prolonged the survival time of mice in comparison to the chemotherapy treatment alone (68 ± 31 days *versus* 57 ± 18 days). Moreover, they confirmed these results in an orthotopic liver tumors in a mouse model, thus demonstrating for the first time that MB-mediated US can efficiently deliver multiple chemotherapeutics for the treatment of liver tumors.

4. Clinical trials

So far, few clinical studies have been conducted or are recruiting patients to investigate the effectiveness and the tolerability for the treatment of digestive cancers.

4.1. Treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma, from primary tumor to metastases

At the Haukeland University Hospital (Norway), the therapeutic efficacy and tolerability of chemotherapeutic delivery using MB-assisted US were investigated for the treatment of inoperable pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) [64–66]. Ten patients were included in the phase I study. Gemcitabine (100 mg/m²) was infused intravenously over 30 min. During the last 10 min of chemotherapy, an abdominal echography was achieved to define the position of pancreatic tumor. At the end of chemotherapy, half milliliter of SonoVue® MBs followed by 5 mL saline was intravenously administered every 3.5 min to ensure their presence throughout the whole US treatment. Pancreatic tumors were insonated with US (1.9 MHz, MI 0.2, 1% DC, cumulative US exposure of 18.9 s) using a 4C curvilinear probe connected to a LOGIQ 9 scanner (GE Healthcare). Clinical data revealed that acoustically mediated gemcitabine delivery did not induce any severe side effects in comparison to the chemotherapy on its own. All patients tolerated well an enhanced number of gemcitabine cycles after acoustically mediated drug delivery in comparison with chemotherapy alone from historical controls, thus resulting in improvement in the patient's health. In addition, tumor size and development were monitored using positron emission tomography (PET) and computed tomography (CT) imaging and characterized according to the Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) criteria. Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status was used to assess the therapeutic effectiveness of acoustically mediated drug delivery. One patient showed a two-fold decrease in tumor size after 12 treatment cycles. The patient was discharged from a clinical trial for radiotherapy followed by a pancreatectomy. The maximum tumor diameter was partially reduced in five of the 10 patients from the first to last treatment cycle. These patients were further treated with

a consolidative radiotherapy or received an i.v. infusion of 5-fluorouracil, leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin (FOLFIRINOX scheme). The median survival was significantly increased after acoustically mediated drug delivery compared to chemotherapy alone (17.6 versus 8.9 months; $p = 0.001$).

In collaboration with Haukeland University Hospital (Norway), the Thomas Jefferson University (USA) leads a phase I/II study on the delivery of standard chemotherapy regimen (*i.e.* gemcitabine+nab-paclitaxel or FOLFIRINOX) using MB-assisted US for the treatment of unresectable, locally advanced but also metastatic PDAC (NCT 04821284). One hundred and twenty patients are under enrollment. In the arm I, the patients will receive either an i.v. infusion of gemcitabine and nab-paclitaxel over 60 minutes on days 1, 8, and 15, or an i.v. infusion of FOLFIRINOX regimen on days 1 and 2. At the end of chemotherapy, SonoZoid® MBs will be administered intravenously over 20 minutes and the tumors will be exposed to US. The doses of chemotherapeutics and MBs as well as US parameters, probe, and scanner are not described. The treatments will be repeated every 28 days for up to 3 chemotherapy cycles for gemcitabine and nab-paclitaxel, and every 14 days for up to 7 cycles for FOLFIRINOX regimen in the absence of disease progression or intolerable toxicity. In the arm II, the patients will receive the same chemotherapy cycles as previously described in arm I but MBs will not be administered and US pulses not applied. All clinical data (*e.g.* tumor volume, blood tests, *etc.*) will be compared between both groups of patients. The progression-free survival will also be monitored up to 3 years.

In phase 2 clinical trial (NCT 04146441), St. Olavs Hospital (Norway) investigates the therapeutic potential of MB-assisted US to increase the therapeutic efficacy of FOLFIRINOX regimen in the treatment of locally advanced PDAC. This clinical trial is recruiting 30 patients. The patients will receive an i.v. infusion of FOLFIRINOX regimen. At the end of chemotherapy, 1 mL of SonoVue® MBs will be intravenously administered 9 times at 3.5-minute intervals to ensure their presence throughout the whole US treatment. This treatment will last for 31.5 minutes every treatment day. This phase 2 study does not describe neither the US parameters used in this protocol. The primary aim of this study is to assess the efficacy of MB-assisted US to increase the therapeutic effectiveness of FOLFIRINOX regimen. To achieve this objective, a group of patients will be receiving an acoustically mediated delivery of systemic FOLFIRINOX regimen and their clinical data will be compared to those of patients treated with the FOLFIRINOX regimen only. The volume of primary PDAC tumors will be measured using CT scan before treatment and after 1 treatment cycle. The number of down-staged tumors from stage III to stage II will also be determined at 8 weeks and 1 year. Finally, the side effects will be registered and defined according to Common Toxicity Criteria (CTC).

4.2. Treatment of primary pancreatic carcinoma and hepatic metastases from digestive system

A safety study of chemotherapeutic delivery using MB-assisted US for the treatment of pancreatic carcinoma and hepatic metastases from gastrointestinal tumors was conducted at

Beijing Cancer Hospital, China (NCT 02233205) [67,68]. The clinical trial enrolled 12 patients, including one patient with primary pancreatic carcinoma and 11 patients with hepatic metastases from pancreas (1), colon (9), and gallbladder (1) carcinomas. The therapeutic schedule was as follows: Chemotherapy was intravenously infused as monotherapy (*e.g.* irinotecan) and combination therapy (*e.g.* FOLFIRI+Cetuximab, FOLFIRINOX). Thirty minutes after i.v. infusion of chemotherapy, 1 mL of SonoVue® MBs was intravenously injected and was repeated five times in 20 min. A C1-5 abdominal convex probe (GE Healthcare, USA) was positioned on the tumor lesion, and US was applied at different MIs (from 0.4 to 1) in contrast mode using a LogiQ E9 scanner (GE Healthcare). The primary objectives of this clinical study were to assess the tolerability of this protocol but also to explore the highest MI and US treatment time that patients can tolerate. Wang *et al.* reported that all 12 patients exhibited no serious adverse events, which can be resolved with symptomatic medication. Moreover, they described that the increase in MI did not worsen the severity of side effects, thus suggesting MB-assisted US treatment is a tolerable procedure. The secondary objectives were to assess the effectiveness of this protocol by monitoring the tumor size using magnetic resonance imaging (MRI) and contrast-enhanced CT scan (CECT) according to the RECIST criteria. Six of the 12 patients had stable disease, while only one patient exhibited a partial response after the first treatment cycle. The median progression-free survival was 91 days. This clinical study has major limitations: (i) it is difficult to make a clear conclusion and a comparison between patients as they did not receive the same chemotherapeutics, number of treatment cycles nor MI; (ii) the tolerability and efficacy results should be compared with those for patients receiving the chemotherapy alone in order to bring clear evidence of the therapeutic benefit of acoustically mediated drug delivery.

4.3. Treatment of hepatic metastases from colorectal cancers

At Tours Hospital (France), a proof of concept study (NCT 03458975) has been implemented in 2017 to investigate the therapeutic potential of chemotherapeutic delivery using a dedicated 1.5-D ultrasound probe and a modified US scanner in patients with non-resectable hepatic metastases from colorectal cancer and eligible for antibody-based immunotherapy in combination with chemotherapy (FOLFIRI+bevacizumab). For each participant, 2 or 4 liver metastases are selected by the radiologist. For each pair of liver metastases, one will be randomized to receive sonoporation (US waves and SonoVue® MBs) used as an optimized method for *i.t.* delivery of systemic chemotherapy and the two other metastases will receive only MBs and chemotherapy. A dedicated 1.5-D US probe has been designed and connected to a modified Aixplorer imaging platform that is able to generate therapeutic pulses. The primary aim of this clinical trial is to assess the objective response at 2 months for hepatic metastases treating optimized and targeted delivery of systemic chemotherapy regimen including 5-fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI treatment) and bevacizumab (or

cetuximab) in comparison with those receiving this regimen only. This response is defined as a decrease of at least 30% in the longer diameter of each selected liver metastasis measured using spiral CT scan. The secondary aim is to determine the safety and tolerability of this protocol during the 3 months of follow-up based on the Common Terminology Criteria for Adverse Events (US National Cancer Institute). In addition, the tumor density and vascularity are assessed using CECT, MRI, and DCE-US. The serum concentrations of therapeutic antibody and cytokines are measured. This clinical trial is currently recruiting 15 patients.

4.4. Treatment of liver metastasis from breast and colorectal cancers

Since 2018, St. Olavs Hospital (Norway) has also led a phase I/II clinical trial to study the efficacy of the delivery of standard chemotherapy regimen using MB-assisted US in patients with hepatic metastases from breast cancer and CRC (NCT 03477019) on a total of 60 patients to be enrolled. CT imaging will be performed before the treatment starts in order to preselect two metastases in each patient's liver, which will be randomized to be either the targeted and treated lesion (chemotherapy regimen + MB-assisted US) or control lesion (chemotherapy regimen + MBs). The patients will receive an i. v. infusion of standard chemotherapy regimen. As previously described, a bolus dose of 1 mL SonoVue® MBs will be intravenously administered every 3.5 minutes and repeated 9 times (total duration of treatment: 31.5 minutes). The targeted hepatic metastasis will be exposed to US pulses generated by a clinically approved US scanner and probe. This treatment will be repeated maximally four times at 2- or 3-week intervals, depending on the patient's diagnose and therapeutic protocol. The authors did not provide a detailed therapeutic scheme. The size of the treated and control hepatic metastases will be measured using CT scan up to 10–12 weeks after the baseline CT examination. The CTC will be used for grading toxicity up to 8 weeks.

4.5. Treatment of hepatic metastases and abdominal wall tumors

Recently, Shen *et al.* reported that the therapeutic response of hepatic metastases and abdominal wall tumors to chemotherapy regimen was significantly increased after acoustically mediated drug delivery (Tumor Hospital of Nantong University, China) [60]. An iU22 US scanner (Philips, USA) was used to locate the tumors and to position the therapeutic probe on the patient's surface. The patients received an i.v. infusion of laboratory-made CO₂-loaded MBs, then the tumors were exposed to US pulses (20 kHz, 2 W/cm², 40% DC) for 10 min. Ten minutes later, a second infusion of MBs was performed, then followed with an US treatment. Each patient was treated thrice a day for about 30 min. One treatment course was 5 days with 2 days of rest. For patient 1 (with hepatic metastases), chemotherapy regimen was composed of i.v. infusion of oxaliplatin (130 mg/m²) on day 1 and oral administration of capecitabine (1000 mg/m²) twice daily on days 1–14. Patient 2 (with hepatic metastases) received an i.v.

infusion of oxaliplatin (130 mg/m²) and calcium folate (200 mg/m²), followed by a 24-h continuous i.v. infusion of 5-FU (500 mg/m²). For patient 3 (with abdominal wall metastases), chemotherapy regimen was constituted of an i.v. infusion of epirubicin (50 mg/m²) on day 1, a 2-h i.v. infusion of cisplatin (30 mg/m²) on days 1–3 and followed by a 24-h continuous i.v. infusion of 5-FU (500 mg/m²) on days 1–5. The size of tumor lesions in patients 1 and 2 was measured using CT scan, while the size and the metabolic activity of tumor lesion in patient 3 were determined using ¹⁸F-FluoroDeoxyGlucose PET/CT before and after treatment. No side effect was observed during and after MB-assisted US treatment. Acoustically-mediated drug delivery decreased the size of hepatic metastases from patients 1 and 2, and reduced the metabolic activity and the diameter of the abdominal wall tumor from patient 3. In addition, the symptoms of abdominal distention and pain in patients 1 and 2 were relieved. The current study suffers from major limitations. It is not clearly justified why three different drugs were used, so each patient was treated with a different chemotherapy, which makes the comparison between the results of the three patients not possible. In addition, efficacy results should be compared to a control group with patients receiving the chemotherapy alone in order to provide clear evidence that MB-assisted US improves therapeutic effectiveness of chemotherapy regimen.

5. Conclusions

Preclinical studies show that MB-assisted US enhances i.t. bioavailability of anti-cancer drugs, thus increasing their therapeutic efficacy, while minimizing their nonspecific accumulation in normal tissues and by that reducing side effects. The improvement in therapeutic effectiveness results in a decrease of tumor growth and a prolongation of animal survival. MB-assisted US efficiently delivers a single chemotherapeutics as well as a combination of chemotherapeutics in s.c. and orthotopic digestive tumors in small animal models. A growing number of clinical trials are registered to investigate the therapeutic effectiveness and the tolerability of MB-mediated US for the treatment of primary digestive tumors and hepatic metastases from digestive system. Some of them show promising results such as a decrease in tumor growth and an increase in patient survival. Nevertheless, firm conclusions cannot be made on the therapeutic benefit of this method in humans as only partial results are available now.

6. Expert opinion

Targeted delivery of chemotherapeutics using MB-assisted US has the potential to become a clinically accepted strategy for improving local chemotherapy in digestive oncology. A growing number of preclinical investigations have successfully reported the therapeutic benefits of MB-assisted US in the delivery of chemotherapeutics in several animal models of digestive cancers. For 66% of the preclinical studies on digestive cancers, the efficacy of this method has been evaluated on s.c. digestive tumors in rodent models. It must be noted that the preclinical studies on liver cancer were mainly performed on orthotopic tumor models, while those on colorectal

and pancreatic cancers were carried out using s.c. tumor models. In addition, less than 5% of these studies have been achieved on animal models of metastasis. Subcutaneous tumor models are interesting as they allow to evaluate different protocols rather simply and rapidly. However, their clinical relevance is still questionable. Indeed, the physiology of the tumor and its response to chemotherapy vary strongly between s.c. tumors and orthotopic tumors and metastases, but also between tumors derived from a xenograft of immortalized cells of animal and human tumors. To overcome this last limitation, patients-derived tumors could be exploited in the validation of therapeutic protocols. In addition, the contribution of the host immunity to the tumor response to chemotherapy after acoustically mediated drug delivery is still deficient in the available literature. Indeed, more than 60% of the preclinical studies used digestive tumors in immunodeficient mouse model that did not allow this contribution to be studied. Large animal studies are still deficient and might face challenging and unpredicted physical limitations including US penetration depth and US attenuation, but also biological limitations (*i.e.* plasma life of MBs and chemotherapeutics). Future preclinical investigations should be achieved in more clinically relevant animal models including syngeneic or patient-derived orthotopic tumors and metastatic models in small and large syngeneic or immunodeficient animals, respectively, in order to replicate as much as possible the clinical physiological situation.

Moreover, preclinical and clinical investigations show that the coadministration or the successive administration of clinically approved MBs and chemotherapeutics can be perceived as the fastest strategy to clinical translation, while greatest therapeutic benefit may lie in the design of drug-loaded MBs. The former approach is used in 37% of the preclinical studies and 100% clinical trials on digestive cancers. This approach is likely to be the best option for clinical translation as it combines clinically approved chemotherapeutics and MBs with the possibility to tune separately the volume and the concentration of both compounds before their i.v. injection. However, the efficacy of acoustically mediated drug delivery using the coadministration of MBs and chemotherapeutics is strongly dependent on the sufficient accumulation of both agents in tumor microvasculature. Similar pharmacokinetics and biodistribution of MBs and chemotherapeutics are not guaranteed due to their different physico-chemical properties. Thus, drug-loaded MBs have been designed to overcome such issues. This approach has been investigated in 63% of the preclinical studies but none in the clinical trials. Drug-loaded MBs may hold the greatest therapeutic potential, as chemotherapeutics and MBs are colocalized at the same time in the tumor microvasculature and a local release of the drug is triggered upon US exposure. However, these MBs require extensive and costly characterization and evaluation before they can be clinically approved.

Furthermore, it is not straightforward to directly compare the results of most preclinical studies because of the heterogeneity in US devices used and the lack of standardized US settings. Surprisingly, clinical US scanners are exploited in only 23% of the preclinical studies, while the use of these devices

would appear to be relevant to facilitate the clinical transfer of this method. However, the US settings on such equipment are limited for safety reasons. Here lies the main reason why, over 50% of the preclinical studies used commercial or lab-made US devices, which have been designed to control many US settings for subsequently being optimized for drug delivery. However, such devices are not clinically approved. We believe that a credible alternative to these devices would be the use of open clinical US scanners or modified therapeutic US scanners. Concerning US protocols, the majority of studies used a single set of US parameters to demonstrate the therapeutic potential of acoustically mediated drug delivery. These studies did not describe whether US parameters are the results of a deep investigation of their efficiency in delivering anti-cancer drugs or of an empirical analysis based on available literature. The former option is the most appropriate for safely optimizing US protocol, but it remains expensive and can come up against ethical considerations in animal experimentation due to the number of animals required for such investigations.

Most preclinical studies have clearly reported that MB-mediated US improves the therapeutic effectiveness of chemotherapeutics by monitoring the tumor size but also tumor perfusion in few cases. Unfortunately, the correlation between the improvement in therapeutic effectiveness of chemotherapeutics and its enhanced i.t. bioavailability is often lacking. Indeed, only 31% of the preclinical studies explored and showed that an enhanced therapeutic effectiveness could be attributed to increased i.t. drug concentration. In addition, the published results of the first clinical trials did not investigate such a correlation. Future clinical trials apparently will not consider the assessment of i.t. drug concentration after MB-mediated US. We believe that in the context of phase 0/I clinical trials, this assessment can be planned for patients whose tumors are scheduled for surgical excision. Next to this consequence, another expected one of acoustically mediated delivery of chemotherapeutics is the reduction of drug deposition in healthy tissues. This outcome is expected to be more significant for targeted release from drug-loaded MBs compared to the coadministration or the successive administration of chemotherapeutics and MBs where chemotherapeutics can freely penetrate in healthy tissues anyway, without US application. Less than 6% of the preclinical studies investigated and reported a decrease in drug accumulation into the healthy tissues. Such investigation cannot be performed in humans due to the invasive nature of the biopsy procedures. However, the side effects related to a nonspecific accumulation of drugs in healthy organs can be monitored by measuring body weight, by assaying serum biomarkers and by assessing the physiology of organs using imaging modalities.

Finally, one of the central questions in the development of MB-assisted US for drug delivery in digestive cancers is: What are the expectations of the clinicians in terms of therapeutic efficacy? Indeed, the objectives in terms of therapeutic efficacy are not clearly established in preclinical and clinical studies. Is a 30% reduction in tumor volume sufficient to perform surgical excision of the tumor? Is total eradication of the tumor desired? These objectives have to be clearly defined because

the developments of US devices and the optimizations of therapeutic schemes will not evidently be the same to induce a partial or total reduction in tumor volume.

Abbreviation list

CRC: Colorectal cancer
 CECT: Contrast-enhanced computed tomography
 CT: Computed tomography
 CTC: Common Toxicity Criteria
 DC: Duty cycle
 DOC: Docetaxel
 DOX: Doxorubicin
 ECOG: Eastern cooperative oncology group
 FDG: Fluorodeoxyglucose
 FOLFIRI: Calcium folinate, 5-fluorouracil, irinotecan
 FOLFIRINOX: Calcium folinate, 5-fluorouracil, irinotecan, oxaliplatin
 H&E: Hematoxylin and eosin
 i.p.: intraperitoneal
 i.v.: intravenous
 i.t.: intratumoral
 MB: Microbubbles
 MRI: Magnetic resonance imaging
 PC: Pancreatic cancer
 PCNA: Proliferating cell nuclear antigen
 PDAC: Pancreatic ductal adenocarcinoma
 PET: Positron emission tomography
 PNP: Peak negative pressure
 PRF: Pulse repetition frequency
 RECIST: Response evaluation criteria in solid tumors
 s.c.: subcutaneous
 TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
 US: Ultrasound

Declaration of interest

The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the materials. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

Funding

This work was supported by INCa/DGOS PRRTK15-TK/Sonchimio (2017-000159-15), Ligue Contre le Cancer, Cancéropôle Grand-Ouest, Inserm and University of Tours (AB).

ORCID

Jean-Michel Escoffre  <http://orcid.org/0000-0003-1041-6950>
 Ayache Bouakaz  <http://orcid.org/0000-0001-5709-7120>

References

Papers of special note have been highlighted as either of interest (*) or of considerable interest (**) to readers.

1. International Agency for Research on Cancer. WHO classification of tumours of the digestive system. Lyon France: IARC; 2010.
2. Arnold M, Abnet CC, Neale R, et al. Global burden of 5 major types of gastrointestinal cancer. *Gastroenterology*. 2020;159:335–349.
3. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancer in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71:209–249.






4. Bekail-Saab T, El-Rayes B, Pawlik T. Handbook of gastrointestinal cancers: evidence-based treatment and multidisciplinary patient care. New York: Demos Medical; 2019.
5. Bentrem D, Benson AB. Gastrointestinal malignancies. Berlin Germany: Springer International Publishing; 2016.
6. Minchinton AI, Tannock IF. Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:583–592.
7. Weinberg RA. The biology of cancer. New York: Garland Science; 2014.
8. Zhang Y, Zhang M, Fan X, et al. Effect of STAT3 decoy oligodeoxynucleotides mediated by ultrasound-targeted microbubbles combined with ultrasound on the growth of squamous cell carcinoma of the esophagus. *Oncol Lett*. 2019;17:2151–2158.
9. Nesbitt H, Logan K, Thomas K, et al. Sonodynamic therapy complements PD-L1 immune checkpoint inhibition in a murine model of pancreatic cancer. *Cancer Lett*. 2021;517:88–95.
10. Lee S, Kim JH, Moon H, et al. Combined treatment of sorafenib and doxorubicin-loaded microbubble-albumin nanoparticle complex for hepatocellular carcinoma: a feasibility study. *Plos One*. 2020;15:e0243815.
11. Lammertink BHA, Bos C, Deckers R, et al. Sonochemotherapy: from bench to bedside. *Front Pharmacol*. 2015;6:138.
12. Kooiman K, Roovers S, Langeveld SAG, et al. Ultrasound-responsive cavitation nuclei for therapy and drug delivery. *Ultrasound Med Biol*. 2020;46:1296–1325.
- An excellent review on microbubble-assisted ultrasound. Emphasis is directed to therapy and drug delivery application, nonetheless the interaction between microbubbles and ultrasound is described in terms that are clear and easy to understand
13. Prieset A, Bonneau C, Kazuyoshi S, et al. Endothelial cells, first target of drug delivery using microbubble-assisted ultrasound. *Ultrasound Med Biol*. 2020;46:1565–1583.
- An excellent review on the bioeffects of microbubble-assisted ultrasound on endothelial barriers, including aspects on their permeabilization, the restoration of their integrity, the molecular and cellular mechanisms involved in both these processes
14. Sennoga CA, Kanbar E, Auboire L, et al. Microbubble-mediated ultrasound drug delivery and therapeutic monitoring. *Expert Opin Drug Deliv*. 2017;14:1031–1043.
15. Hayashi S, Mizuno M, Yoshida J, et al. Effect of sonoporation on cationic liposome-mediated IFN β gene therapy for metastatic hepatic tumors of murine colon cancer. *Cancer Gene Ther*. 2009;16:638–643.
16. Keller SB, Suo D, Wang YN, et al. Image-guided treatment of primary liver cancer in mice leads to vascular disruption and increased drug penetration. *Front Pharmacol*. 2020;11:584344.
17. Lin L, Fan Y, Gao F, et al. UTMD-promoted co-delivery of gemcitabine and miR-21 inhibitor by dendrimer-entrapped gold nanoparticles for pancreatic cancer therapy. *Theranostics*. 2018;8:1923–1939.
18. Watanabe Y, Aoi A, Horie S, et al. Low-intensity ultrasound and microbubbles enhance the antitumor effect of cisplatin. *Cancer Sci*. 2008;99:2525–2531.
19. Lin CY, Huang YL, Li JR, et al. Effects of focused ultrasound and microbubbles on the vascular permeability of nanoparticles delivered into mouse tumors. *Ultrasound Med Biol*. 2010;36:1460–1469.
20. Chen M, Liang X, Gao C, et al. Ultrasound triggered conversion of porphyrin/camptothecin-fluoroxuridine triad microbubbles into nanoparticles overcomes multidrug resistance in colorectal cancer. *ACS Nano*. 2018;12:7312–7326.
21. Carvalho C, Santos RX, Cardoso S, et al. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr Med Chem*. 2009;16:3267–3285.
22. Gabizon AA. Pegylated liposomal doxorubicin: metamorphosis of an old drug into a new form of chemotherapy. *Cancer Invest*. 2011;19:236–424.
23. Barenholz YC. Doxil – the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *J Control Release*. 2012;160:117–134.

24. O'Brien ME, Wigler N, Inbar M, et al.; CAELYX Breast cancer study Group. Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX/Doxil) versus conventional for first-line treatment of metastatic cancer. *Ann Oncol.* 2004;15:440–449.
25. Lin CY, Tseng HC, Shiu HR, et al. Ultrasound sonication with microbubbles disrupts blood vessel and enhances tumor treatments of anticancer nanodrug. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:2143–2152.
26. Lin CY, Li JR, Tseng HC, et al. Enhancement of focused ultrasound with microbubbles on the treatments of anticancer nanodrug in mouse tumors. *Nanomedicine.* 2012;8:900–907.
27. Charalambous A, Mico V, McVeigh LE, et al. Targeted microbubbles carrying lipid-oil-nanodroplets for ultrasound-triggered delivery of the hydrophobic drug, combrestatin A4. *Nanomedicine.* 2021;36:102401.
28. Ingram N, McVeigh LE, Abou-Saleh RH, et al. Ultrasound-triggered therapeutic microbubbles enhance the efficacy of cytotoxic drugs by increasing circulation and tumor drug accumulation and limiting bioavailability and toxicity in normal tissues. *Theranostics.* 2020;10:10973–10992.
- **The combination of irinotecan- or SN38-loaded MBs and US leads to significant decrease in tumor growth by increasing i.t. drug bioavailability but also by limiting their unspecific accumulation in healthy tissues and systemic side effects**
29. Barré T, Dallonneau E, Lecomte T, et al. Sonoporation for local and targeted delivery of a therapeutic antibody in colorectal cancer: in vivo proof of concept. 15th. Utrecht the Netherlands: International Society for Therapeutic Ultrasound. 2015.
30. Dwivedi P, Kiran S, Han S, et al. Magnetic targeting and ultrasound activation of liposome-microbubble conjugate for enhanced delivery of anticancer therapies. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2020;12:23737–23751.
31. Kang HJ, Lee JY, Park EJ, et al. Synergistic effects of pulsed focused ultrasound and a doxorubicin-loaded microparticle-microbubble complex in a pancreatic cancer xenograft mouse model. *Ultrasound Med Biol.* 2020;46:3046–3058.
32. Tinkov S, Coester C, Serba S, et al. New doxorubicin-loaded phospholipid microbubbles for targeted tumor therapy: in-vivo characterization. *J Control Release.* 2010;148:368–372.
33. Yu MH, Lee JY, Kim HR, et al. Therapeutic effects of microbubbles added to combined high-intensity focused ultrasound and chemotherapy in a pancreatic cancer xenograft model. *Korean J Radiol.* 2016;17:779–788.
34. Xing L, Shi Q, Zheng K, et al. Ultrasound-mediated microbubble destruction (UMMD) facilitates the delivery of CA18-9 targeted and paclitaxel loaded mPEG-PLGA-PLL nanoparticles in pancreatic cancer. *Theranostics.* 2016;6:1573–1587.
35. Logan KA, Nesbitt H, Callan B, et al. Synthesis of a gemcitabine-modified phospholipid and its subsequent incorporation into a single microbubble formulation loaded with paclitaxel for the treatment of pancreatic cancer using ultrasound-targeted microbubble destruction. *Eur J Pharm Biopharm.* 2021;165:374–382.
36. Bressand D, Novell A, Girault A, et al. Enhancing Nab-paclitaxel delivery using microbubble-assisted ultrasound in a pancreatic cancer model. *Mol Pharm.* 2019;16:3814–3822.
- **First preclinical study reporting the acoustically-mediated delivery of drug-loaded nanoparticles, Abraxane, in s.c. human pancreatic cancer mouse model**
37. Sheng Y, Beguin E, Nesbitt H, et al. Magnetically responsive microbubbles as delivery vehicles for targeted sonodynamic and antimetabolite therapy of pancreatic cancer. *J Control Release.* 2017;262:192–200.
38. Gao J, Nesbitt H, Logan K, et al. An ultrasound responsive microbubble-liposome conjugate for targeted irinotecan-oxaliplatin treatment of pancreatic cancer. *Eur J Pharm Biopharm.* 2020;157:233–240.
- **This preclinical study is the first reported example of acoustically-mediated codelivery of two chemotherapeutics (here, irinotecan and oxaliplatin) using liposome-loaded MBs**
39. Delaney LJ, Eisenberg JR, Brown D, et al. Gemcitabine-loaded microbubble system for ultrasound and imaging. *Acta Biomater.* 2021;130:385–394.
40. Gao F, Wu J, Niu S, et al. Biodegradable, pH-sensitive hollow mesoporous organosilica nanoparticle (HMON) with controlled release of pirfenidone and ultrasound-target-microbubble-destruction for pancreatic cancer treatment. *Theranostics.* 2019;9:6002–6018.
41. Kotopoulos S, Delalande A, Popa M, et al. Sonoporation-enhanced chemotherapy significantly reduces primary tumor burden in an orthotopic pancreatic cancer xenograft. *Mol Imaging Biol.* 2014;16:53–62.
- **First preclinical investigation demonstrating that MB-assisted US potentiates the therapeutic effectiveness of gemcitabine in orthotopic pancreatic cancer mouse model**
42. Lin L, Fan Y, Jin L, et al. UTMD-promoted co-delivery of gemcitabine and miR-21 inhibitor by dendrimer-entrapped gold nanoparticles for pancreatic cancer therapy. *Theranostics.* 2018;8:1923–1939.
43. Nesbitt H, Sheng Y, Kamila S, et al. Gemcitabine loaded microbubbles for targeted chemo-sonodynamic therapy of pancreatic cancer. *J Control Release.* 2018;279:8–16.
44. Kim S, Signorovitch J, Yang H, et al. Comparative effectiveness of nab-paclitaxel plus gemcitabine vs FOLFIRINOX in metastatic pancreatic cancer: a retrospective nationwide chart review in the United States. *Adv Ther.* 2018;35:1564–1577.
45. Russo S, Ammori J, Eads J, et al. The role of neoadjuvant therapy in pancreatic cancer: a review. *Future Oncol.* 2016;12(5):669–685.
46. Adamska A, Domenichini A, Falasca M. Pancreatic ductal adenocarcinoma: current and evolving therapies. *Int J Mol Sci.* 2017;18:1338.
47. Okuda K, Ohtsuki T, Obata H, et al. Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients. *Cancer.* 1985;56:918–928.
48. Chen K, Zhang L. Effect of drug-loaded microbubbles combined with ultrasound on the apoptosis of cancer cells and the expression of Bax and Bcl-2 in a rabbit VX2 liver tumor model. *Biosci Rep.* 2019;39(5):BSR20181144.
49. Cochran MC, Eisenbrey JR, Soulen MC, et al. Disposition of ultrasound sensitive polymeric drug carrier in a rat hepatocellular carcinoma model. *Acad Radiol.* 2011;18:1341–1348.
50. Eisenbrey JR, Soulen MC, Wheatley MA. Delivery of encapsulated doxorubicin by ultrasound-mediated size reduction of drug-loaded polymer contrast agents. *IEEE Trans Biomed Engineer.* 2010;57:24–28.
51. Gong Y, Wang Z, Dong G, et al. Low-intensity focused ultrasound mediated localized drug delivery for liver tumors in rabbits. *Drug Deliv.* 2016;23:2280–2289.
52. Keller SB, Suo D, Wang Y-N, et al. Image-guided treatment of primary liver cancer in mice leads to vascular disruption and increased drug penetration. *Front Pharmacol.* 2020;11:584344.
53. Lee L, Moon M, Han H, et al. Antitumor effects of intra-arterial delivery of albumin-doxorubicin nanoparticle conjugated microbubbles combined with ultrasound-targeted microbubble activation on VX2 rabbit liver tumors. *Cancer.* 2019;11(4):581.
54. Lee S, Kim JH, Moon H, et al. Combined treatment of sorafenib and doxorubicin-loaded microbubble-albumin nanoparticle complex for hepatocellular carcinoma: a feasibility study. *Plos One.* 2020;15(12):e0243815.
55. Zhu F, Jiang Y, Luo F, et al. Effectiveness of localized ultrasound-targeted microbubble destruction with doxorubicin liposomes in H22 mouse hepatocellular carcinoma model. *J Drug Target.* 2015;23(4):323–334.
56. Kang J, Wu X, Wang Z, et al. Antitumor effect of docetaxel-loaded lipid microbubbles combined with ultrasound-targeted microbubble activation on VX2 rabbit liver tumors. *J Ultrasound Med.* 2010;29(1):61–70.
57. Ren S-T, Shen S, He X-Y, et al. The effect of docetaxel-loaded micro-bubbles combined with low-frequency ultrasound in H22 hepatocellular carcinoma-bearing mice. *Ultrasound Med Biol.* 2016;42(2):549–560.

58. Zhang Y, Chang R, Li M, et al. Docetaxel-loaded lipid microbubbles combined with ultrasound-triggered microbubble destruction for targeted tumor therapy in MHCC-H cells. *Oncol Targets Ther.* [2016;19:4763–4771](#).
59. Lv Y, Hao L, Hu W, et al. Novel multifunctional pH sensitive nanoparticles loaded into microbubbles as drug delivery vehicles for enhanced tumor targeting. *Sci Rep.* [2016;6:29231](#).
60. Shen Z, Shao J, Zhang J, et al. Ultrasound cavitation enhanced chemotherapy: *in vivo* research and clinical application. *Exp Biol Med.* [2020;245:1200–1212](#).
61. Montero A, Fossella F, Hortobagyi G, et al. Docetaxel for treatment of solid tumors: a systematic review of clinical data. *Lancet Oncol.* [2005;6:229–239](#).
62. Yared JA, Tkaczuk KHR. Update on taxane development: new analogs and new formulations. *Drug Des Devel Ther.* [2012;6:371–384](#).
63. Zhang Y, Zhang W, Wang Y, et al. Emerging nanotaxanes for cancer therapy. *Biomaterials.* [2021;272:120790](#).
64. Kotopoulos S, Dimcevski G, Gilja OH, et al. Treatment of human pancreatic cancer using combined ultrasound, microbubbles, and gemcitabine: a clinical case study. *Med Phys.* [2013;40:072902](#).
65. Dimcevski G, Kotopoulos S, Bjanec T, et al. A human clinical trial using ultrasound and microbubbles to enhance gemcitabine treatment of inoperable pancreatic cancer. *J Control Release.* [2016;243:172–181](#).
66. Castle J, Kotopoulos S, Forsberg F. Sonoporation for augmenting chemotherapy of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Methods Mol Biol.* [2020;2059:191–205](#).
67. Wang Y, Li Y, Yan K, et al. Clinical study of ultrasound and microbubbles for enhancing chemotherapeutic sensitivity of malignant tumors in digestive system. *Chin J Cancer Res.* [2018;30:553–563](#).
68. de Maar J, Rousou C, van Elburg B, et al. Ultrasound-mediated drug delivery with a clinical ultrasound system: *in-vitro* evaluation. *Front Pharmacol.* [2021;12:768436](#).

Article

Serum and Soleus Metabolomics Signature of *Klf10* Knockout Mice to Identify Potential Biomarkers

Nadine Baroukh ¹ , Nathan Canteleux ¹, Antoine Lefèvre ¹, Camille Dupuy ¹ , Cécile Martias ¹, Antoine Passet ¹ , Malayannan Subramaniam ², John R. Hawse ², Patrick Emond ^{1,3} , Philippe Pouletaut ⁴ , Sandrine Morandat ⁴, Sabine F. Bensamoun ⁴ and Lydie Nadal-Desbarats ^{1,*}

¹ UMR 1253, iBrain, University of Tours, Inserm, 37044 Tours, France; nadine.baroukh@univ-tours.fr (N.B.); canteleux@gmail.com (N.C.); antoine.lefevre@univ-tours.fr (A.L.); camille.dupuy@alice.fr (C.D.); cmartias@pasteur-guadeloupe.fr (C.M.); antoine.passet@univ-tours.fr (A.P.); patrick.emond@univ-tours.fr (P.E.)

² Department of Biochemistry and Molecular Biology, Mayo Clinic College of Medicine, Rochester, MN 55905, USA; subramaniam.malayannan@mayo.edu (M.S.); hawse.john@mayo.edu (J.R.H.)

³ CHRU Tours, Medical Biology Center, 37000 Tours, France

⁴ Biomechanics and Bioengineering Laboratory, CNRS UMR 7338, Université de Technologie de Compiègne, 60200 Compiègne, France; philippe.pouletaut@utc.fr (P.P.); sandrine.morandat@utc.fr (S.M.); sabine.bensamoun@utc.fr (S.F.B.)

* Correspondence: lydie.nadal@univ-tours.fr; Tel.: +33-(0)-2-4736-6164



check for updates

Citation: Baroukh, N.; Canteleux, N.; Lefèvre, A.; Dupuy, C.; Martias, C.; Passet, A.; Subramaniam, M.; Hawse, J.R.; Emond, P.; Pouletaut, P.; et al. Serum and Soleus Metabolomics Signature of *Klf10* Knockout Mice to Identify Potential Biomarkers. *Metabolites* **2022**, *12*, 556. <https://doi.org/10.3390/metabo12060556>

Academic Editor: Fidele Tugizimana

Received: 25 May 2022

Accepted: 14 June 2022

Published: 17 June 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The transcription factor Krüppel-like factor 10 (*Klf10*), also known as Tieg1 for TGF β Inducible Early Gene-1) is known to control numerous genes in many cell types that are involved in various key biological processes (differentiation, proliferation, apoptosis, inflammation), including cell metabolism and human disease. In skeletal muscle, particularly in the soleus, deletion of the *Klf10* gene (*Klf10* KO) resulted in ultrastructure fiber disorganization and mitochondrial metabolism deficiencies, characterized by muscular hypertrophy. To determine the metabolic profile related to loss of *Klf10* expression, we analyzed blood and soleus tissue using UHPLC-Mass Spectrometry. Metabolomics analyses on both serum and soleus revealed profound differences between wild-type (WT) and KO animals. *Klf10* deficient mice exhibited alterations in metabolites associated with energetic metabolism. Additionally, chemical classes of aromatic and amino-acid compounds were disrupted, together with Krebs cycle intermediates, lipids and phospholipids. From variable importance in projection (VIP) analyses, the Warburg effect, citric acid cycle, gluconeogenesis and transfer of acetyl groups into mitochondria appeared to be possible pathways involved in the metabolic alterations observed in *Klf10* KO mice. These studies have revealed essential roles for *Klf10* in regulating multiple metabolic pathways whose alterations may underlie the observed skeletal muscle defects as well as other diseases.

Keywords: *Klf10*; metabolomics; metabolic pathways; Warburg effect; mice; soleus; serum; UHPLC-MS

1. Introduction

The transcription factor Krüppel-like factor 10 (*Klf10*), also named TGF- β (Transforming Growth Factor) inducible early gene 1 (*Tieg1*), is part of a complex and specific regulatory transcription system that regulates numerous genes in a variety of cells and tissue types [1–3]. Alterations in the expression of *Klf10* have implications on multiple biological processes (proliferation, differentiation, apoptosis, inflammation) [4], relevant to disease including diabetes, obesity, cataracts, cardiac hypertrophy, and angiogenesis, as well as the development and progression of different cancer types (breast, kidney, pancreas, prostate, and ovarian) [5,6]. *Klf10* is ubiquitously expressed in mammals and exhibits a higher expression in metabolic organs such as the liver, pancreas, muscle, and adipose tissue. *Klf10* controls a variety of biological processes in the liver and skeletal muscle. It

plays a crucial role in the regulation of the circadian clock, driving the expression of genes involved in lipogenesis, gluconeogenesis (with a higher fasting glucose), and glycolysis in the liver, influencing hepatic metabolism [7,8]. Moreover, circadian perturbation may initiate metabolic disorders and tumorigenesis. In this context, it has been shown that *Klf10* is downregulated in type 2 diabetes and cancer [9]. For example, *Klf10* expression is diminished during breast cancer evolution [1,10]. *Klf10* is described as a tumor suppressor gene through TGF- β -induced growth inhibition; its functions are anti-proliferative and pro-apoptotic in cancer cells [11–14]. More recently, *Klf10* has been described to be protective against oral cancer [15] and has been implicated in immune CD4+ T-cell localization in tissues, leading to obesity, insulin resistance, and fatty liver development [16]. Data indicate that KLF10 acts as a central pivot, coordinating circadian rhythm together with metabolic pathways and energy metabolism homeostasis [3,17,18].

The generation of *Klf10* knockout (KO) mice [19] has demonstrated its involvement in musculoskeletal tissue deficiencies such as defects in structure and healing of tendons [20,21], hypertrophic cardiomyopathy [2], and bone diseases (osteopenia, osteoporosis) [19,22–25]. In mice, *Klf10* gene deletion results in hyperplasia and structural changes such as hypertrophy and ultrastructure disorganization in the soleus (slow-twitch muscle) and extensor digitorum longus (fast-twitch muscle). It has been shown that *Klf10* deletion induces changes in passive [26] and active [27] behaviors in a fiber type-specific manner. *Klf10* deficient mice have contributed to our understanding of skeletal muscle metabolism, which is central to overall energetic metabolism in the animal. *Klf10* is known to be responsible for important mitochondria regulating functions, affecting succinate dehydrogenase (SDH), cytochrome C oxidase (COX), and the citrate synthase (CS) enzyme activities in the soleus of deficient mice [28].

The metabolome refers to the representation of small chemical molecules (or metabolites) contained in a given biological sample at a specific time. In a biological sense, the metabolome represents a report of multiple cellular processes, including the regulation of the genome, transcriptome, and proteome cascades, and ultimately supports phenotypes and functions. Despite the limit point being the lack of insights between the production and consumption of metabolites, metabolomics has become a powerful tool to better understand the physiology, pathophysiology, or dysregulation of many biological systems [29–31]. Blood (or serum) is frequently used in metabolomics research as well. Indeed, it contains many metabolites from the entire body and gives a global and integrative view of what is occurring at a specific time. Metabolites are known to be involved in a particular biological context, help shed light on alterations in associated metabolic pathways, and can serve as specific biomarkers for a variety of conditions and diseases.

The impact of *Klf10* on metabolism remains unclear and must be further investigated. This study is a continuation of our work demonstrating a role for *Klf10* in muscle metabolism [28]. Here, we describe the metabolomic profile of *Klf10* KO mice at the organismal level (serum) and the tissue level (muscle). This work has led to a better understanding of the role of *Klf10* in metabolism, the identification of specific metabolic pathways regulated by *Klf10*, and the identification of potential biomarkers relevant for skeletal muscle defects/diseases.

2. Results

2.1. Metabolomic Analyses of Serum and Soleus

We aimed to characterize differential metabolomics profiles in the serum and soleus of *Klf10* KO versus wild-type mice. A total of 224 and 246 metabolites were detected in serum and soleus, respectively. The PLS-DA score plot analysis of *Klf10* KO and WT samples of serum and soleus are shown in Figure 1. Results indicate that both serum (Figure 1A) and soleus (Figure 1B) metabolic profiles are distinctly separated between the two groups of mice. The best PLS-DA models for serum retained 96 variables with importance in projection (VIP) with the performance characteristics of $R^2Y = 0.974$, $Q^2 = 0.87$, $CV\text{-ANOVA} = 4.42 \times 10^{-6}$, from which 78 variables showed a p -value < 0.05 . In soleus, the

best PLS-DA score plot used 88 VIP with $R^2Y = 0.93$, $Q^2 = 0.86$, $CV\text{-ANOVA} = 5.46 \times 10^{-7}$, from which 27 variables have a p -value < 0.05 . The VIP represent metabolites with a greater contribution to the separation between groups (*Klf10* KO versus WT). The segregation into two distinguishable groups indicates that *Klf10* gene deletion caused significant changes in the overall metabolome in mice. Of these, all metabolites showing a significant change are listed in Supplementary Table S1 for serum and Table S2 for soleus.

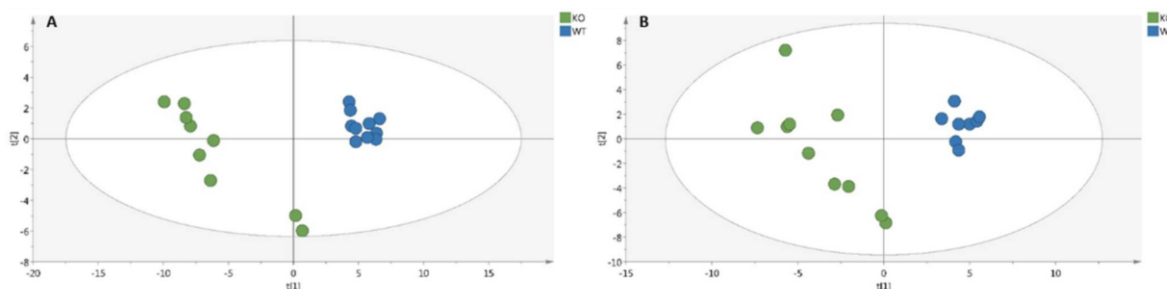


Figure 1. PLS-DA score plot analysis of serum (A) and soleus (B) samples in *Klf10* KO and WT by UHPLC-MS. (A) Metabolome score plots of PLS-DA on serum (WT in blue circle, $n = 10$ and *Klf10* KO green circle, $n = 9$). The performance characteristics of the model using 96 variables, are $R^2Y = 0.974$, $Q^2 = 0.87$ and $CV\text{-ANOVA} = 4.42 \times 10^{-6}$. (B) Metabolome score plots of PLS-DA on soleus (WT in blue circle, $n = 9$ and *Klf10* KO in green circle, $n = 10$). The performance characteristics of the model using 88 variables, are $R^2Y = 0.93$, $Q^2 = 0.86$ and $CV\text{-ANOVA} = 5.46 \times 10^{-7}$.

To define relevant metabolites implicated in the clustering between *Klf10* KO and WT mice, we performed a volcano plot analysis (Figure 2) with the former VIP for each biological sample and found 34 metabolites in serum (Figure 2A) and 9 metabolites in soleus (Figure 2B), representing 35.4% and 10.1% of metabolites, respectively, that were highly regulated ($FC > 1.5$ or $FC < 0.5$ and p -value < 0.05). For instance, cholic acid and glycocholic acid in serum and caprylic acid and cortisol in soleus were highly upregulated in *Klf10* KO compared to WT mice. Interestingly, hippuric acid was highly downregulated in both samples of *Klf10* KO mice. These data demonstrated profound differences in the metabolic profiles of serum (Table S1) and soleus (Table S2) of *Klf10* KO mice.

2.2. Characterization of Metabolic Changes in *Klf10* KO Mice

VIP were classified according to their chemical classes (Figure 3). The percentages of the chemical classes between *Klf10* KO and WT mice are presented in the pie charts for serum (Figure 3A) and for soleus (Figure 3B). This revealed nine different chemical classes. The inter-biological sample (serum vs. soleus) comparison showed that metabolites mainly archived into phospholipids (27% in serum vs. 16% in soleus), amino acids and derivatives (23% in serum vs. 21% in soleus), lipids: fatty acids-steroids (18% in serum vs. 15% in soleus), and aromatic compounds—amines (7% in serum vs. 8% in soleus). Organic acids were similarly modified, exhibiting 10% variation in both serum and soleus between *Klf10* KO and WT mice. A slight difference was noted for sugar (3% in serum vs. 7% in soleus), nucleotides—nucleosides derivatives (6% in serum vs. 14% in soleus), and vitamins—cofactors—hormones (2% in serum vs. 7% in soleus). With the exception of sugar, phospholipids, nucleotides—nucleosides derivatives, and vitamins—cofactors—hormones classes, a very similar perturbation was observed on chemical repartition for serum and soleus, indicating that the same classes of chemical compounds were impacted in both biological samples in *Klf10* KO mice providing strong evidence for direct regulation of these metabolites by *Klf10*.

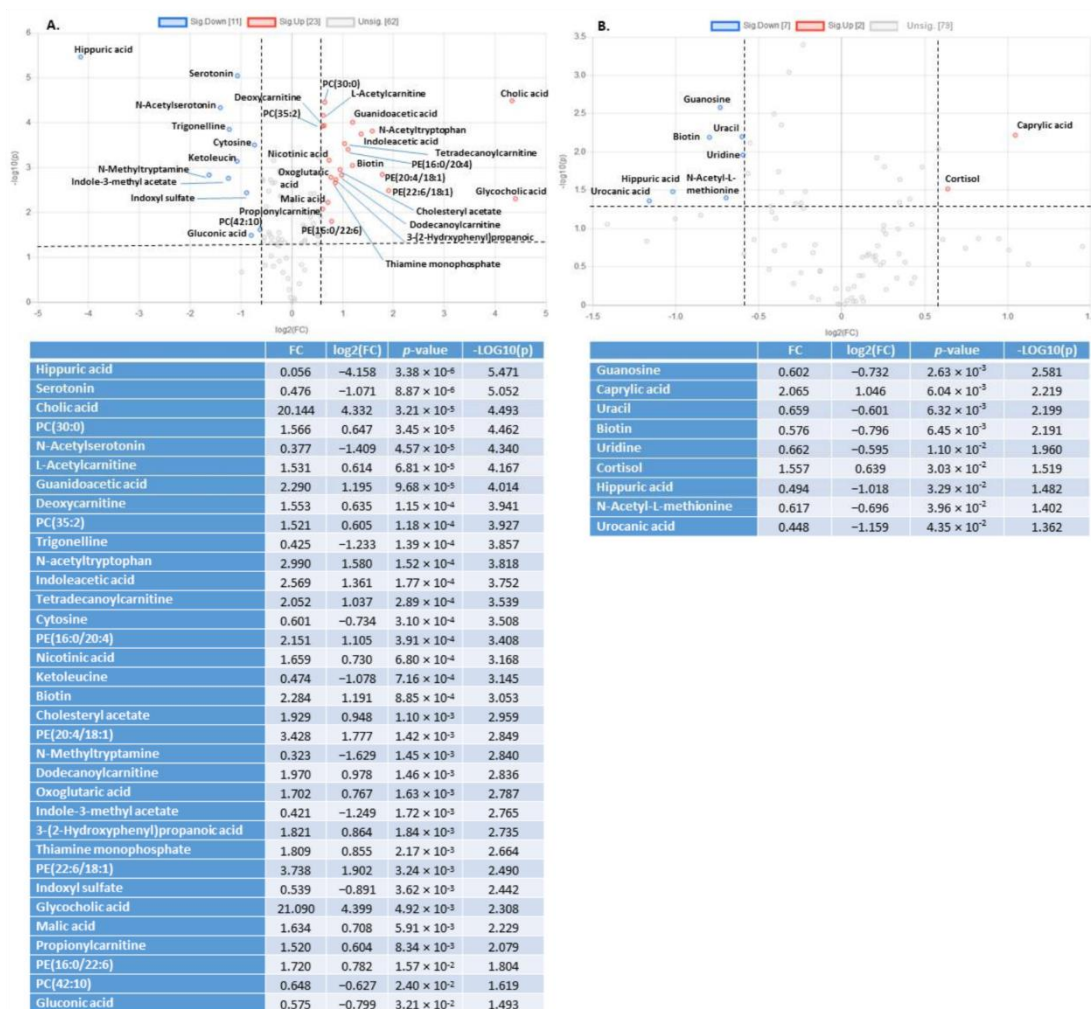


Figure 2. Volcano plots showing metabolites changes in serum (A) and soles (B) in *Klfl10* KO versus WT. Each point corresponds to a metabolite (as VIP). Significant selected metabolites are upregulated in red and downregulated in blue. In grey, metabolites with $0.5 < FC < 1.5$ and/or $p\text{-value} > 0.05$. Dotted horizontal line indicates threshold for $p\text{-value}$ of 0.05 and the dotted vertical line indicates threshold for 1.5 fold change (FC).

In serum, numerous metabolite changes were observed in particular in lipid and phospholipid classes, including palmitic acid (FA), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), lysophosphocholine (LPC), and platelet-activating factor (PAF) or PC (O-) (Supplemental Table S1 and Figure 2A). There were a total of 26 phospholipids over the 96 VIP, representing 27% of the overall change in serum. We also found increased levels of plasma lipids and acylcarnitines, such as L-acetylcarnitine, O-acetyl-L-carnitine, deoxycarnitine, tetradecanoylcarnitine, propionylcarnitine, and dodecanoylcarnitine. In addition to lipid metabolism, amino acid metabolism was significantly altered in the serum of *Klfl10* KO mice. We found 23% amino acid change, including L-threonine, L-lysine, L-valine, L-serine, L-arginine, L-asparagine, L-methionine, L-ornithine, and derivatives such as N-acetyltryptophan, indicating that amino acid metabolism was clearly impacted. Metabolic characterization in serum identified compounds from glycolysis and the Krebs cycle, including a slight decrease in D-glucose and L-lactic acid and a significant increase in citric acid, isocitric acid, oxoglutaric acid, fumaric acid, and L-malic acid ($p\text{-value} < 0.05$). To-

gether, changes in chemical classes of sugars and organic acids represented 3% and 10% of the overall changes, respectively (Figure 3A), suggesting that energetic metabolism (glycolysis and Krebs cycle intermediates) is impacted and reflected in the serum of *Klf10* deficient mice.

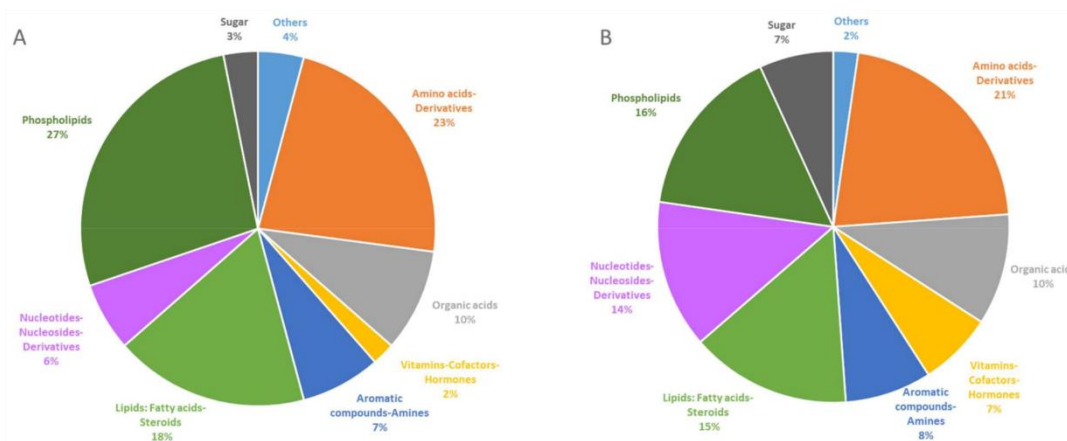


Figure 3. Pie chart visualization of chemical affiliation of metabolites in serum (A) and soleus (B). VIP metabolites, 96 from serum and 88 from soleus, were classified into nine different chemical classes: phospholipids in dark green, lipids: fatty acids—steroids in clear green, carbohydrate in black, amino acids—derivatives in orange, organic acids in grey, vitamins—cofactors—hormones in yellow, aromatic compounds—amines in dark blue, nucleotides—nucleosides derivatives in violet and others in clear blue. Results are given in the percentage of VIP belonging to the categories.

In the soleus, phospholipids were less altered than was reflected in the serum (Figure 3). The PC and LPC were predominantly impacted (Supplemental Table S1), and acylcarnitines (propionylcarnitine, desoxycarnitine, tetradecanoylcarnitine, which are common with serum, and decanoylcarnitine, which is specific to soleus) followed the same trend. Alterations in metabolites of glycolysis and the Krebs cycle, including glycogen and purine nucleotide, were identified (Figure 4). D-glucose and L-lactic acid were significantly increased in the soleus of *Klf10* KO versus WT mice (p -value < 0.05). In the Krebs cycle, citric acid, isocitric acid, succinic acid, fumaric acid, and L-malic acid were detected and demonstrated fluctuations, together with amino acids (L-arginine, L-aspartic acid, and L-methionine). Glucose 1-phosphate (G1P) and glucose 6-phosphate (G6P) were differentially discriminated as VIP and fed the glycogen storage metabolism. Interestingly, nucleotides—nucleosides, derivatives such as guanosine, guanine, inosine, and uric acid that are involved in purine metabolism, exhibited a significant decrease in *Klf10* deficient mice. In this regard, lipids, phospholipids, sugar, amino acids, nucleotides, and organic acids were determined to be altered in the soleus of *Klf10* KO mice (Figure 4).

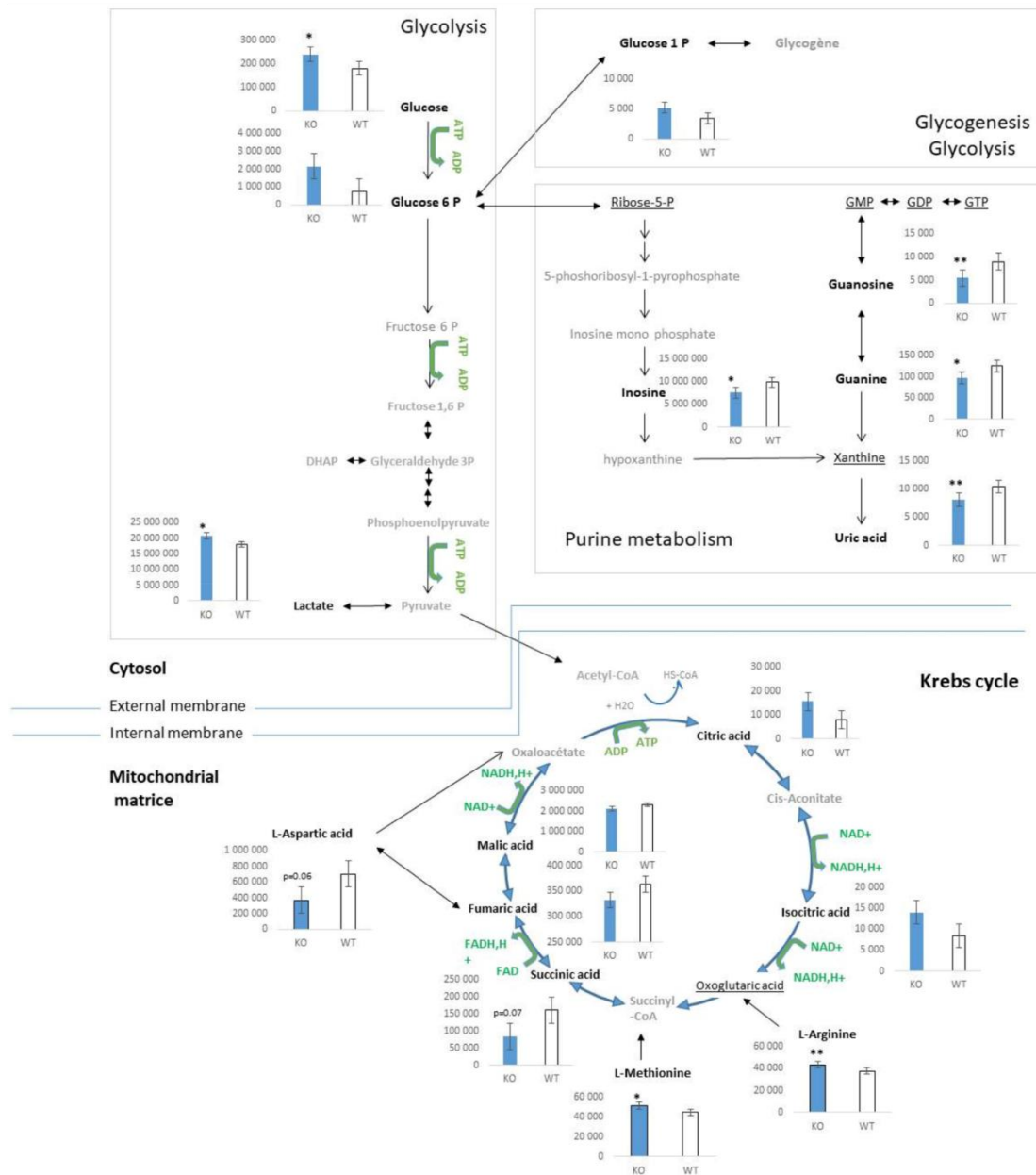


Figure 4. Metabolite changes related to energetic metabolism in soleus of *Klf10* KO mice. Metabolites are represented in their respective metabolism position in glycolysis, glycogenesis—glycolysis, purine metabolism in cytosol and Krebs cycle in mitochondria compartment. Relative metabolite changes shown in the graphs were HPLC-MS results. Open bars, WT mice and filled bars, *Klf10* KO mice. In black bold, metabolites detected and determined as variables with importance in projection (VIP). In black underlined, metabolites were detected but not determined as VIP. In gray, metabolites were not detected. DHAP: dihydroxyacetone 3-phosphate; GMP: Guanosine monophosphate, GDP: Guanosine diphosphate, GTP: Guanosine triphosphate. Values are expressed as mean ± SEM in arbitrary units. * *p*-value < 0.05 and ** *p*-value < 0.01.

2.3. Identification of Metabolic Pathways Involved in *Klf10* KO Mice

Following the metabolic change analyses in serum and soleus, we investigated metabolite set enrichment pathways [32]. It is important to note that lipids and phospholipids are not considered by the software for data treatment to establish enrichment set diagrams. Despite this, we characterized the incidence of change implicating VIP in serum and in soleus on metabolic pathways (Figure 5). Enrichment diagrams revealed that in both samples, metabolite changes affected the Warburg effect (aerobic glycolytic metabolism), the citric acid cycle, the transfer of acetyl group into mitochondria, the ammonia recycling, the arginine and proline metabolism, gluconeogenesis, the thiamine metabolism, the glycine and serine metabolism, the urea cycle, and many other pathways to a lesser extent. Metabolic pathways highlighted by enrichment analyses revealed alterations that affect particularly energetic and amino acid metabolisms and transfer–degradation–recycling processes (Figure 5).

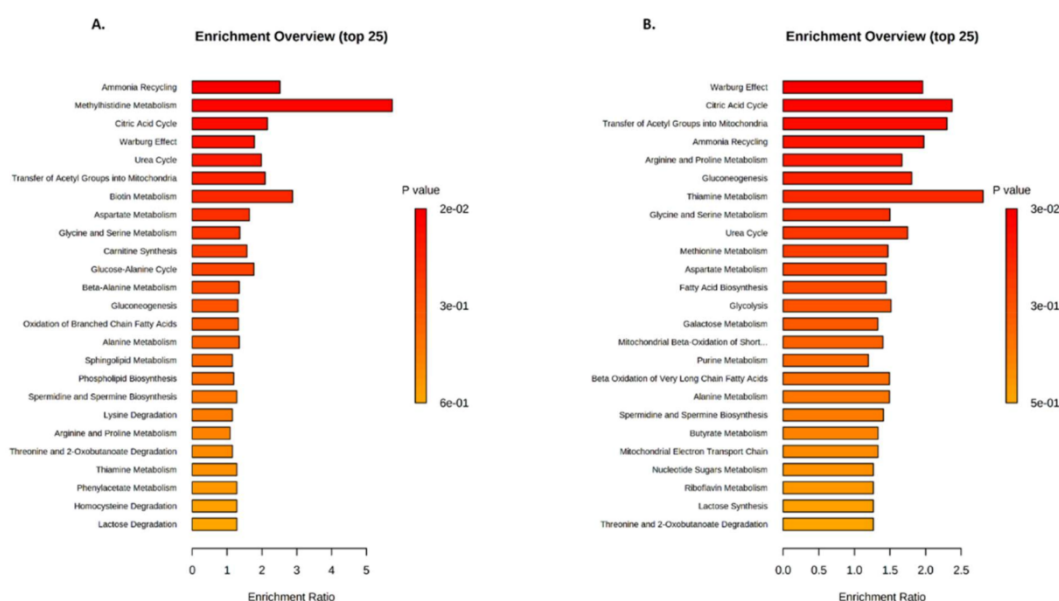


Figure 5. Metabolite Set Enrichment pathway Analysis (MSEA) in serum (A) and soleus (B). Metabolite set enrichment diagrams (25 top pathways) were obtained using MetaboAnalyst 5.0 on the 96 VIP found in serum and the 88 VIP found in soleus.

Given these findings and the similarities in terms of influenced metabolic pathways, we generated a Venn diagram to compare VIP obtained from serum and soleus (Figure 6A). Analyzing intersections between the two matrices identified 36 common metabolites, representing 38% of the VIP in serum and 41% in soleus. Common metabolites are listed in Figure 6, and their chemical repartition is depicted in the pie chart (Figure 6B). As expected, we found metabolites involved in energetic metabolism (carbohydrate and lipid), such as D-glucose, some phosphatidylcholines (PC) and lysoPC, carnitine derivative compounds, and Krebs cycle intermediates (citric acid, fumaric acid, isocitric acid, and malic acid). Other common metabolites included amino acids, identifying L-arginine, ketoleucine, L-methionine, L-serine, L-threonine, or derived degradation products such as hippuric acid, serotonin, and urocanic acid. To focus on the commonly altered pathways in both biological samples, an overview of Metabolic Set Enrichment Analysis (MSEA) was run using the 36 metabolites shared by the biological samples (Figure 6C). This identified four noteworthy metabolic pathways; the Warburg effect, the citric acid cycle (Krebs cycle), the gluconeogenesis, and the transfer of acetyl groups into mitochondria. By extracting information from each pathway, it was possible to visualize that D-glucose, lactic acid,

isocitric acid, and citric acid were upregulated in the soleus (Figure 2B), and biotin, fumaric acid, and malic acid were downregulated in the soleus (Figure 2B). These represent highly relevant metabolites impacted by *Klf10* in both compartments (Figure 6).

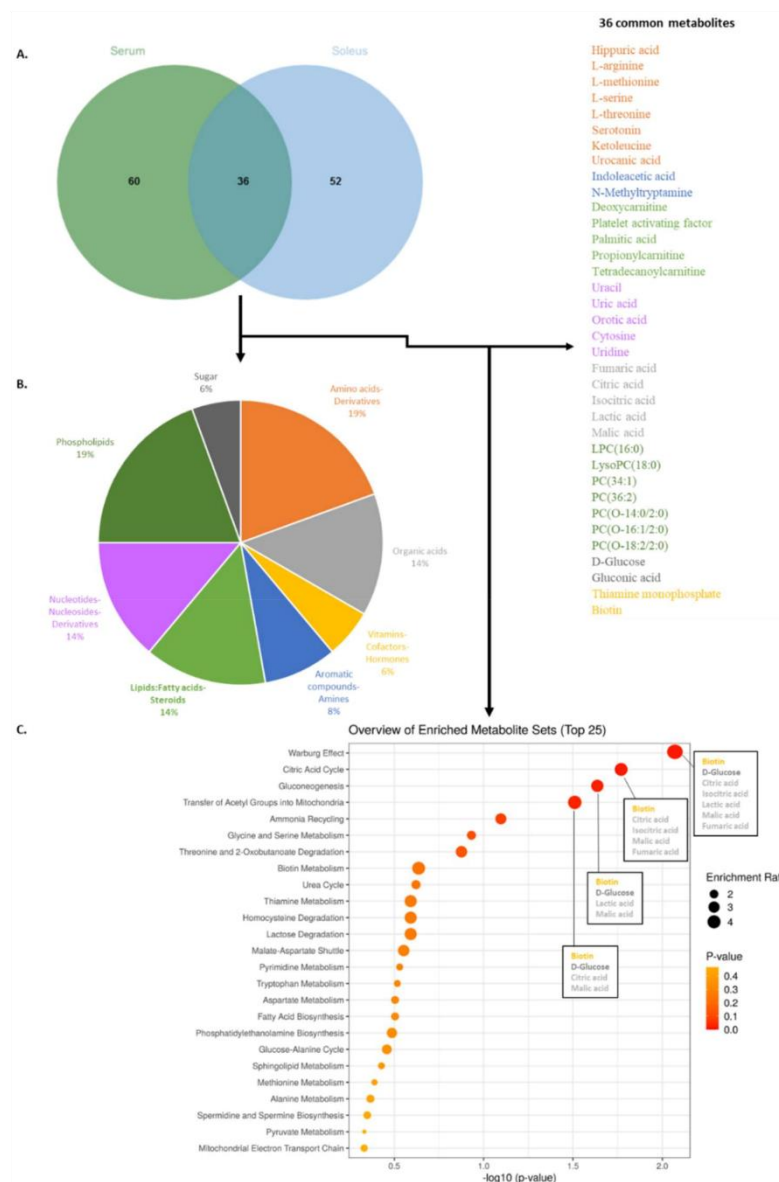


Figure 6. Venn diagram (A), pie chart of chemical metabolite repartition (B), and MSEA of the 36 metabolites common between serum and soleus (C). (A) Venn diagram using the 96 VIP from serum and the 88 VIP from soleus were generated and found 36 common metabolites across the two matrices. A list of the common metabolites found both in serum and soleus is given on the right panel of the figure. (B) Pie chart using the 36 common metabolites found in the Venn intersection assigned compounds into chemical classes. (C) Overview of enriched metabolites sets (bubble plot) that shows the 25 top pathways related to the common 36 metabolites identified both in serum and soleus. For the first four pathways, name of common VIP is in the square plot, colors refer, respectively, to their chemical category. *p*-value is given by red color spot intensity.

As a next step, we compared the fold change of the 36 common metabolites found in serum and soleus using a radar diagram (Figure 7). This representation allowed for the visualization of compounds having similar or different behaviors between the biological samples. For example, orotic acid, palmitic acid, some PC (34:1; 36:2 and O-14:0/2:0), uracil, uric acid, and uridine were impacted similarly by *Klf10* loss while D-glucose, biotin, serotonin, tetradecanoylcarnitine, LPC(18:0), L-arginine, deoxycarnitine, thiamine monophosphate, platelet-activating factor, PC(O-16:1/2:2), and N-methyltryptamine were oppositely impacted (see supplemental Table S3).

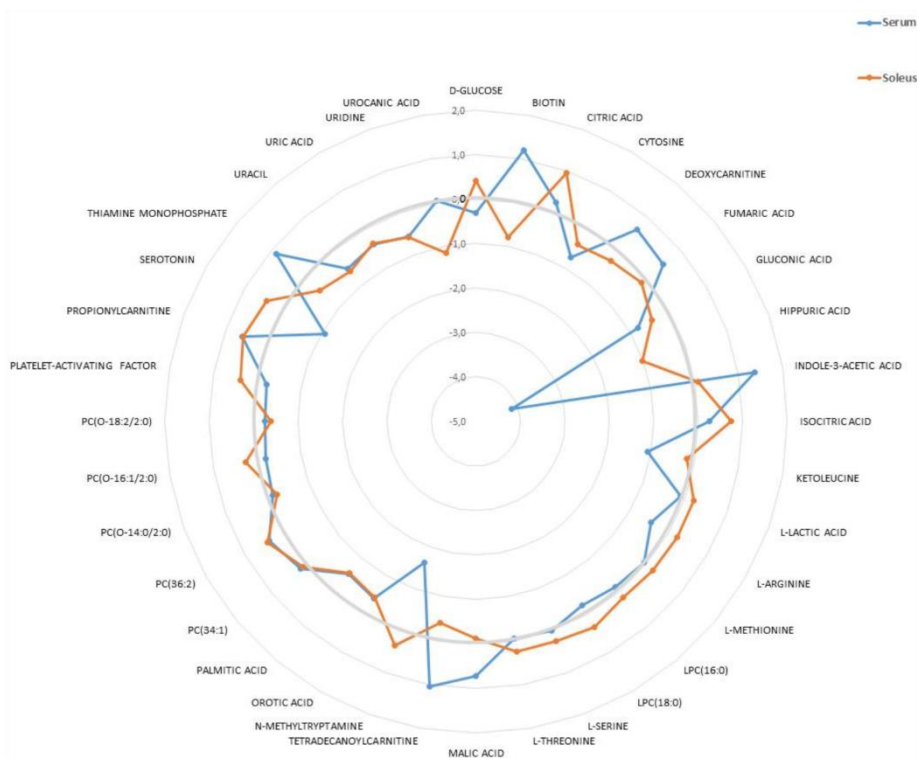


Figure 7. Radar diagram of the 36 VIP found to be common in serum and soleus. Metabolites showed up or downregulation following the bold grey circle giving the zero-base line. Values are given according to $\log_2(\text{FC})$ of metabolites in serum (blue line) and soleus (red line), respectively.

2.4. Identification of Metabolic Pathways Involved in *Klf10* KO Mice

Our results clearly demonstrated a specific signature of change in the metabolomic profile of *Klf10* KO mice. The drastic metabolomics differences observed reliably separated the two groups of mice (*Klf10* KO vs. WT mice) and allowed for the identification of potential biomarkers that are reflective of decreased *Klf10* expression and/or function. To highlight potential biomarkers of interest in serum and soleus, we applied a strict cut-off of two-fold change and p -value < 0.05 (Figure 8).

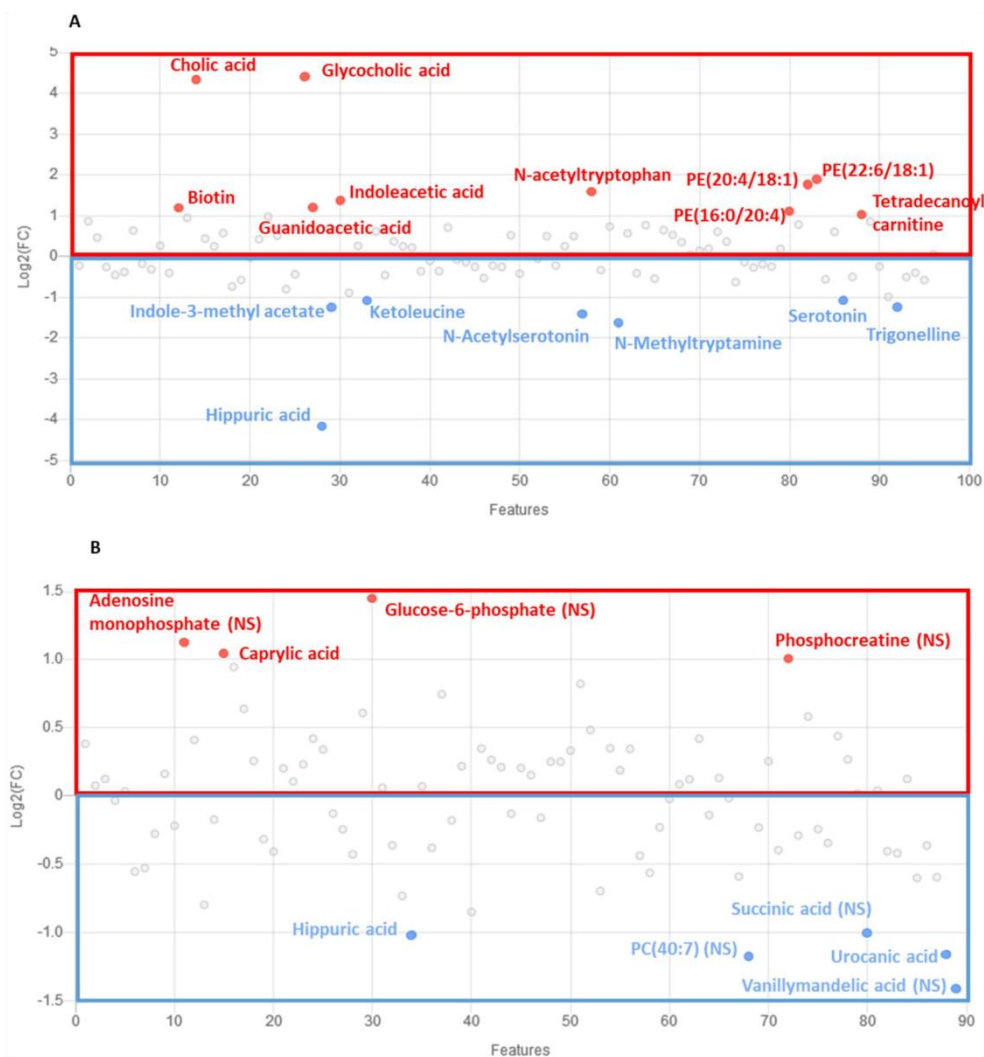


Figure 8. Metabolites as potential biomarkers of serum (A) and soleus (B) in *Klf10* KO vs. WT mice. Metabolites are selected with a criteria of 2-fold change in regulation and p -value < 0.05 . NS identify metabolites with two-fold increase and no significant p -value. In red are metabolites upregulated, and in blue are metabolites downregulated.

In serum, we found a set of 17 metabolites highly regulated, which mostly belong to lipids, phospholipids, and amino acids—derivatives and aromatic compounds—amines classes. In a global picture, we observed that metabolites from lipids and phospholipid classes (PE(22:6/18:1), PE(20:4/18:1), PE(16:0/20:4), tetradecanoylcarnitine, glycocholic acid, and cholic acid) were upregulated whereas metabolites from aromatic compounds—amines class (indole-3-methyl acetate, N-methyltryptamine, and trigonelline) and amino acids-derivative compounds (ketoleucine, N-acetylserotonin, serotonin, hippuric acid) were downregulated. Some others, such as indoleacetic acid and biotin, were upregulated. In serum, guanidoacetic acid and N-acetyltryptophan from amino acid-derivative groups were also upregulated. All dysregulated metabolites (FC > 2 and p -value < 0.05) described here may serve as potential robust biomarker predictors for lack of *Klf10* expression and/or function.

In the soleus, we identified nine metabolites exhibiting a two-fold change but only three with a p -value < 0.05 . Urocanic acid, caprylic acid, and hippuric acid were highly

dysregulated in soleus and belonged to the chemical classes of lipid: fatty acids-steroids (caprylic acid, upregulated) and amino acids-peptides derivatives (hippuric acid and urocanic acid, downregulated).

3. Discussion

In this study, using UHPLC-Mass Spectrometry, we conducted a serum and soleus metabolic analysis to establish a specific metabolic signature of *Klf10* KO mice. Indeed, the analysis of both serum and soleus in *Klf10* KO mice succeeded in detecting a total of 224 and 246 altered metabolites, respectively. The PLS-DA model for serum revealed 96 variables with importance in projection (VIP) and 88 VIP for the soleus, which contributed to establishing the models with robust values. We found a drastic change in metabolites that clearly separated *Klf10* KO from wild-type mice in each biological sample. We noticed an increased number of metabolites significantly regulated in serum when compared to the soleus, and the overall data demonstrated a profound metabolome alteration in *Klf10* KO compared to WT mice.

Metabolomic profiles found in *Klf10* KO mice affected different categories of compounds that belong to various chemical classes, such as lipids, phospholipids, amino acids, aromatic compounds, vitamins, hormones, and others. The proportion diagram of compound class repartition is mostly similar between serum and soleus, except for sugar, phospholipids, nucleotides-nucleosides derivatives, and vitamins-cofactors-hormones classes. This suggests that *Klf10* deficiency impacts carbohydrate, nucleic acid, and lipid metabolism differently in respect of these two samples. In this context, results indicate a metabolic change in (1) fatty acid metabolism driven by phospholipids, lipids, and acylcarnitine modifications, (2) amino acid metabolism by glucogenic amino acid fluctuations, and (3) energetic metabolism related to glycolysis and Krebs cycle metabolite alterations. Changes in serum fatty acid and acylcarnitine levels could have a high predictive value for segregating *Klf10* KO and WT mice, as shown by Houtlooper et al. in plasma [33]. Interestingly, plasma acylcarnitine elevation suggests the transfer of acetyl groups into the mitochondria for energy production via lipid catabolism. It is worthy to note that increases in acylcarnitine are found in the pathologies of obesity and diabetes (type II) [34,35]. In soleus specifically, the elevated levels of glucose, glucose-1-phosphate, and glucose-6-phosphate suggest changes in glycolysis and glycogen metabolism, while guanine, inosine, and uric acid affect the metabolism of purine nucleotides. Thus, in agreement with the literature, there is increasing evidence in favor of KLF members as transcriptional regulators of energy metabolism [17]. In summary, metabolic results obtained in this study argue in this direction and give a representative window of the metabolic state of *Klf10* KO mice (Figure 4). In *Klf10* KO mice, we observed a drastic metabolome reorganization affecting mainly lipids, phospholipids, amino acids, and to a lesser degree, nucleotides.

To expand our analysis, we linked changes in VIP metabolites identified with metabolic pathways. We discovered that the Warburg effect and the citric acid cycle were among the most highly affected pathways in both the soleus and serum (Figures 5 and 6). Interestingly, the Warburg effect is an aerobic glycolysis metabolism that occurs mainly in cancer and proliferating cells. This particular type of metabolism improves nutrient uptake to directly incorporate biomass, generating nucleotides, amino acids, and lipids. It is a process that induces cells to acquire proliferation potential rather than using nutrients for energy production [36].

Our previous study demonstrated that *Klf10* KO mice exhibit disruption in the Krebs cycle and oxidative phosphorylation in mitochondria by acting on citrate synthase (CS) and succinate dehydrogenase (SDH, complex II) enzymes [28]. Based on the present discovery, we presented a hypothetical metabolic model of change occurring in the soleus of *Klf10* KO mice in Figure 9, where the flux of glucose through glycolysis is slowed down at the mitochondria level (caused by CS and SDH impairment). As a consequence, it is expected that a small fraction of pyruvate enters into the Krebs cycle, and the rest is highly converted into lactic acid, which may accumulate and serve to produce energy by anaerobia. At

that point, citric acid and isocitric acid are blocked at the Krebs cycle level, and the excess citric acid may follow the lipid synthesis pathway through acetyl CoA conversion. In parallel, glycolysis intermediate products may accumulate and be reoriented to amino acid synthesis and/or glycogen storage. It appears that the soleus of *Klf10* KO mice reproduces Warburg metabolism that is related to the functions of KLF10 described in the pathogenesis of various cancers [37]. Further research is needed to fully establish these possibilities and validate the proposed model.

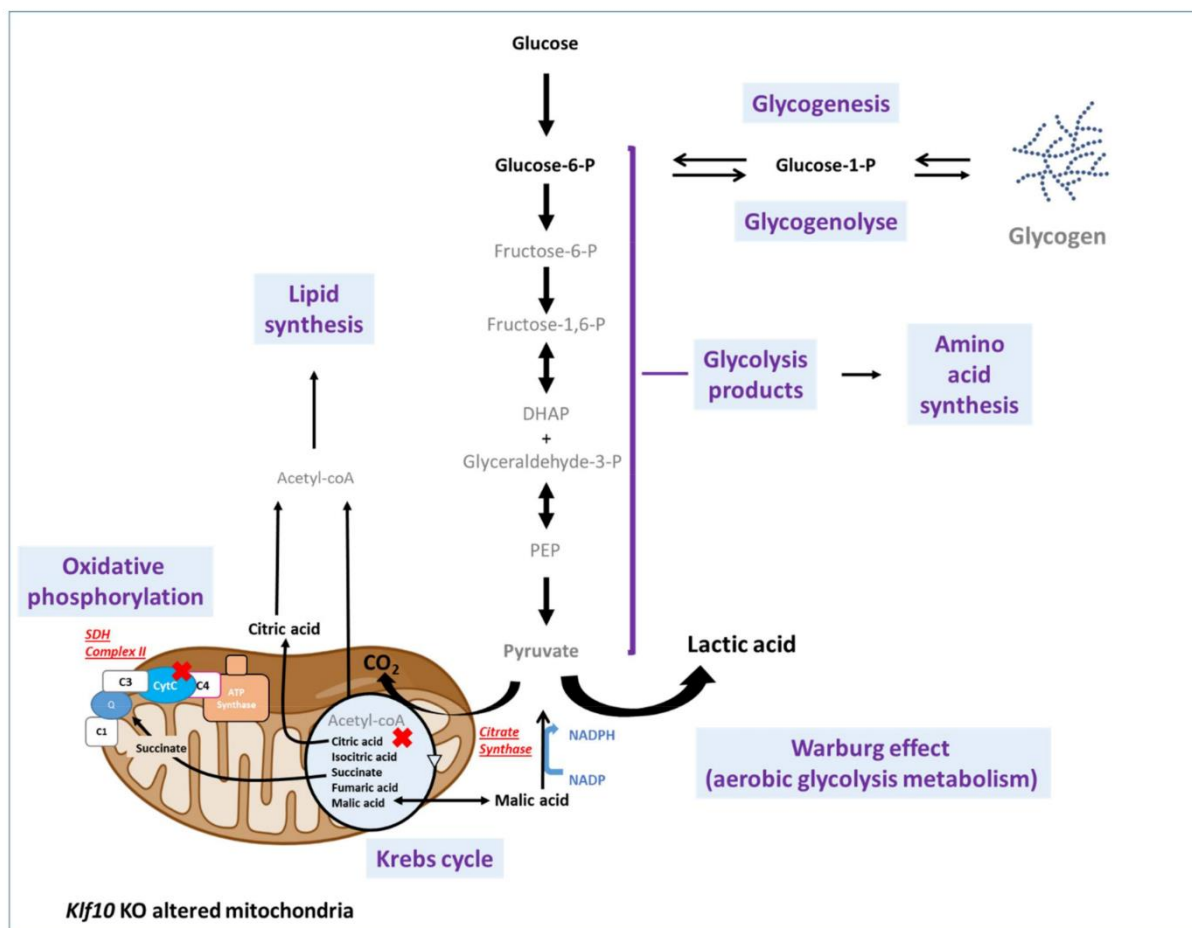


Figure 9. Model of metabolic pathways changes occurring in soleus of *Klf10* KO. A summary of the biochemical pathways related to glucose metabolism in soleus. Metabolites that changed between *Klf10* KO and wild-type mice are indicated in black bold. Red crosses are the metabolic situation and the name of the two enzymes implicated in the described deterioration of mitochondria functions in *Klf10* KO mice (28). DHAP: Dihydroxyacetone phosphate; PEP: Phosphoenolpyruvate; SDH complex II: Succinate dehydrogenase.

Aging is a late-life state characterized by a general degradation of cell function leading to declines in health. Increasing evidence shows that mitochondrial dysfunctions contribute to the aging process [38,39], including insulin signaling pathways, which are known to affect longevity [40,41]. Further, mitochondria are required and play a crucial role in skeletal muscle insulin signaling [42]. As discussed above, KLF10 affects metabolic functions with strong involvement in impaired mitochondrial functions [28]. In addition, as a glucose-responsive gene in the liver [7], KLF10 plays a prominent role in regulating insulin signaling pathways that drive P13k-Akt for glycogenesis and mTOR (mammalian target

of rapamycin) signaling for protein synthesis [16,43,44]. One of the aspects of regulating the insulin signaling pathway results in glucose and lipid homeostasis, together with protein synthesis via mTOR. In our study, we observed that *Klf10* deletion in mice induced alterations in a large panel of molecules implicated in the regulation of cell activities at different levels (energetic metabolism, molecular, and signaling processes, including hormones and neurotransmitters). We proceeded to compare the metabolic signatures of *Klf10* KO mice to specific metabolic profiles characterized in aged mice, where amino acids, glucose, and lipid metabolism are affected in both liver and muscle [33], as well as in adult human plasma [45]. In a more precise manner, linoleic acid decreases have been shown to be a robust biomarker of aging [33]. We also observed a decrease in linoleic acid in *Klf10* KO serum (Table S1). Similarly, we noticed that metabolic products associated with phospholipid metabolism are significantly changed in the soleus of *Klf10* KO mice; this is also described in the skeletal muscle of aged mice that seems to reflect membrane cell modifications and altered functions [46,47]. Importantly, phospholipids take part in molecular transduction signaling for gene regulation, as well. In the soleus of *Klf10* KO mice, glycogen metabolism is altered by increased levels of G6P and G1P, while increases in L-lactic acid and glucose levels suggest a Warburg effect (anaerobic glycolysis). A similar situation is recalled in muscle of aging mice, where some metabolic changes implicate glycogen metabolism and anaerobic glycolysis, leading to age-related insulin resistance profiles [33,48]. Comparably, changes in other distinct metabolites such as citric acid or serotonin neurotransmitter were increased in the skeletal muscle of aged mice [47]; the last of which was also found to be increased in the soleus of *Klf10* KO mice. These observations provide strong evidence that *Klf10* KO mice share features with known aging phenotypes in skeletal muscle, particularly with regard to impaired mitochondrial function, metabolome footprint, and insulin (and mTOR) signal pathway regulation. In summary, *Klf10* KO mice refer to the deterioration of skeletal muscle cell structure and organization that coincide with biological functions altered with age.

In addition to metabolome characterization, another important goal is to identify specific metabolic biomarkers of *Klf10* deletion. Extensive analysis of the metabolome in serum and soleus allowed us to identify metabolite groups associated with *Klf10* deficiency. At a high level, lipids and amino acids were highly disrupted classes of metabolites altered in both the serum and soleus of *Klf10* KO mice. Some metabolites appeared highly discriminatory and, as such, may represent ideal biomarkers. Present in both matrices, hippuric acid, a derived amino acid, was highly decreased in serum and soleus. Tracking this metabolite in real-time could provide additional information about compartment exchanges and pathophysiology. Additionally, some metabolites were sample-specific such as cholic acid and glycocholic acid that were altered in serum, and caprylic acid and urocanic acid that were altered in the soleus. Among these sets of interesting candidate biomarkers (Figure 8), cholic acid and glycocholic (derivatives of cholic acid) are the major conjugated bile acids that facilitate lipid absorption. When found at high levels, cholic and glycocholic acids provoke hepatic and metabolic toxicities leading to possible membrane disruption. It can be assumed that KLF10 may regulate bile acid synthesis and affect the lipids and phospholipid levels. A similar function has been described for KLF15, a member of the KLF family [49]. One may hypothesize that the lack of *Klf10* leads to a global toxicity profile, implicating *Klf10* as a protective factor against cellular, tissue, and/or organ injury [50–52].

4. Materials and Methods

4.1. Animals

The generation of *Klf10* KO mice has been previously described [19]. To be consistent with our previous studies, we utilized 3-month-old littermate female animals derived from heterozygous breedings. Female mice were chosen based on preliminary results indicating higher expression of *Klf10* in female mice compared to male animals. All mice were maintained in a temperature-controlled room (22 ± 2 °C) with a light/dark cycle of 12 h.

Animals had free access to water and were fed with standard laboratory chow ad libitum. The protocol was approved by the French ministry of higher education, research and innovation (Permit Number: DUO-4776) and the local ethics committee Comité Régional d’Ethique en Matière d’Expérimentation Animale de Picardie (CREMEAP; Permit Number: APAFIS #8905-2021011109249708).

4.2. Sample Collection and Preparation

Slow twitch-muscle (soleus) was utilized given the defects observed in this glycolytic muscle following the deletion of *Klf10* and the 4-fold higher *Klf10* expression in soleus compared to EDL (28). Thus, the soleus of 3-month-old female mice were isolated from *Klf10* KO ($n = 10$) and WT ($n = 9$) mice, immediately frozen, and subsequently stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until metabolomics analysis. For metabolite extraction, 1 mL of MeOH:H₂O (50:50) was added to frozen muscle samples and agitated for 30 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ followed by centrifugation at $5000\times g$ for 15 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. In total, 900 μL of supernatants were collected for solvent evaporation in a SpeedVac (ThermoFisher, Villebon sur Yvette, France) at $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 2 h. The remaining supernatants were pooled for quality control (QC) samples and evaporated.

Serum samples from *Klf10* KO ($n = 9$) and WT ($n = 10$) mice were prepared as previously described [53]. Approximately 50 μL of serum were added to 400 μL of MeOH, centrifuged, and the supernatant was collected before evaporation. QC samples (10 μL of each sample) were also prepared.

For UHPLC-MS, evaporated samples were solubilized with 70 μL of solvent MeOH:H₂O (1:9) for RP-LC columns and 70 μL of ACN:H₂O (9:1) for HILIC columns.

4.3. Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy (UHPLC-MS)

4.3.1. Data Acquisition

As previously described [54], UHPLC-MS analysis was performed on a UHPLC Ultimate WPS-3000 system (Dionex, Idstein, Germany), coupled with a QExactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany).

The chromatography system was equipped separately with two columns: an RP-LC (Reverse Phase Liquid Chromatography) Phenomenex Kinetex[®] XB-C18 (1.7 μm 100 A 150 \times 2.1 mm from Phenomenex, Torrance, CA, USA) and a HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) Waters Cortecs[®] (unbonded silica; 1.6 μm 100 A 150 \times 2.1 mm from Waters, Dublin, Ireland).

The autosampler temperature (Ultimate WPS-3000 UHPLC system, Dionex, Germany) was set at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A HESI (Head ElectroSpray Ionization) source was used for both chromatography systems operated in positive (ESI+) and negative (ESI−) electrospray ionization modes (one run for each mode).

Detection was performed with a full-scan acquisition at 70,000 resolution ($m/z = 200$), which ranged from 58.0 to 870.0 m/z , with an automatic gain control target of 105 charges and a maximum injection time (IT) of 250 ms. Xcalibur 2.2 software (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) controlled the system.

4.3.2. Data Processing

The acquired data were processed using Xcalibur[®] software (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) by integrating selected product ion chromatographic peak areas, which were exported to an excel file containing the areas of each metabolite and finally normalized to the total sum of integrated metabolites. Detected peaks were identified using accurate m/z and retention time (RT) compared to the internal database made by the Mass Spectrometry Metabolite Library of Standards (MSMLS[®], IROA Technologies[™], Bolton, MA, USA). According to Rathato-Paris et al. [55], our annotation is considered putative metabolite identification (level 2). Only metabolites detected in quality control (QC) samples with a coefficient of variation (CV) <30% were kept for further analysis.

4.3.3. Data Analysis

Once the RP+/- (positive or negative ionization)-LC and HILIC+/-LC lists were generated, the web interface Metaboanalyst (<https://www.metaboanalyst.ca>, accessed on 20 September 2021) [32] was used to standardize the generic name and to generate Human Metabolome Data Base (HMDB) or Kyoto Encyclopedia Genes and Genomes (KEGG) numbers for each metabolite. A fusion step was used to merge the four lists according to their HMDB or KEGG numbers. When metabolites were present in several lists, the platform having the lower CV (for reproducibility on QC samples) was kept for further analysis.

A Venn diagram (<http://jvenn.toulouse.inra.fr/app/example.html>, accessed on 20 September 2021) [56] was used to identify the common metabolites between serum and soleus.

4.4. Statistical Analysis

4.4.1. Multivariate Analysis

In the first intention, a principal component data analysis (PCA) was performed in order to observe and exclude outlier samples. Once these outliers were excluded, a supervised multivariate statistical data analysis based on PLS-DA (Partial Least Squares Discriminant Analysis) was then performed on the metabolomics data generated by RP and HILIC-LC using SIMCA[®]15 software (Umetrics, Umea, Sweden). The model qualities were evaluated by R²Y (goodness of fit), Q² (goodness of prediction), and CV-ANOVA (Cross Validation-ANalysis Of VAriance). The PLS-DA models were improved according to the regression coefficients of each metabolite that expressed how strongly the Y (WT or *Klf10* KO) is related to the X-variables (metabolites). According to these criteria, metabolites (variable with importance in projection = VIP) with a greater contribution to the separation of the groups were identified.

4.4.2. Univariate Analysis

Univariate analysis was performed on metabolites identified by the PLS-DA using a t-test on Metaboanalyst (<https://www.metaboanalyst.ca>, accessed on 20 September 2021). The results were considered to be significantly different when the *p*-value was ≤ 0.05 . The fold changes were calculated.

4.4.3. Metabolites Set Enrichment

The metabolites implicated in the clustering on the PLS-DA analysis were loaded to identify the most significantly affected metabolic pathways by metabolite-set enrichment analysis (MSEA) as previously described by Beauclercq S. et al. [57]. A cut-off was chosen to present the first 25 metabolic pathways corresponding to the most significantly enriched.

5. Conclusions

In conclusion, the results of the studies presented here support that *KLF10* is highly related to the dynamic processes of metabolism regulation that manage energy (glucose and lipids) production, which are essential to cellular physiology. Considering *KLF10*'s involvement in gene expression, signal transduction, and metabolism [16], it has significant potential to become a biological cell sensor. It is clear that metabolomics has helped to establish characterized footprints of phenotypes resulting from many interconnected biological mechanisms [58]. In this case, characterizing metabolic profiles and identifying potential metabolic biomarkers are of therapeutic interest and may serve to understand metabolic homeostasis related to disease development and/or various (patho)physiological conditions.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/metabo12060556/s1>, Table S1: VIP metabolites of serum with their contribution scores, *p*-values, fold changes and chemical classes; Table S2: VIP metabolites of

muscle with their contribution scores, *p*-values, fold changes and chemical classes; Table S3: Common and unique VIP metabolites in serum and muscle.

Author Contributions: Conceptualization, S.F.B. and L.N.-D.; methodology, C.M., C.D. and N.C.; software, A.L. and A.P.; validation, N.B. and L.N.-D.; formal analysis, C.M., C.D., N.C., A.P. and N.B.; investigation, N.B.; resources, P.E. and L.N.-D.; writing—original draft preparation, N.B., N.C. and L.N.-D.; writing—review and editing, N.B., S.F.B., P.P., S.M., J.R.H., M.S. and L.N.-D.; visualization, L.N.-D. and N.B.; supervision, S.F.B. and L.N.-D.; project administration, S.F.B. and L.N.-D.; funding acquisition, S.F.B., J.R.H. and L.N.-D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded by the Research Department of UTC within the framework of AMI International and by the Idex Sorbonne University Investments for the Future programs, Project SU-19-3-EMRG-12 and by the National Institutes of Health R01 DE14036.

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the French ministry of higher education, research and innovation (Permit Number: DUO-4776) and the local ethics committee Comité Régional d’Ethique en Matière d’Expérimentation Animale de Picardie (CREMEAP; Permit Number: APAFIS #8905-2021011109249708).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are contained in the supplementary material.

Acknowledgments: We would like to acknowledge the Metabolomics Core Facility “PST-ASB” of the University of Tours—France and the European Regional Development Fund 1088 (FEDER).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

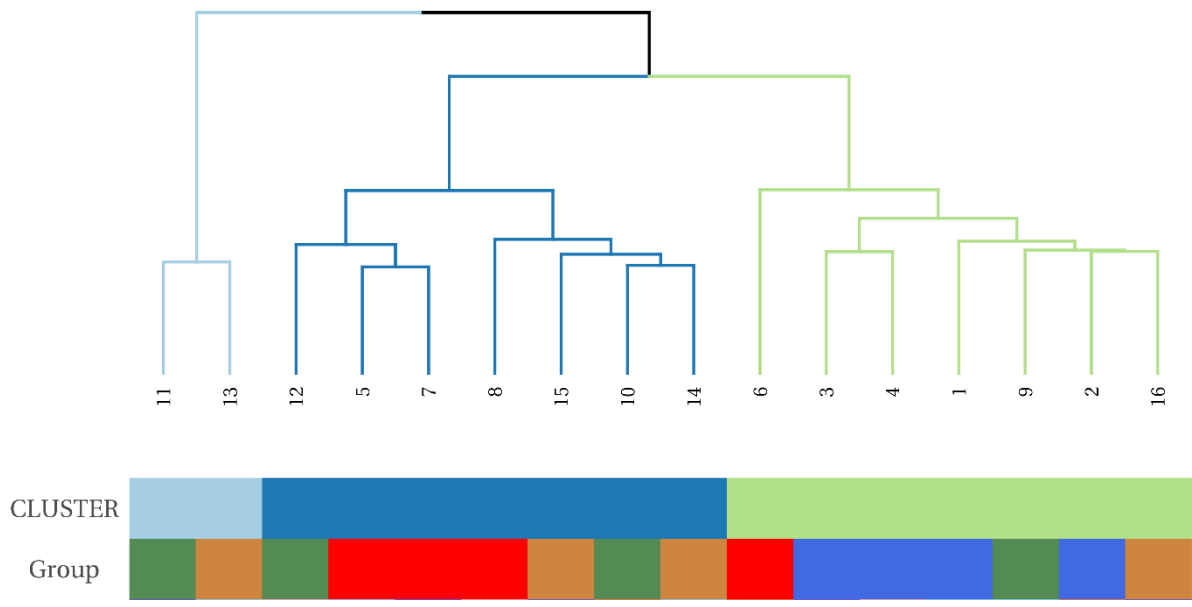
- Subramaniam, M.; Hefferan, T.E.; Tau, K.; Peus, D.; Pittelkow, M.; Jalal, S.; Riggs, B.L.; Roche, P.; Spelsberg, T.C. Tissue, cell type, and breast cancer stage-specific expression of a TGF-beta inducible early transcription factor gene. *J. Cell. Biochem.* **1998**, *68*, 226–236. [\[CrossRef\]](#)
- Rajamannan, N.M.; Subramaniam, M.; Abraham, T.P.; Vasile, V.C.; Ackerman, M.J.; Monroe, D.G.; Chew, T.L.; Spelsberg, T.C. TGFbeta inducible early gene-1 (TIEG1) and cardiac hypertrophy: Discovery and characterization of a novel signaling pathway. *J. Cell. Biochem.* **2007**, *100*, 315–325. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- McConnell, B.B.; Yang, V.W. Mammalian Krüppel-like factors in health and diseases. *Physiol. Rev.* **2010**, *90*, 1337–1381. [\[CrossRef\]](#)
- Cao, Z.; Sun, X.; Icli, B.; Wara, A.K.; Feinberg, M.W. Role of Krüppel-like factors in leukocyte development, function, and disease. *Blood* **2010**, *116*, 4404–4414. [\[CrossRef\]](#)
- Memon, A.; Lee, W.K. KLF10 as a Tumor Suppressor Gene and Its TGF-beta Signaling. *Cancers* **2018**, *10*, 161. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Johnsen, S.A.; Subramaniam, M.; Janknecht, R.; Spelsberg, T.C. TGFbeta inducible early gene enhances TGFbeta/Smad-dependent transcriptional responses. *Oncogene* **2002**, *21*, 5783–5790. [\[CrossRef\]](#)
- Guillaumond, F.; Grechez-Cassiau, A.; Subramaniam, M.; Brangolo, S.; Peteri-Brunback, B.; Staels, B.; Fievet, C.; Spelsberg, T.C.; Delaunay, F.; Teboul, M. Kruppel-like factor KLF10 is a link between the circadian clock and metabolism in liver. *Mol. Cell. Biol.* **2010**, *30*, 3059–3070. [\[CrossRef\]](#)
- Ruberto, A.A.; Grechez-Cassiau, A.; Guerin, S.; Martin, L.; Revel, J.S.; Mehiri, M.; Subramaniam, M.; Delaunay, F.; Teboul, M. KLF10 integrates circadian timing and sugar signaling to coordinate hepatic metabolism. *eLife* **2021**, *10*, e65574. [\[CrossRef\]](#)
- Barbosa Vieira, T.K.; Jurema da Rocha Leao, M.; Pereira, L.X.; Alves da Silva, L.C.; Pereira da Paz, B.B.; Santos Ferreira, R.J.; Feitoza, C.C.; Fernandes Duarte, A.K.; Barros Ferreira Rodrigues, A.K.; Cavalcanti de Queiroz, A.; et al. Correlation between circadian rhythm related genes, type 2 diabetes, and cancer: Insights from metanalysis of transcriptomics data. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2021**, *526*, 111214. [\[CrossRef\]](#)
- Reinholz, M.M.; An, M.W.; Johnsen, S.A.; Subramaniam, M.; Suman, V.J.; Ingle, J.N.; Roche, P.C.; Spelsberg, T.C. Differential gene expression of TGF beta inducible early gene (TIEG), Smad7, Smad2 and Bard1 in normal and malignant breast tissue. *Breast Cancer Res. Treat.* **2004**, *86*, 75–88. [\[CrossRef\]](#)
- Cook, T.; Urrutia, R. TIEG proteins join the Smads as TGF-beta-regulated transcription factors that control pancreatic cell growth. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2000**, *278*, G513–G521. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Ribeiro, A.; Bronk, S.F.; Roberts, P.J.; Urrutia, R.; Gores, G.J. The transforming growth factor beta(1)-inducible transcription factor TIEG1, mediates apoptosis through oxidative stress. *Hepatology* **1999**, *30*, 1490–1497. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Spittau, G.; Happel, N.; Behrendt, M.; Chao, T.I.; Kriegelstein, K.; Spittau, B. Tieg1/Klf10 is upregulated by NGF and attenuates cell cycle progression in the pheochromocytoma cell line PC12. *J. Neurosci. Res.* **2010**, *88*, 2017–2025. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

14. Tachibana, I.; Imoto, M.; Adjei, P.N.; Gores, G.J.; Subramaniam, M.; Spelsberg, T.C.; Urrutia, R. Overexpression of the TGFbeta-regulated zinc finger encoding gene, TIEG, induces apoptosis in pancreatic epithelial cells. *J. Clin. Investig.* **1997**, *99*, 2365–2374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Yeh, C.M.; Lee, Y.J.; Ko, P.Y.; Lin, Y.M.; Sung, W.W. High Expression of KLF10 Is Associated with Favorable Survival in Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma. *Medicina* **2020**, *57*, 17. [[CrossRef](#)]
16. Wara, A.K.; Wang, S.; Wu, C.; Fang, F.; Haemmig, S.; Weber, B.N.; Aydogan, C.O.; Tesmenitsky, Y.; Aliakbarian, H.; Hawse, J.R.; et al. KLF10 Deficiency in CD4(+) T Cells Triggers Obesity, Insulin Resistance, and Fatty Liver. *Cell Rep.* **2020**, *33*, 108550. [[CrossRef](#)]
17. Hsieh, P.N.; Fan, L.; Sweet, D.R.; Jain, M.K. The Krüppel-Like Factors and Control of Energy Homeostasis. *Endocr. Rev.* **2019**, *40*, 137–152. [[CrossRef](#)]
18. Oishi, Y.; Manabe, I. Kruppel-Like Factors in Metabolic Homeostasis and Cardiometabolic Disease. *Front. Cardiovasc. Med.* **2018**, *5*, 69. [[CrossRef](#)]
19. Subramaniam, M.; Gorny, G.; Johnsen, S.A.; Monroe, D.G.; Evans, G.L.; Fraser, D.G.; Rickard, D.J.; Rasmussen, K.; van Deursen, J.M.; Turner, R.T.; et al. TIEG1 null mouse-derived osteoblasts are defective in mineralization and in support of osteoclast differentiation in vitro. *Mol. Cell. Biol.* **2005**, *25*, 1191–1199. [[CrossRef](#)]
20. Bensamoun, S.F.; Tsubone, T.; Subramaniam, M.; Hawse, J.R.; Boumediene, E.; Spelsberg, T.C.; An, K.N.; Amadio, P.C. Age-dependent changes in the mechanical properties of tail tendons in TGF-beta inducible early gene-1 knockout mice. *J. Appl. Physiol.* **2006**, *101*, 1419–1424. [[CrossRef](#)]
21. Gumez, L.; Bensamoun, S.F.; Doucet, J.; Haddad, O.; Hawse, J.R.; Subramaniam, M.; Spelsberg, T.C.; Pichon, C. Molecular structure of tail tendon fibers in TIEG1 knockout mice using synchrotron diffraction technology. *J. Appl. Physiol.* **2010**, *108*, 1706–1710. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Bensamoun, S.F.; Hawse, J.R.; Subramaniam, M.; Ilharreborde, B.; Bassillais, A.; Benhamou, C.L.; Fraser, D.G.; Oursler, M.J.; Amadio, P.C.; An, K.N.; et al. TGFbeta inducible early gene-1 knockout mice display defects in bone strength and microarchitecture. *Bone* **2006**, *39*, 1244–1251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Haddad, O.; Hawse, J.R.; Subramaniam, M.; Spelsberg, T.C.; Bensamoun, S.F. Tie1-Null Osteocytes Display Defects in Their Morphology, Density and Surrounding Bone Matrix. *J. Musculoskelet. Res.* **2009**, *12*, 127–136. [[CrossRef](#)]
24. Hawse, J.R.; Iwaniec, U.T.; Bensamoun, S.F.; Monroe, D.G.; Peters, K.D.; Ilharreborde, B.; Rajamannan, N.M.; Oursler, M.J.; Turner, R.T.; Spelsberg, T.C.; et al. TIEG-null mice display an osteopenic gender-specific phenotype. *Bone* **2008**, *42*, 1025–1031. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Tsubone, T.; Moran, S.L.; Subramaniam, M.; Amadio, P.C.; Spelsberg, T.C.; An, K.N. Effect of TGF-beta inducible early gene deficiency on flexor tendon healing. *J. Orthop. Res.* **2006**, *24*, 569–575. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Kammoun, M.; Pouletaut, P.; Canon, F.; Subramaniam, M.; Hawse, J.R.; Vayssade, M.; Bensamoun, S.F. Impact of TIEG1 Deletion on the Passive Mechanical Properties of Fast and Slow Twitch Skeletal Muscles in Female Mice. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0164566. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Kammoun, M.; Pouletaut, P.; Morandat, S.; Subramaniam, M.; Hawse, J.R.; Bensamoun, S.F. Krüppel-like factor 10 regulates the contractile properties of skeletal muscle fibers in mice. *Muscle Nerve* **2021**, *64*, 765–769. [[CrossRef](#)]
28. Kammoun, M.; Piquereau, J.; Nadal-Desbarats, L.; Meme, S.; Beuvin, M.; Bonne, G.; Veksler, V.; Le Fur, Y.; Pouletaut, P.; Meme, W.; et al. Novel role of Tie1 in muscle metabolism and mitochondrial oxidative capacities. *Acta Physiol.* **2020**, *228*, e13394. [[CrossRef](#)]
29. Newgard, C.B. Metabolomics and Metabolic Diseases: Where Do We Stand? *Cell Metab.* **2017**, *25*, 43–56. [[CrossRef](#)]
30. Wishart, D.S. Emerging applications of metabolomics in drug discovery and precision medicine. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, *15*, 473–484. [[CrossRef](#)]
31. Wishart, D.S.; Mandal, R.; Stanislaus, A.; Ramirez-Gaona, M. Cancer Metabolomics and the Human Metabolome Database. *Metabolites* **2016**, *6*, 10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Pang, Z.; Chong, J.; Zhou, G.; de Lima Morais, D.A.; Chang, L.; Barrette, M.; Gauthier, C.; Jacques, P.E.; Li, S.; Xia, J. MetaboAnalyst 5.0: Narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, W388–W396. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Houtkooper, R.H.; Argmann, C.; Houten, S.M.; Canto, C.; Jeninga, E.H.; Andreux, P.A.; Thomas, C.; Doenlen, R.; Schoonjans, K.; Auwerx, J. The metabolic footprint of aging in mice. *Sci. Rep.* **2011**, *1*, 134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Koves, T.R.; Ussher, J.R.; Noland, R.C.; Slentz, D.; Mosedale, M.; Ilkayeva, O.; Bain, J.; Stevens, R.; Dyck, J.R.; Newgard, C.B.; et al. Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metab.* **2008**, *7*, 45–56. [[CrossRef](#)]
35. Mihalik, S.J.; Goodpaster, B.H.; Kelley, D.E.; Chace, D.H.; Vockley, J.; Toledo, F.G.; DeLany, J.P. Increased levels of plasma acylcarnitines in obesity and type 2 diabetes and identification of a marker of glucolipototoxicity. *Obesity* **2010**, *18*, 1695–1700. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Vander Heiden, M.G.; Cantley, L.C.; Thompson, C.B. Understanding the Warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **2009**, *324*, 1029–1033. [[CrossRef](#)]
37. Subramaniam, M.; Hawse, J.R.; Rajamannan, N.M.; Ingle, J.N.; Spelsberg, T.C. Functional role of KLF10 in multiple disease processes. *Biofactors* **2010**, *36*, 8–18. [[CrossRef](#)]

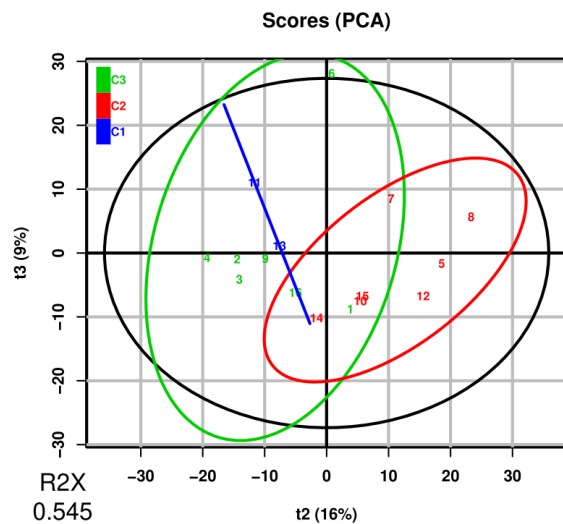
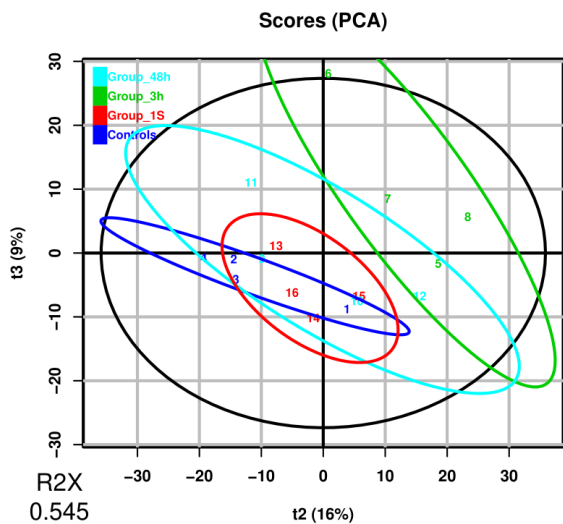
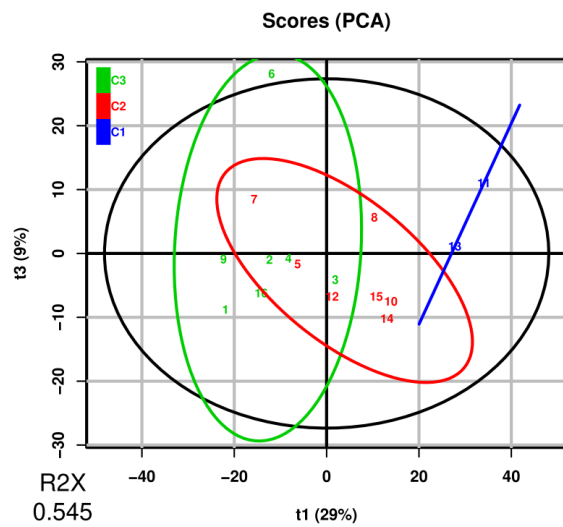
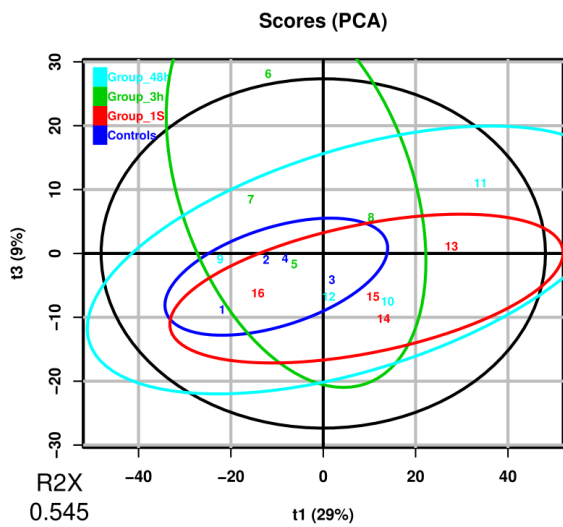
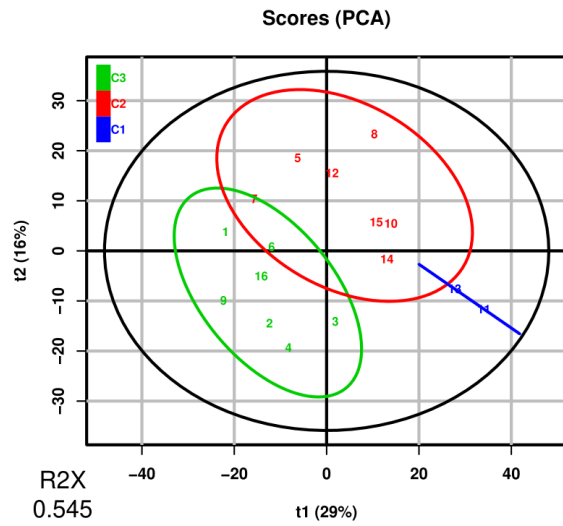
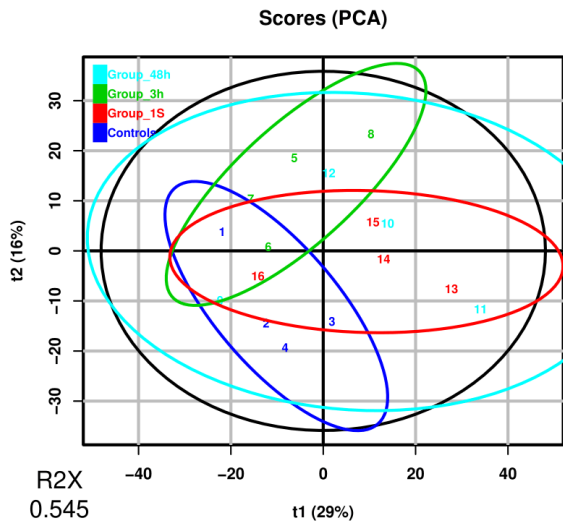
38. Garvey, S.M.; Dugle, J.E.; Kennedy, A.D.; McDunn, J.E.; Kline, W.; Guo, L.; Guttridge, D.C.; Pereira, S.L.; Edens, N.K. Metabolomic profiling reveals severe skeletal muscle group-specific perturbations of metabolism in aged FBN rats. *Biogerontology* **2014**, *15*, 217–232. [[CrossRef](#)]
39. Sun, N.; Youle, R.J.; Finkel, T. The Mitochondrial Basis of Aging. *Mol. Cell* **2016**, *61*, 654–666. [[CrossRef](#)]
40. Harrison, D.E.; Strong, R.; Sharp, Z.D.; Nelson, J.F.; Astle, C.M.; Flurkey, K.; Nadon, N.L.; Wilkinson, J.E.; Frenkel, K.; Carter, C.S.; et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* **2009**, *460*, 392–395. [[CrossRef](#)]
41. Russell, S.J.; Kahn, C.R. Endocrine regulation of ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2007**, *8*, 681–691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Cheng, Z.; Tseng, Y.; White, M.F. Insulin signaling meets mitochondria in metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* **2010**, *21*, 589–598. [[CrossRef](#)]
43. Wullschleger, S.; Loewith, R.; Hall, M.N. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **2006**, *124*, 471–484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Zoncu, R.; Efeyan, A.; Sabatini, D.M. mTOR: From growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2011**, *12*, 21–35. [[CrossRef](#)]
45. Lawton, K.A.; Berger, A.; Mitchell, M.; Milgram, K.E.; Evans, A.M.; Guo, L.; Hanson, R.W.; Kalhan, S.C.; Ryals, J.A.; Milburn, M.V. Analysis of the adult human plasma metabolome. *Pharmacogenomics* **2008**, *9*, 383–397. [[CrossRef](#)]
46. Senoo, N.; Miyoshi, N.; Goto-Inoue, N.; Minami, K.; Yoshimura, R.; Morita, A.; Sawada, N.; Matsuda, J.; Ogawa, Y.; Setou, M.; et al. PGC-1 α -mediated changes in phospholipid profiles of exercise-trained skeletal muscle. *J. Lipid Res.* **2015**, *56*, 2286–2296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Uchitomi, R.; Hatazawa, Y.; Senoo, N.; Yoshioka, K.; Fujita, M.; Shimizu, T.; Miura, S.; Ono, Y.; Kamei, Y. Metabolomic Analysis of Skeletal Muscle in Aged Mice. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 10425. [[CrossRef](#)]
48. Suhre, K.; Meisinger, C.; Doring, A.; Altmaier, E.; Belcredi, P.; Gieger, C.; Chang, D.; Milburn, M.V.; Gall, W.E.; Weinberger, K.M.; et al. Metabolic footprint of diabetes: A multiplatform metabolomics study in an epidemiological setting. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e13953. [[CrossRef](#)]
49. Han, S.; Zhang, R.; Jain, R.; Shi, H.; Zhang, L.; Zhou, G.; Sangwung, P.; Tugal, D.; Atkins, G.B.; Prosdocimo, D.A.; et al. Circadian control of bile acid synthesis by a KLF15-Fgf15 axis. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 7231. [[CrossRef](#)]
50. Leclere, P.S.; Rousseau, D.; Patouraux, S.; Guerin, S.; Bonnafeous, S.; Grechez-Cassiau, A.; Ruberto, A.A.; Luci, C.; Subramaniam, M.; Tran, A.; et al. MCD diet-induced steatohepatitis generates a diurnal rhythm of associated biomarkers and worsens liver injury in Klf10 deficient mice. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 12139. [[CrossRef](#)]
51. Lee, J.; Oh, A.R.; Lee, H.Y.; Moon, Y.A.; Lee, H.J.; Cha, J.Y. Deletion of KLF10 Leads to Stress-Induced Liver Fibrosis upon High Sucrose Feeding. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *22*, 331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Yang, J.; Zhang, H.; Wang, X.; Guo, J.; Wei, L.; Song, Y.; Luo, Y.; Zhao, Y.; Subramaniam, M.; Spelsberg, T.C.; et al. Kruppel-like factor 10 protects against acute viral myocarditis by negatively regulating cardiac MCP-1 expression. *Cell. Mol. Immunol.* **2021**, *18*, 2236–2248. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Lefevre, A.; Mavel, S.; Nadal-Desbarats, L.; Galineau, L.; Attucci, S.; Dufour, D.; Sokol, H.; Emond, P. Validation of a global quantitative analysis methodology of tryptophan metabolites in mice using LC-MS. *Talanta* **2019**, *195*, 593–598. [[CrossRef](#)]
54. Martias, C.; Baroukh, N.; Mavel, S.; Blasco, H.; Lefevre, A.; Roch, L.; Montigny, F.; Gatién, J.; Schibler, L.; Dufour-Rainfray, D.; et al. Optimization of Sample Preparation for Metabolomics Exploration of Urine, Feces, Blood and Saliva in Humans Using Combined NMR and UHPLC-HRMS Platforms. *Molecules* **2021**, *26*, 4111. [[CrossRef](#)]
55. Rathahao-Paris, E.; Alves, S.; Junot, C.; Tabet, J.-C. High resolution mass spectrometry for structural identification of metabolites in metabolomics. *Metabolomics* **2015**, *12*, 1–15. [[CrossRef](#)]
56. Bardou, P.; Mariette, J.; Escudie, F.; Djemiel, C.; Klopp, C. jvenn: An interactive Venn diagram viewer. *BMC Bioinform.* **2014**, *15*, 293. [[CrossRef](#)]
57. Beauclercq, S.; Nadal-Desbarats, L.; Hennequet-Antier, C.; Collin, A.; Tesseraud, S.; Bourin, M.; Le Bihan-Duval, E.; Berri, C. Serum and Muscle Metabolomics for the Prediction of Ultimate pH, a Key Factor for Chicken-Meat Quality. *J. Proteome Res.* **2016**, *15*, 1168–1178. [[CrossRef](#)]
58. Johnson, C.H.; Ivanisevic, J.; Siuzdak, G. Metabolomics: Beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2016**, *17*, 451–459. [[CrossRef](#)]

Annexe 1: Liste des gènes dérégulés après ouverture de la barrière hématoencéphalique par sonoporation selon les comparaisons entre les groupes.

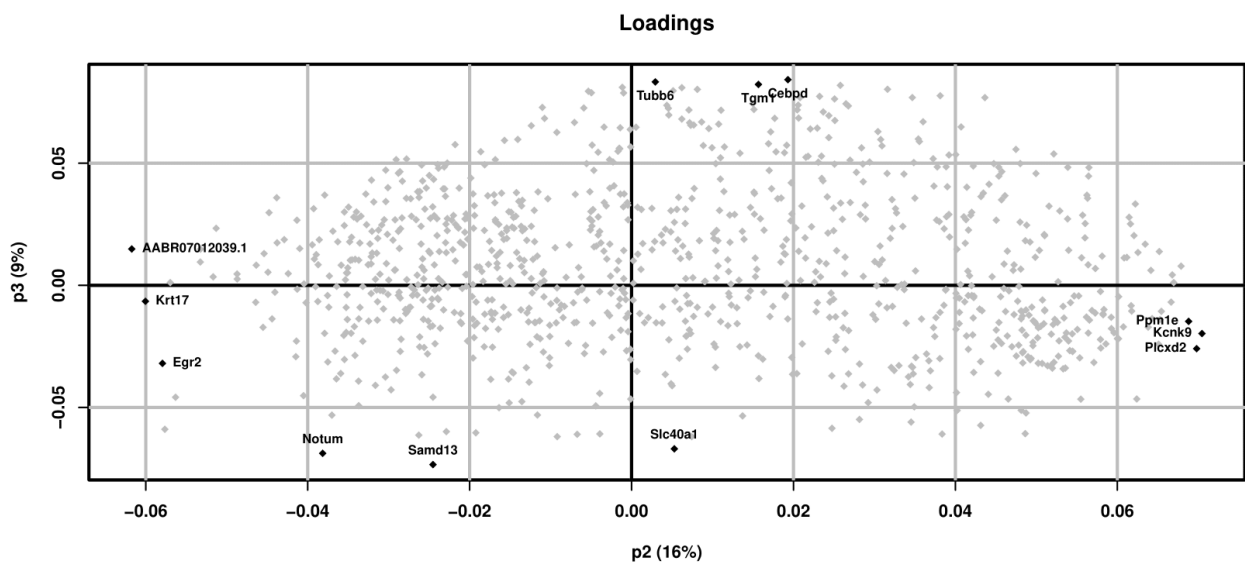
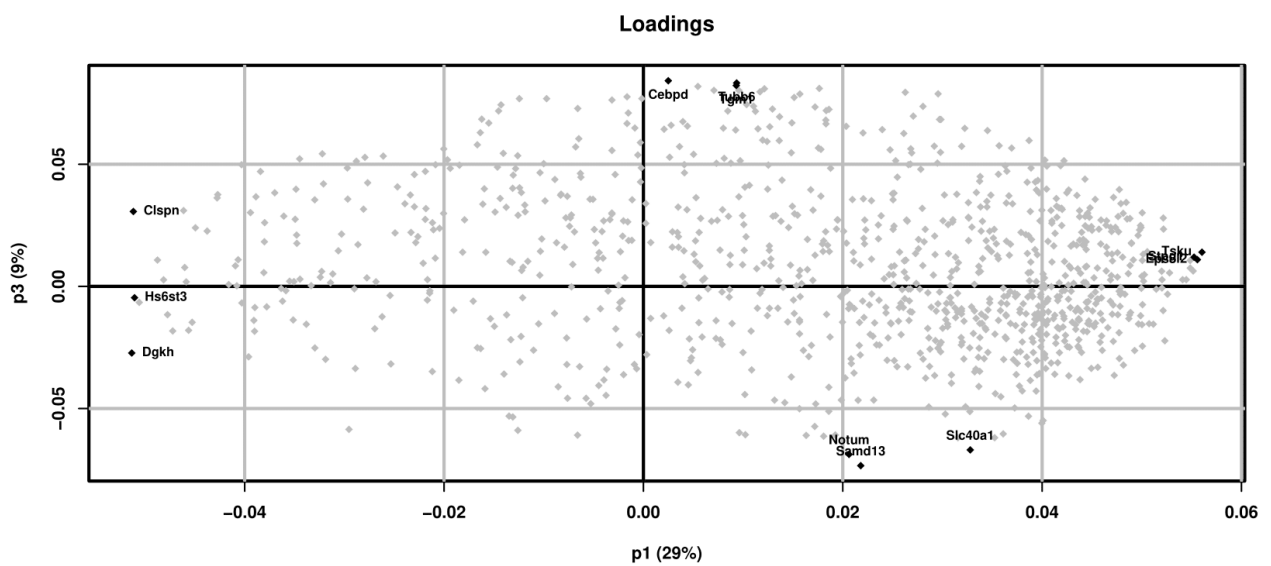
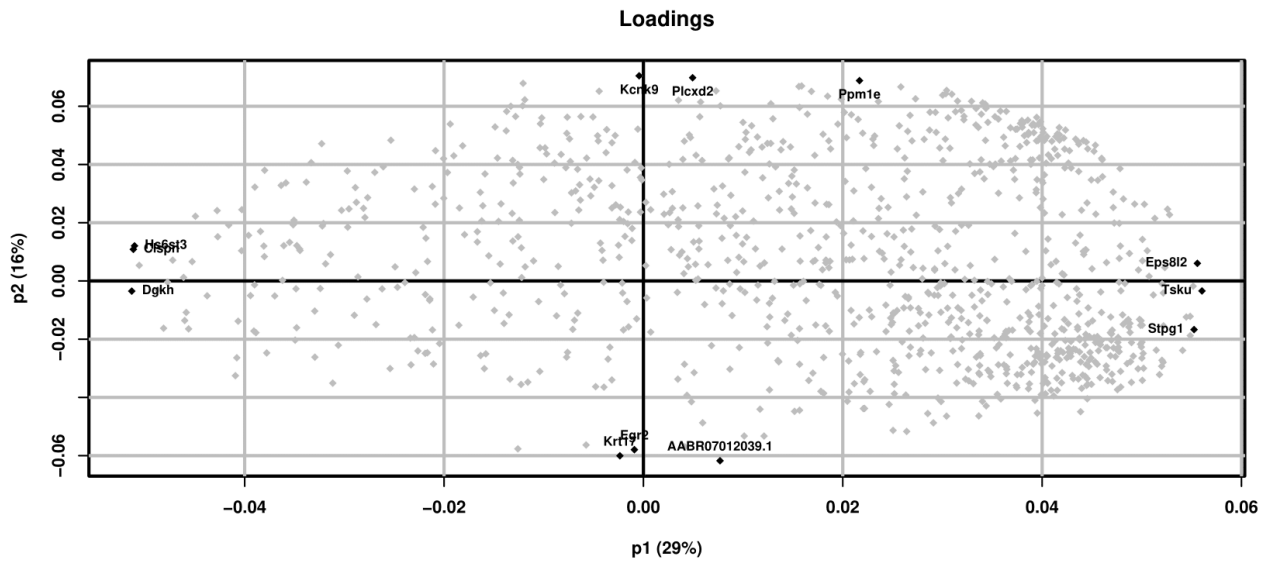
Groupes	Gène	Log2(FC)	q-value	Description (GO)
3 h vs contrôles	C1ql3	1.07	0.02	complement C1q like 3
	Cck	2.21	0.09	cholecystokinin
	Cd163	1.11	0.04	CD163 molecule
	Cdkn1a	1.43	0.07	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
	Gpd1	1.43	0.06	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1
	Hif3a	2.45	0.006	hypoxia inducible factor 3 subunit α
	Nek5	1.43	0.07	NIMA-related kinase 5
	Pdk4	1.54	0.05	pyruvate dehydrogenase kinase 4
	Pex11a	1.32	0.05	peroxisomal biogenesis factor 11 α
	Pla2g3	1.75	0.04	phospholipase A2, group III
	Plin4	1.47	0.07	perilipin 4
	Prr5	1.00	0.02	proline rich 5
	Sh3rf2	-1.17	0.006	similar to RIKEN cDNA A930018P22
	Slc19a3	1.46	0.08	SH3 domain containing ring finger 2
	Tinag1	1.06	0.07	solute carrier family 19 member 3
	Tmem252	1.88	0.05	tubulointerstitial nephritis antigen-like 1
	Tnfrsf11a	1.13	0.04	transmembrane protein 252
	Zbtb16	2.38	0.02	TNF receptor superfamily member 11A
RGD1563222	3.06	0.07	zinc finger and BTB domain containing 16	
1 semaine vs contrôles	Aebp1	1.09	0.09	AE binding protein 1
	C3	2.08	0.09	complement C3
	Ccdc136	1.06	0.09	coiled-coil domain containing 136
	Lef1	1.10	0.09	lymphoid enhancer binding factor 1
	Mlnr	2.33	0.06	motilin receptor
	Npas4	1.36	0.09	neuronal PAS domain protein 4
	Nrn1	1.76	0.06	neuritin 1
	Papln	3.45	0.09	papilin, proteoglycan-like sulfated glycoprotein
	Prkcd	1.79	0.09	protein kinase C, delta
	Ramp3	1.34	0.09	receptor activity modifying protein 3
	Rgs16	1.49	0.09	regulator of G-protein signaling 16
	Tcf7l2	1.23	0.09	transcription factor 7 like 2
	3 h vs 48 h	Gpd1	1.57	0.005
Hif3a		2.24	0.05	hypoxia inducible factor 3 subunit α
Neurog1		-3.32	0.05	neurogenin 1
Pex11a		1.35	0.09	peroxisomal biogenesis factor 11 α
Sgk1		1.24	0.03	serum/glucocorticoid regulated kinase 1
Slco1c1		-1.00	0.05	solute carrier organic anion transporter family, member 1c1
Tfcp2l1		1.00	0.05	transcription factor CP2-like 1
Tmem252		2.37	0.02	transmembrane protein 252
Zbtb16		2.09	0.05	zinc finger and BTB domain containing 16



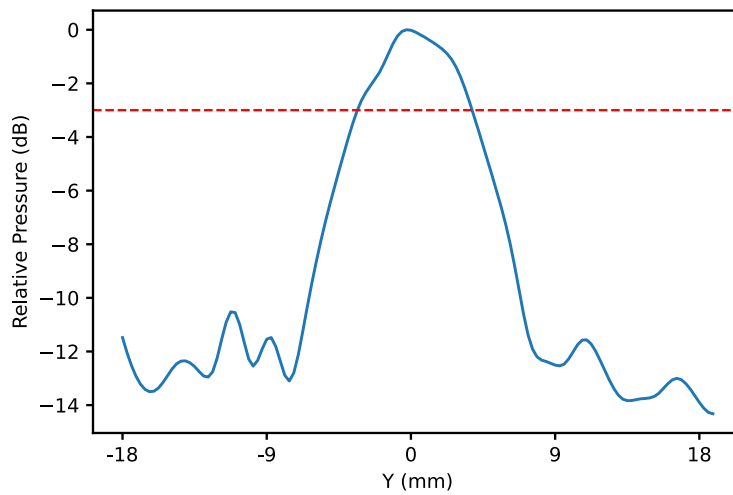
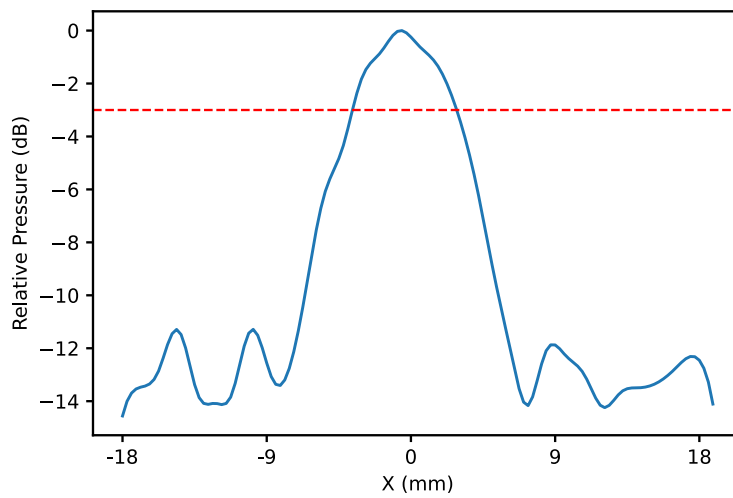
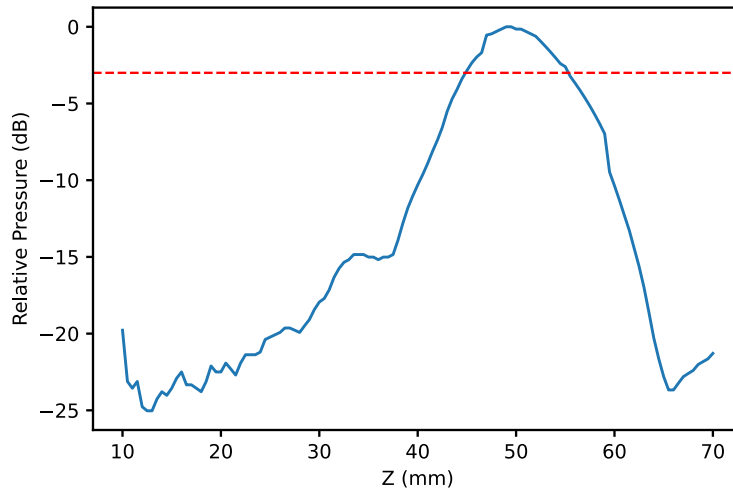
Annexe 2 : Classification hiérarchique suivant le *consensus clustering* des échantillons basée sur les 1000 gènes les plus variants. Les échantillons **bleus** correspondent aux échantillons appartenant au groupe contrôle. Les échantillons **rouges** correspondent aux échantillons appartenant au groupe 3 h après la sonoporation. Les échantillons **verts** correspondent aux échantillons appartenant au groupe 48 h après la sonoporation. Les échantillons **marrons** correspondent aux échantillons appartenant au groupe 1 semaine après la sonoporation. Le numéro de l'échantillon peut être mis en correspondance avec l'appartenance à son groupe.



Annexe 5 : *Score plot* des trois premières dimensions (1 vs 2 ; 1 vs 3 ; 2 vs 3) des analyses en composantes principales des 1000 gènes les plus variants, annotés d'après l'appartenance aux groupes expérimentaux, ou d'après les résultats du *consensus clustering*.



Annexe 4 : *Loadings* des trois premières dimensions (1 vs 2 ; 1 vs 3 ; 2 vs 3) des analyses en composantes principales des 1000 gènes les plus variants correspondant aux *Score plots* de l'annexe 2. Les *loadings* décrivent comment chaque gène contribue à la variance expliquée par les composantes principales.



Annexe 5 : Profils axial (en A) et latéraux, en X (en B) et en Y (en C) de la tâche focale du transducteur 1 MHz. Le trait pointillé correspond à une amplitude -3 dB et permet la mesure (en mm) des profils.

Call:

```
lm(formula = mean ~ amplitude, data = df)
```

Residuals:

```
Min    1Q  Median    3Q   Max
-3.1385 -1.1726  0.5717  1.1379  2.3391
```

Coefficients:

```
Estimate Std. Error t value Pr(> |t|)
```

```
(Intercept) 3.42938  1.10146  3.113  0.011 *
```

```
amplitude  5.52966  0.01497 369.484 <2e-16 ***
```

```
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Residual standard error: 1.79 on 10 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.9999, Adjusted R-squared: 0.9999

F-statistic: 1.365e+05 on 1 and 10 DF, p-value: < 2.2e-16

Annexe 6 : Paramètres de la régression linéaire entre la pression acoustique générée par le transducteur et la tension appliquée au générateur. La droite est de la forme $y = ax + b$ où a est le coefficient directeur de la droite (amplitude représentée en gras dans le texte) et b est l'ordonnée à l'origine (*Intercept* représentée en gras dans le texte).

Annexe 7 : Etude des relations entre les gènes dérégulés entre les groupes contrôle et 3 h après la sonoporation.

ID	Description	GeneRatio	BgRatio	pvalue	p.adjust	qvalue	geneID	Count
R-RNO-6804116	TP53 Regulates Transcription of Genes Involved in G1 Cell Cycle Arrest	1/11	6/7452	0,009	0,090	0,049	Cdkn1a	1
R-RNO-1483206	Glycerophospholipid biosynthesis	2/11	102/7452	0,009	0,090	0,049	Pla2g3/Gpd1	2
R-RNO-198323	AKT phosphorylates targets in the cytosol	1/11	10/7452	0,015	0,090	0,049	Cdkn1a	1
R-RNO-204174	Regulation of pyruvate dehydrogenase (PDH) complex	1/11	12/7452	0,018	0,090	0,049	Pdk4	1
R-RNO-2168880	Scavenging of heme from plasma	1/11	13/7452	0,019	0,090	0,049	Cd163	1
R-RNO-1482925	Acyl chain remodelling of PG	1/11	14/7452	0,020	0,090	0,049	Pla2g3	1
R-RNO-187577	SCF(Skp2)-mediated degradation of p27/p21	1/11	15/7452	0,022	0,090	0,049	Cdkn1a	1
R-RNO-69563	p53-Dependent G1 DNA Damage Response	1/11	15/7452	0,022	0,090	0,049	Cdkn1a	1
R-RNO-69580	p53-Dependent G1/S DNA damage checkpoint	1/11	15/7452	0,022	0,090	0,049	Cdkn1a	1
R-RNO-1483257	Phospholipid metabolism	2/11	164/7452	0,023	0,090	0,049	Pla2g3/Gpd1	2
R-RNO-1257604	PIP3 activates AKT signaling	2/11	166/7452	0,024	0,090	0,049	Prr5/Cdkn1a	2
R-RNO-1234176	Oxygen-dependent proline hydroxylation of Hypoxia-inducible Factor Alpha	1/11	17/7452	0,025	0,090	0,049	Hif3a	1
R-RNO-5676594	TNF receptor superfamily (TNFSF) members mediating non-canonical NF-kB pathway	1/11	17/7452	0,025	0,090	0,049	Tnfrsf11a	1
R-RNO-69202	Cyclin E associated events during G1/S transition	1/11	18/7452	0,026	0,090	0,049	Cdkn1a	1
R-RNO-69615	G1/S DNA Damage Checkpoints	1/11	18/7452	0,026	0,090	0,049	Cdkn1a	1
R-RNO-1234174	Cellular response to hypoxia	1/11	19/7452	0,028	0,090	0,049	Hif3a	1
R-RNO-69656	Cyclin A:Cdk2-associated events at S phase entry	1/11	19/7452	0,028	0,090	0,049	Cdkn1a	1
R-RNO-8951664	Neddylation	2/11	185/7452	0,029	0,090	0,049	Hif3a/Zbtb16	2
R-RNO-70268	Pyruvate metabolism	1/11	20/7452	0,029	0,090	0,049	Pdk4	1
R-RNO-9006925	Intracellular signaling by second messengers	2/11	188/7452	0,030	0,090	0,049	Prr5/Cdkn1a	2
R-RNO-389357	CD28 dependent PI3K/Akt signaling	1/11	21/7452	0,031	0,090	0,049	Prr5	1
R-RNO-2173782	Binding and Uptake of Ligands by Scavenger Receptors	1/11	23/7452	0,033	0,094	0,051	Cd163	1
R-RNO-6791312	TP53 Regulates Transcription of Cell Cycle Genes	1/11	26/7452	0,038	0,097	0,053	Cdkn1a	1
R-RNO-1483166	Synthesis of PA	1/11	27/7452	0,039	0,097	0,053	Gpd1	1
R-RNO-389356	CD28 co-stimulation	1/11	28/7452	0,041	0,097	0,053	Prr5	1
R-RNO-5218920	VEGFR2 mediated vascular permeability	1/11	28/7452	0,041	0,097	0,053	Prr5	1
R-RNO-8852276	The role of GTSE1 in G2/M progression after G2 checkpoint	1/11	30/7452	0,043	0,099	0,054	Cdkn1a	1
R-RNO-5362517	Signaling by Retinoic Acid	1/11	31/7452	0,045	0,099	0,054	Pdk4	1
R-RNO-69231	Cyclin D associated events in G1	1/11	34/7452	0,049	0,101	0,055	Cdkn1a	1
R-RNO-69236	G1 Phase	1/11	34/7452	0,049	0,101	0,055	Cdkn1a	1
R-RNO-71406	Pyruvate metabolism and Citric Acid (TCA) cycle	1/11	39/7452	0,056	0,112	0,061	Pdk4	1
R-RNO-2262752	Cellular responses to stress	2/11	270/7452	0,058	0,112	0,061	Hif3a/Cdkn1a	2
R-RNO-5668541	TNFR2 non-canonical NF-kB pathway	1/11	45/7452	0,064	0,121	0,066	Tnfrsf11a	1
R-RNO-69206	G1/S Transition	1/11	51/7452	0,073	0,133	0,072	Cdkn1a	1
R-RNO-388841	Costimulation by the CD28 family	1/11	57/7452	0,081	0,144	0,078	Prr5	1
R-RNO-2559586	DNA Damage/Telomere Stress Induced Senescence	1/11	62/7452	0,088	0,149	0,081	Cdkn1a	1
R-RNO-8953897	Cellular responses to external stimuli	2/11	344/7452	0,089	0,149	0,081	Hif3a/Cdkn1a	2

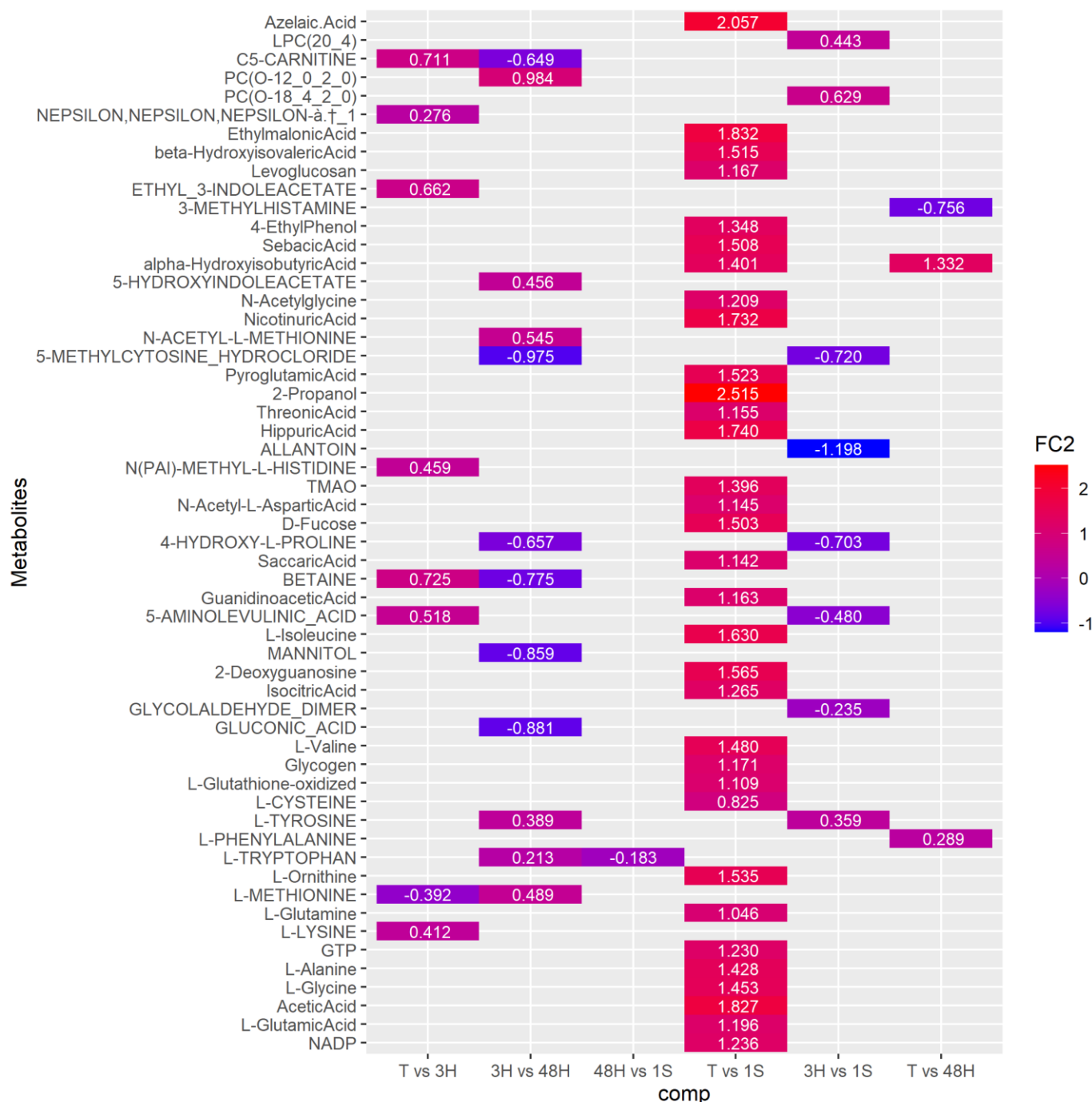
Annexe 8 : Etude des relations entre les gènes dérégulés entre les groupes 3 h et 48 h après la sonoporation.

ID	Description	GeneRatio	BgRatio	pvalue	p.adjust	qvalue	geneID	Count
R-RNO-8951664	Neddylaton	2/4	186/7466	0,004	0,031	0,018	Hif3a/Zbtb16	2
R-RNO-879518	Transport of organic anions	1/4	9/7466	0,005	0,031	0,018	Slco1c1	1
R-RNO-1483166	Synthesis of PA	1/4	32/7466	0,017	0,062	0,035	Gpd1	1
R-RNO-425397	Transport of vitamins, nucleosides, and related molecules	1/4	36/7466	0,019	0,062	0,035	Slco1c1	1
R-RNO-1234176	Oxygen-dependent proline hydroxylation of Hypoxia-inducible Factor Alpha	1/4	60/7466	0,032	0,071	0,040	Hif3a	1
R-RNO-1234174	Cellular response to hypoxia	1/4	62/7466	0,033	0,071	0,040	Hif3a	1
R-RNO-1483206	Glycerophospholipid biosynthesis	1/4	104/7466	0,055	0,101	0,057	Gpd1	1
R-RNO-1483257	Phospholipid metabolism	1/4	168/7466	0,087	0,141	0,080	Gpd1	1

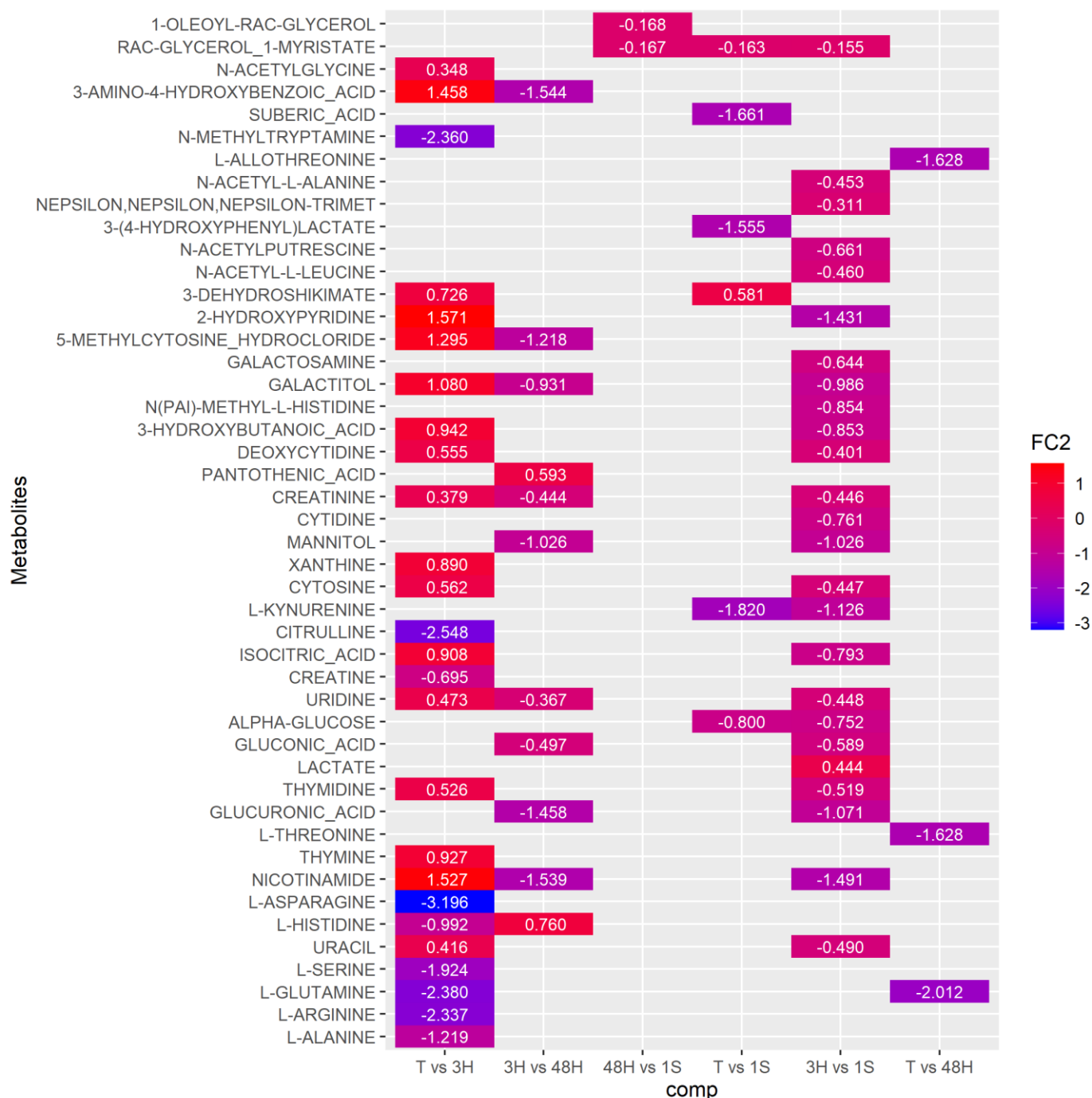
Annexe 9 : Etude des relations entre les gènes dérégulés entre les groupes contrôle et 1 semaine après la sonoporation.

ID	Description	GeneRatio	BgRatio	pvalue	p.adjust	qvalue	geneID	Count
R-RNO-173736	Alternative complement activation	1/5	1/7466	0,001	0,040	0,014	C3	1
R-RNO-8951430	RUNX3 regulates WNT signaling	1/5	3/7466	0,002	0,052	0,018	Lef1	1
R-RNO-174577	Activation of C3 and C5	1/5	4/7466	0,003	0,052	0,018	C3	1
R-RNO-450520	HuR (ELAVL1) binds and stabilizes mRNA	1/5	6/7466	0,004	0,052	0,018	Prkcd	1
R-RNO-4641265	Repression of WNT target genes	1/5	7/7466	0,005	0,052	0,018	Lef1	1
R-RNO-1250196	SHC1 events in ERBB2 signaling	1/5	9/7466	0,006	0,052	0,018	Prkcd	1
R-RNO-419812	Calcitonin-like ligand receptors	1/5	10/7466	0,007	0,052	0,018	Ramp3	1
R-RNO-5218921	VEGFR2 mediated cell proliferation	1/5	13/7466	0,009	0,052	0,018	Prkcd	1
R-RNO-877300	Interferon gamma signaling	1/5	14/7466	0,009	0,052	0,018	Prkcd	1
R-RNO-418594	G alpha (i) signalling events	2/5	241/7466	0,010	0,052	0,018	C3/Prkcd	2
R-RNO-166663	Initial triggering of complement	1/5	16/7466	0,011	0,052	0,018	C3	1
R-RNO-114508	Effects of PIP2 hydrolysis	1/5	20/7466	0,013	0,052	0,018	Prkcd	1
R-RNO-2029485	Role of phospholipids in phagocytosis	1/5	20/7466	0,013	0,052	0,018	Prkcd	1
R-RNO-5668599	RHO GTPases Activate NADPH Oxidases	1/5	20/7466	0,013	0,052	0,018	Prkcd	1
R-RNO-111933	Calmodulin induced events	1/5	23/7466	0,015	0,052	0,018	Prkcd	1
R-RNO-111997	CaM pathway	1/5	23/7466	0,015	0,052	0,018	Prkcd	1
R-RNO-111996	Ca-dependent events	1/5	24/7466	0,016	0,052	0,018	Prkcd	1
R-RNO-1489509	DAG and IP3 signaling	1/5	24/7466	0,016	0,052	0,018	Prkcd	1
R-RNO-977606	Regulation of Complement cascade	1/5	25/7466	0,017	0,052	0,018	C3	1
R-RNO-3769402	Deactivation of the beta-catenin transactivating complex	1/5	26/7466	0,017	0,052	0,018	Lef1	1
R-RNO-500792	GPCR ligand binding	2/5	343/7466	0,019	0,053	0,019	C3/Ramp3	2
R-RNO-111465	Apoptotic cleavage of cellular proteins	1/5	30/7466	0,020	0,053	0,019	Prkcd	1
R-RNO-112043	PLC beta mediated events	1/5	31/7466	0,021	0,053	0,019	Prkcd	1
R-RNO-166658	Complement cascade	1/5	32/7466	0,021	0,053	0,019	C3	1
R-RNO-1227986	Signaling by ERBB2	1/5	35/7466	0,023	0,055	0,019	Prkcd	1
R-RNO-112040	G-protein mediated events	1/5	36/7466	0,024	0,055	0,019	Prkcd	1
R-RNO-4086398	Ca2+ pathway	1/5	38/7466	0,025	0,055	0,019	Lef1	1
R-RNO-6798695	Neutrophil degranulation	2/5	399/7466	0,026	0,055	0,019	C3/Prkcd	2
R-RNO-75153	Apoptotic execution phase	1/5	41/7466	0,027	0,056	0,020	Prkcd	1
R-RNO-388396	GPCR downstream signalling	2/5	419/7466	0,028	0,056	0,020	C3/Prkcd	2

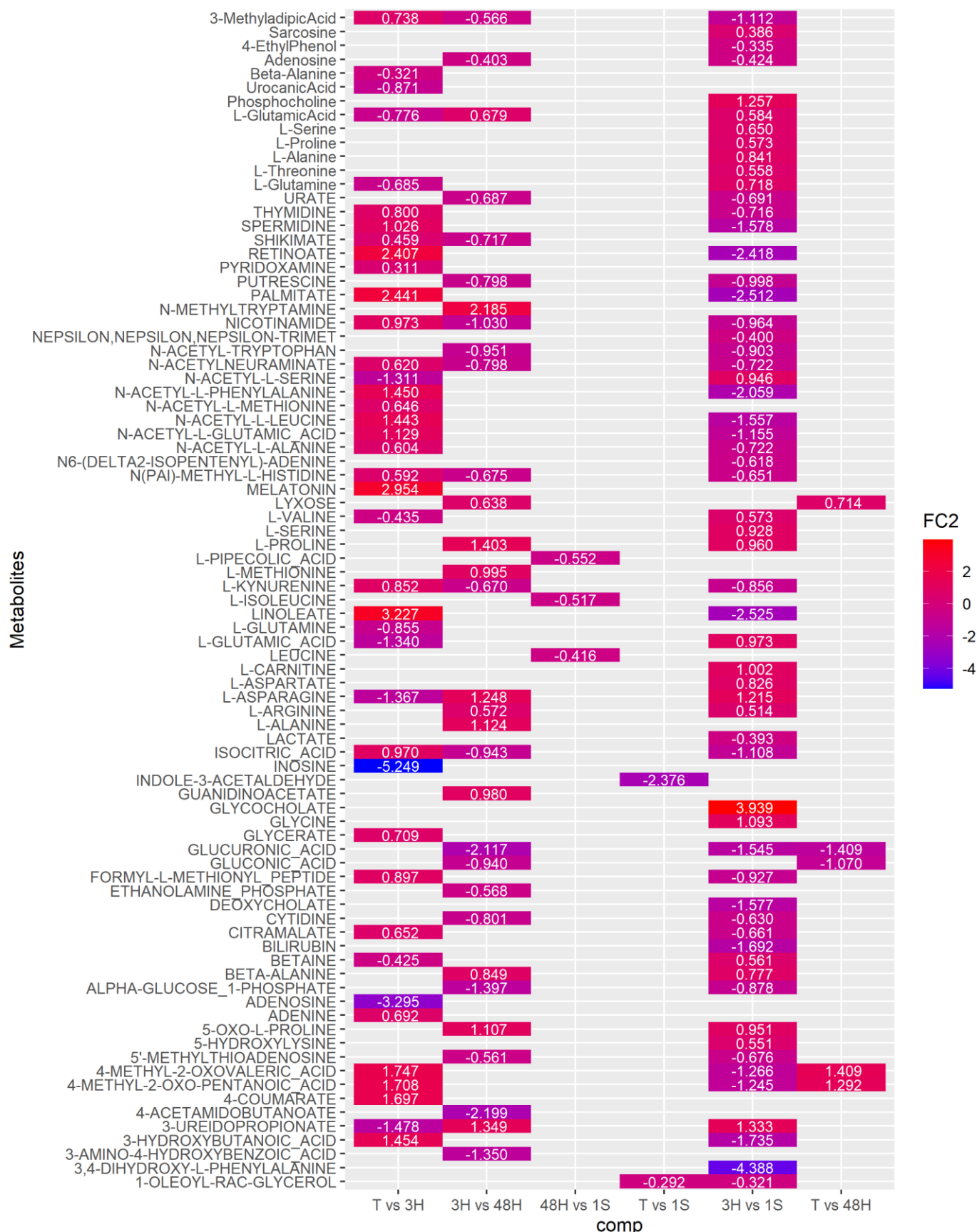
R-RNO-373080	Class B/2 (Secretin family receptors)	1/5	47/7466	0,031	0,060	0,021	Ramp3	1
R-RNO-201722	Formation of the beta-catenin:TCF transactivating complex	1/5	52/7466	0,034	0,064	0,022	Lef1	1
R-RNO-913531	Interferon Signaling	1/5	53/7466	0,035	0,064	0,022	Prkcd	1
R-RNO-8878159	Transcriptional regulation by RUNX3	1/5	58/7466	0,038	0,068	0,024	Lef1	1
R-RNO-111885	Opioid Signalling	1/5	63/7466	0,041	0,071	0,025	Prkcd	1
R-RNO-2029480	Fcgamma receptor (FCGR) dependent phagocytosis	1/5	65/7466	0,043	0,071	0,025	Prkcd	1
R-RNO-195253	Degradation of beta-catenin by the destruction complex	1/5	70/7466	0,046	0,073	0,025	Lef1	1
R-RNO-450531	Regulation of mRNA stability by proteins that bind AU-rich elements	1/5	70/7466	0,046	0,073	0,025	Prkcd	1
R-RNO-163125	Post-translational modification: synthesis of GPI-anchored proteins	1/5	76/7466	0,050	0,074	0,026	Nrn1	1
R-RNO-4420097	VEGFA-VEGFR2 Pathway	1/5	76/7466	0,050	0,074	0,026	Prkcd	1
R-RNO-5607764	CLEC7A (Dectin-1) signaling	1/5	77/7466	0,051	0,074	0,026	Prkcd	1
R-RNO-194138	Signaling by VEGF	1/5	82/7466	0,054	0,076	0,027	Prkcd	1
R-RNO-8957275	Post-translational protein phosphorylation	1/5	84/7466	0,055	0,076	0,027	C3	1
R-RNO-198933	Immunoregulatory interactions between a Lymphoid and a non-Lymphoid cell	1/5	85/7466	0,056	0,076	0,027	C3	1
R-RNO-109581	Apoptosis	1/5	87/7466	0,057	0,076	0,027	Prkcd	1
R-RNO-5621481	C-type lectin receptors (CLRs)	1/5	92/7466	0,060	0,078	0,028	Prkcd	1
R-RNO-381426	Regulation of Insulin-like Growth Factor (IGF) transport and uptake by Insulin-like Growth Factor Binding Proteins (IGFBPs)	1/5	99/7466	0,065	0,082	0,029	C3	1
R-RNO-3858494	Beta-catenin independent WNT signaling	1/5	106/7466	0,069	0,086	0,030	Lef1	1
R-RNO-5357801	Programmed Cell Death	1/5	110/7466	0,072	0,088	0,031	Prkcd	1
R-RNO-375276	Peptide ligand-binding receptors	1/5	154/7466	0,099	0,119	0,042	C3	1
R-RNO-201681	TCF dependent signaling in response to WNT	1/5	165/7466	0,106	0,124	0,044	Lef1	1
R-RNO-416476	G alpha (q) signalling events	1/5	173/7466	0,111	0,128	0,045	Prkcd	1
R-RNO-76002	Platelet activation, signaling and aggregation	1/5	216/7466	0,137	0,155	0,054	Prkcd	1
R-RNO-9006925	Intracellular signaling by second messengers	1/5	228/7466	0,144	0,159	0,056	Prkcd	1
R-RNO-195721	Signaling by WNT	1/5	235/7466	0,148	0,159	0,056	Lef1	1
R-RNO-195258	RHO GTPase Effectors	1/5	236/7466	0,148	0,159	0,056	Prkcd	1
R-RNO-373076	Class A/1 (Rhodopsin-like receptors)	1/5	267/7466	0,167	0,175	0,062	C3	1
R-RNO-1280215	Cytokine Signaling in Immune system	1/5	318/7466	0,196	0,202	0,071	Prkcd	1
R-RNO-9006934	Signaling by Receptor Tyrosine Kinases	1/5	335/7466	0,205	0,209	0,073	Prkcd	1
R-RNO-109582	Hemostasis	1/5	434/7466	0,259	0,259	0,091	Prkcd	1



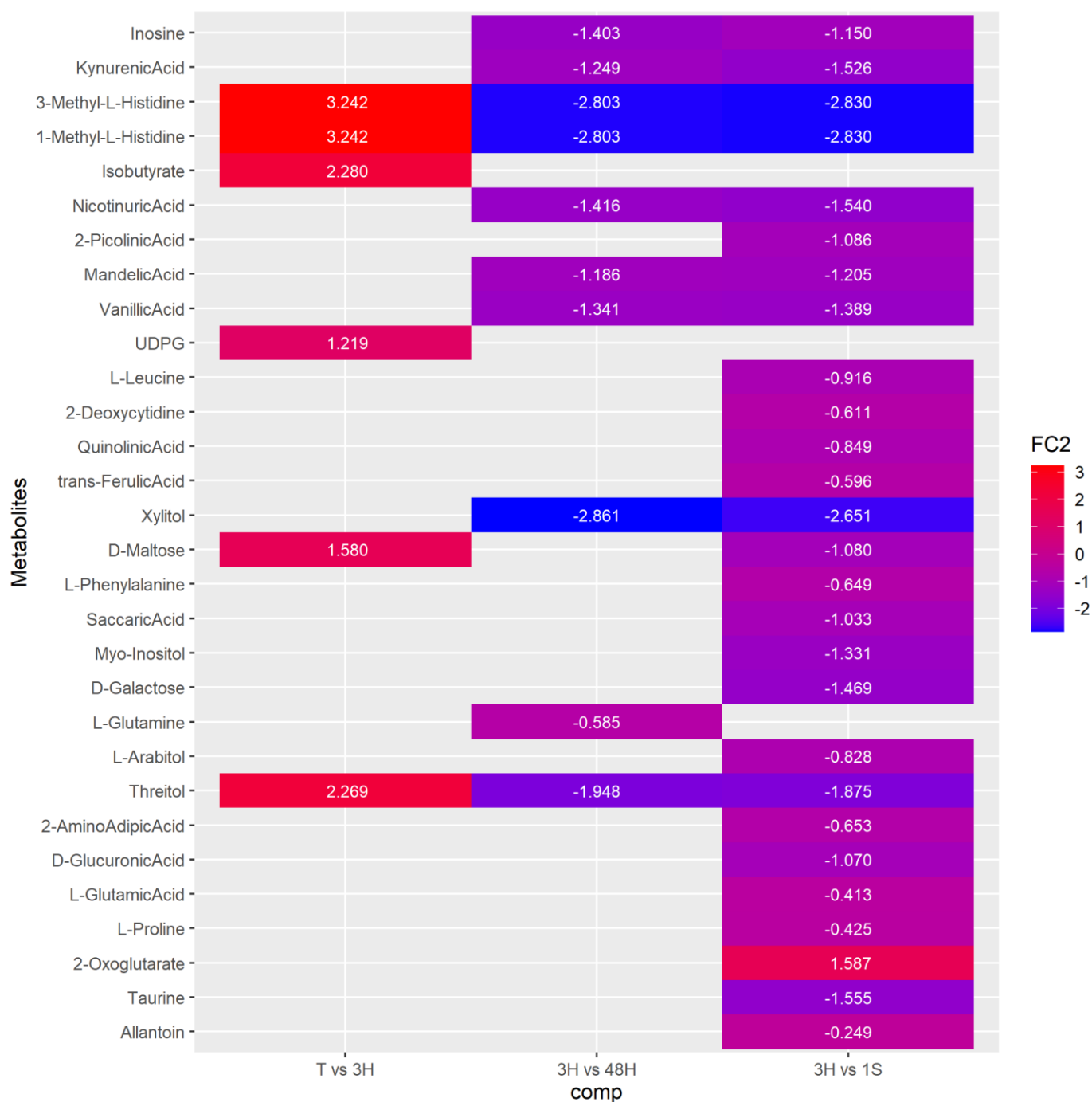
Annexe 10 : *Heatmap* représentant les métabolites significativement dérégulés dans les striata ipsilatéraux des rats en fonction des comparaisons temporelles inter-groupes. Le *fold-change* est inscrit dans les tuiles dont la couleur correspond au sens de variation (variation négative en bleu ; variation positive en rouge). T correspond au groupe contrôle ; 3H correspond au groupe 3 h après la sonoporation ; 48H correspond au groupe 48 h après la sonoporation ; 1S correspond au groupe 1 semaine après la sonoporation.



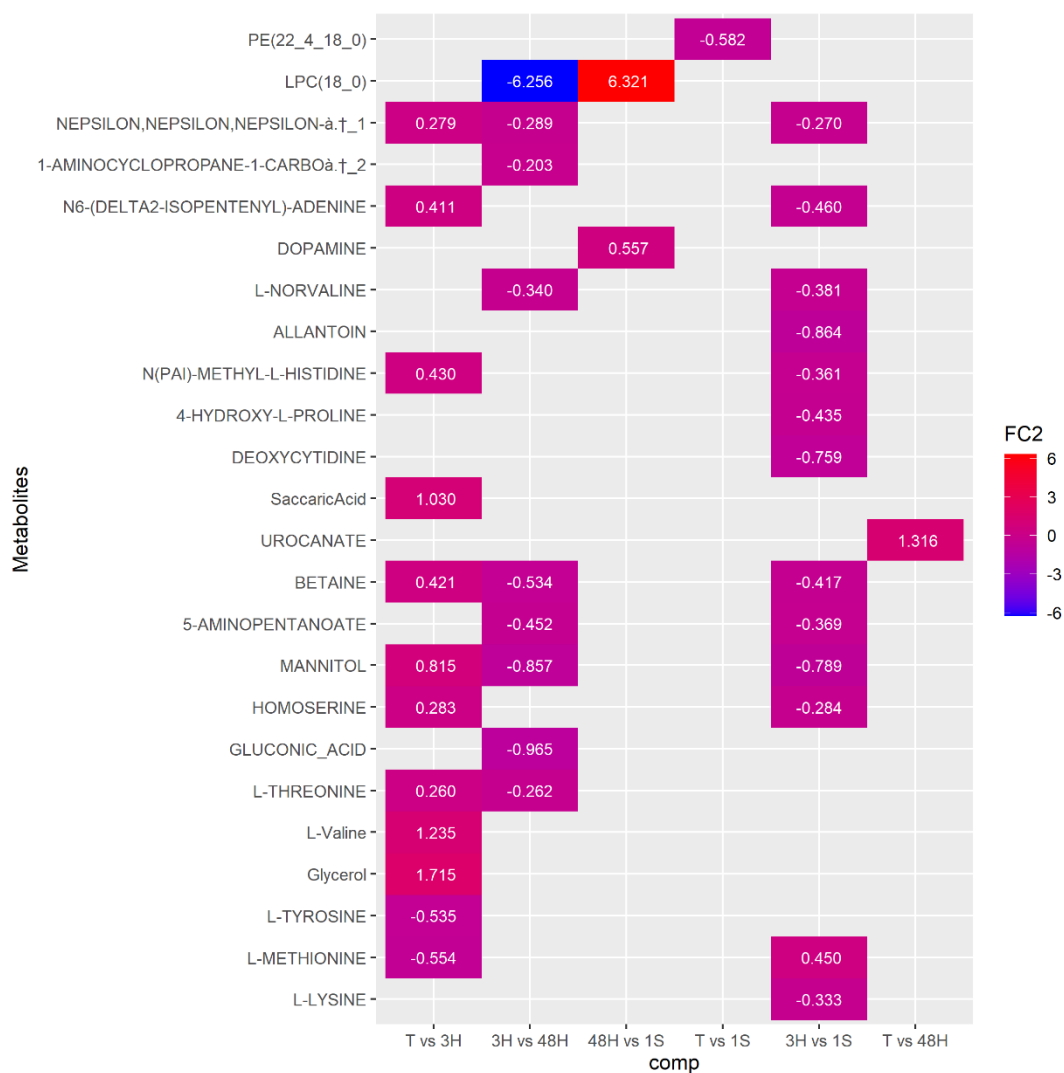
Annexe II : *Heatmap* représentant les métabolites significativement dérégulés dans le liquide cébrospinal des rats en fonction des comparaisons temporelles inter-groupes. Le *fold-change* est inscrit dans les tuiles dont la couleur correspond au sens de variation (variation négative en bleu ; variation positive en rouge). T correspond au groupe contrôle ; 3H correspond au groupe 3 h après la sonoporation ; 48H correspond au groupe 48 h après la sonoporation ; 1S correspond au groupe 1 semaine après la sonoporation.



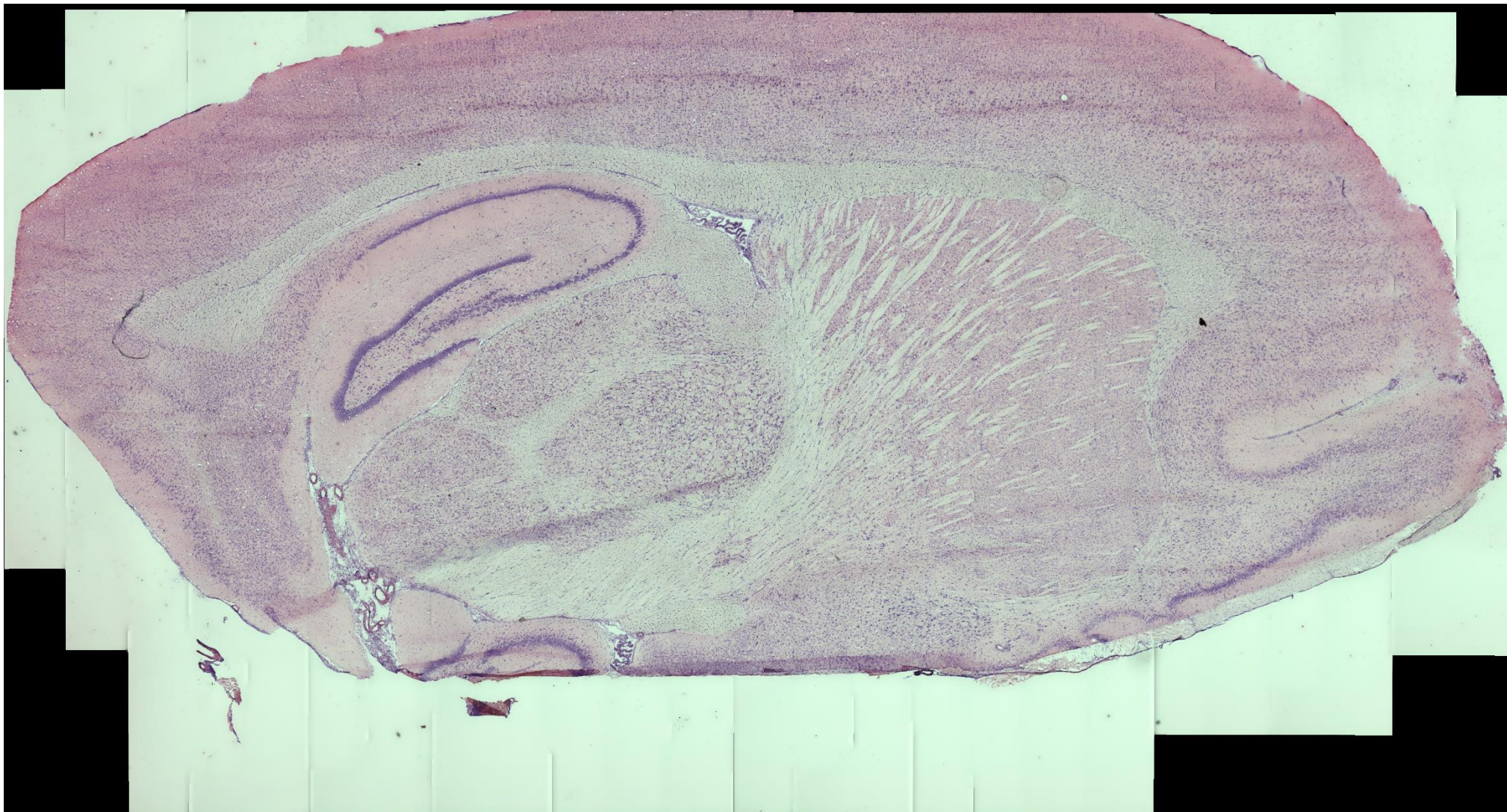
Annexe 12 : Heatmap représentant les métabolites significativement dérégulés dans le sérum sanguin des rats en fonction des comparaisons temporelles inter-groupes. Le *fold-change* est inscrit dans les tuiles dont la couleur correspond au sens de variation (variation négative en bleu ; variation positive en rouge). T correspond au groupe contrôle ; 3H correspond au groupe 3 h après la sonoporation ; 48H correspond au groupe 48 h après la sonoporation ; 1S correspond au groupe 1 semaine après la sonoporation.



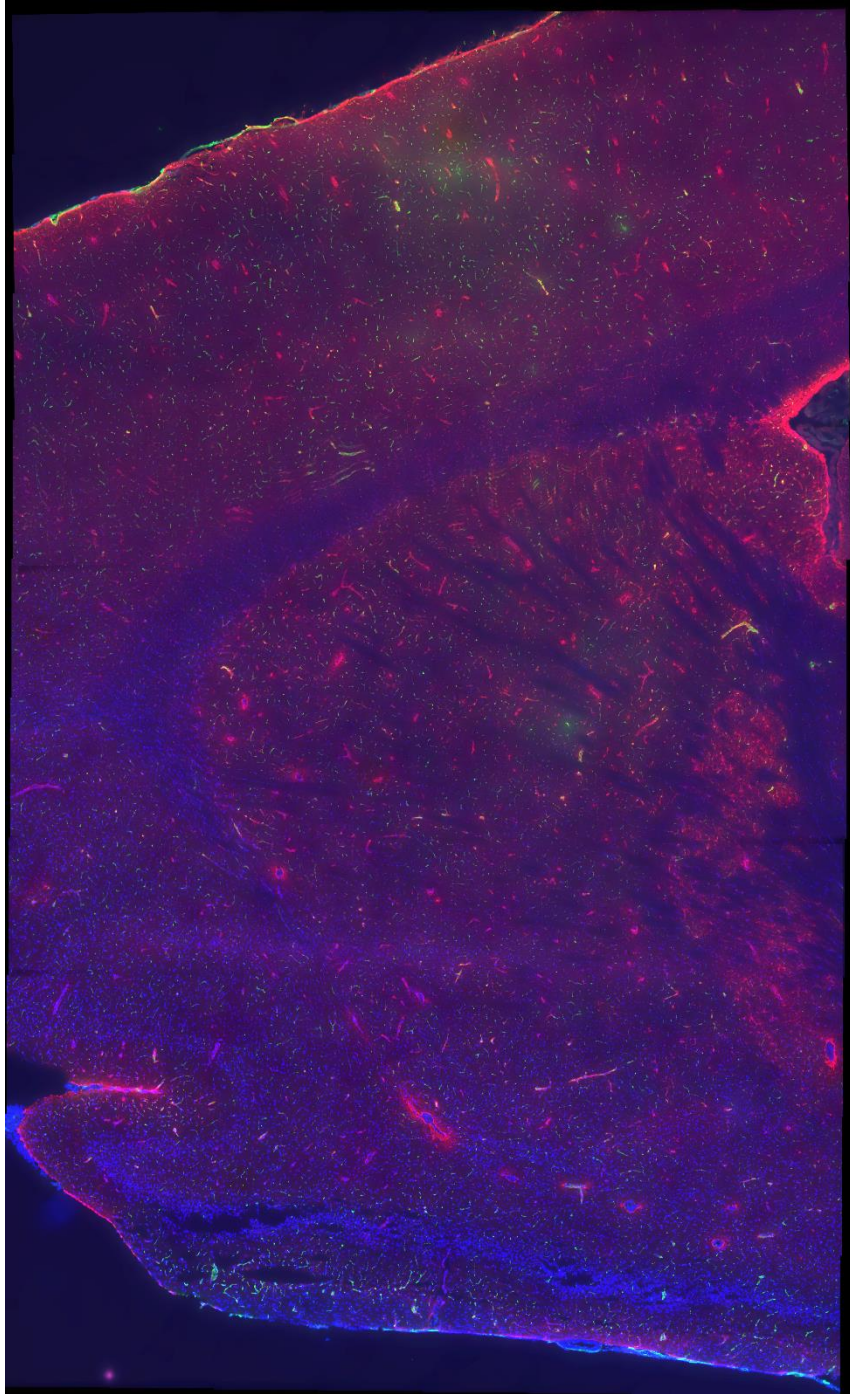
Annexe 13: *Heatmap* représentant les métabolites significativement dérégulés dans les urines des rats en fonction des comparaisons temporelles inter-groupes. Le *fold-change* est inscrit dans les tuiles dont la couleur correspond au sens de variation (variation négative en bleu ; variation positive en rouge). T correspond au groupe contrôle ; 3H correspond au groupe 3 h après la sonoporation ; 48H correspond au groupe 48 h après la sonoporation ; 1S correspond au groupe 1 semaine après la sonoporation.



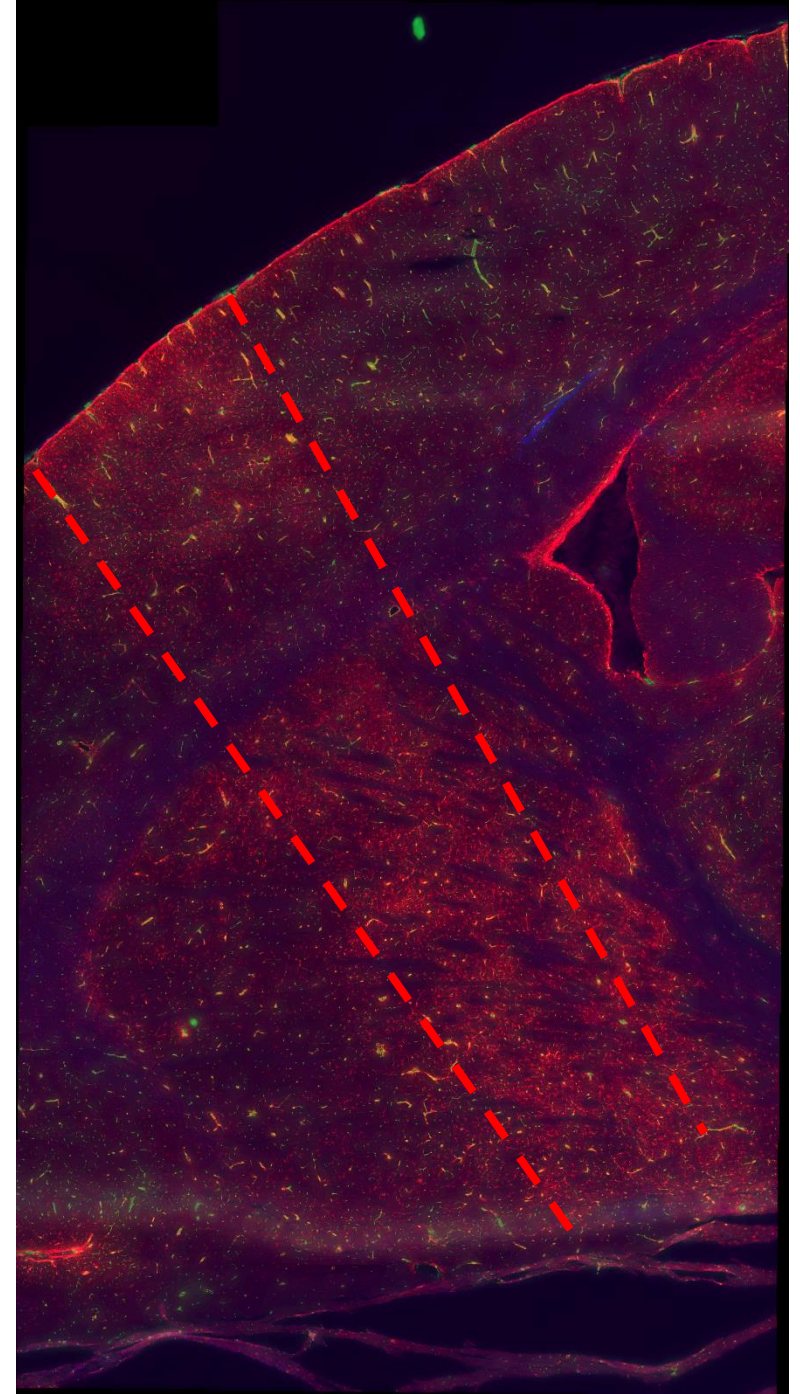
Annexe 14 : *Heatmap* représentant les métabolites significativement dérégulés dans les striata controlatéraux des rats en fonction des comparaisons temporelles inter-groupes. Le *fold-change* est inscrit dans les tuiles dont la couleur correspond au sens de variation (variation négative en bleu ; variation positive en rouge). T correspond au groupe contrôle ; 3H correspond au groupe 3 h après la sonoporation ; 48H correspond au groupe 48 h après la sonoporation ; 1S correspond au groupe 1 semaine après la sonoporation.



Annexe 15 : Observation microscopique d'une coupe sagittale controlatérale d'un cerveau de rat 48 h après la sonoporation obtenue *via* la reconstruction par mosaïque. Le tissu a été coloré par coloration de Nissl et éosine.



Annexe 16 : Observation microscopique de coupes sagittales de cerveaux 3 h après la sonoporation (à gauche) ; et 1 semaine après la sonoporation (à droite). Les coupes ont été traitées par immunomarquages dirigés contre la GFAP (en rouge), et la protéine SMI71 (en vert), mettant respectivement en évidence les astrocytes et les vaisseaux sanguins. Les traits en pointillé représentent le trajet du faisceau acoustique.



Supplementary Material

Table S1: Metabolites showing significantly different intensities by group-to-group univariate comparisons found in striatum 3hrs, 2 days, and 1 week after acoustically-mediated BBB opening. * < 0.05, ** < 0.01 and *** 0.001.

Metabolites	Groups		Adjusted p-value	Signif.	Log2(FC)
2-Deoxyguanosine	Control	1 week	0.012	*	1.56
2-Propanol	Control	1 week	0.033	*	2.51
3-Methylhistamine	Control	2 days	0.028	*	-0.76
4-Ethylphenol	Control	1 week	0.030	*	1.35
4-Hydroxy-L-Proline	3hrs	2 days	0.025	*	-0.66
	3hrs	1 week	0.020	*	-0.70
5-Aminolevulinic Acid	Control	3hrs	0.018	*	0.52
	3hrs	1 week	0.044	*	-0.48
5-Hydroxyindoleacetate	3hrs	2 days	0.005	**	0.46
5-Methylcytosine Hydrochloride	3hrs	2 days	0.000	***	-0.97
	3hrs	1 week	0.006	**	-0.72
Acetic Acid	Control	1 week	0.042	*	1.83
Allantoin	3hrs	1 week	0.027	*	-1.20
Alpha-Hydroxyisobutyric Acid	Control	2 days	0.046	*	1.33
	Control	1 week	0.004	**	1.40
Azelaic Acid	Control	1 week	0.007	**	2.06
Beta-Hydroxyisovaleric Acid	Control	1 week	0.023	*	1.51
Betaine	Control	3hrs	0.032	*	0.73
	3hrs	2 days	0.036	*	-0.77
C5-Carnitine	Control	3hrs	0.019	*	0.71
	3hrs	2 days	0.024	*	-0.65
D-Fucose	Control	1 week	0.038	*	1.50

Ethyl-3-Indoleacetate	Control	3hrs	0.019	*	0.66
Ethylmalonic Acid	Control	1 week	0.011	*	1.83
Gluconic Acid	3hrs	2 days	0.022	*	-0.88
Glycogen	Control	1 week	0.021	*	1.17
Glycolaldehyde Dimer	3hrs	1 week	0.044	*	-0.23
GTP	Control	1 week	0.007	**	1.23
Guanidinoacetic Acid	Control	1 week	0.021	*	1.16
Hippuric Acid	Control	1 week	0.008	**	1.74
Isocitric Acid	Control	1 week	0.016	*	1.26
L-Alanine	Control	1 week	0.014	*	1.43
L-Cysteine	Control	1 week	0.038	*	0.83
L-Glutamic Acid	Control	1 week	0.009	**	1.20
L-Glutamine	Control	1 week	0.011	*	1.05
L-Glutathione-Oxidized	Control	1 week	0.007	**	1.11
L-Glycine	Control	1 week	0.038	*	1.45
L-Isoleucine	Control	1 week	0.020	*	1.63
L-Lysine	Control	3hrs	0.009	**	0.41
L-Methionine	Control	3hrs	0.017	*	-0.39
	3hrs	2 days	0.013	*	0.49
L-Ornithine	Control	1 week	0.011	*	1.53
L-Phenylalanine	Control	2 days	0.046	*	0.29
L-Tryptophan	3hrs	2 days	0.011	*	0.21
	2 days	1 week	0.019	*	-0.18
L-Tyrosine	3hrs	2 days	0.005	**	0.39
	3hrs	1 week	0.020	*	0.36
L-Valine	Control	1 week	0.017	*	1.48
Levogluconan	Control	1 week	0.031	*	1.17
Lysophosphatidylcholine (20-4)	3hrs	1 week	0.023	*	0.44

Mannitol	3hrs	2 days	0.016	*	-0.86
N-Acetyl-L-Aspartic Acid	Control	1 week	0.010	*	1.15
N-Acetyl-L-Methionine	3hrs	2 days	0.012	*	0.54
N-Acetylglycine	Control	1 week	0.014	*	1.21
N-Methyl-L-Histidine	Control	3hrs	0.008	**	0.46
NADP	Control	1 week	0.010	*	1.24
Trimethyl-L-Lysine	Control	3hrs	0.019	*	0.28
Nicotinuric Acid	Control	1 week	0.003	**	1.73
Phosphocholine (O-12-0-2-0)	3hrs	2 days	0.012	*	0.98
Phosphocholine (O-18-4-2-0)	3hrs	1 week	0.016	*	0.63
Pyroglutamic Acid	Control	1 week	0.038	*	1.52
Saccaric Acid	Control	1 week	0.010	*	1.14
Sebacic Acid	Control	1 week	0.011	*	1.51
Threonic Acid	Control	1 week	0.023	*	1.15
TMAO	Control	1 week	0.007	**	1.40

Table S2: metabolites showing significantly different intensities by group-to-group univariate comparisons found in CSF 3hrs, 2 days, and 1 week after acoustically-mediated BBB opening. * < 0.05, ** < 0.01 and *** 0.001.

Metabolites	Groups		Adjusted p-value	Signif.	Log2(FC)
1-Oleoyl-Rac-Glycerol	2 days	1 week	0.026	*	-0.17
2-Hydroxypyridine	Control	3hrs	0.029	*	1.57
	3hrs	1 week	0.044	*	-1.43
3-(4-Hydroxyphenyl)Lactate	Control	1 week	0.045	*	-1.56
3-Amino-4-Hydroxybenzoic Acid	Control	3hrs	0.018	*	1.46
	3hrs	2 days	0.007	**	-1.54
3-Dehydroshikimate	Control	3hrs	0.005	**	0.73
	Control	1 week	0.022	*	0.58
3-Hydroxybutanoic Acid	Control	3hrs	0.001	***	0.94
	3hrs	1 week	0.009	**	-0.85
5-Methylcytosine Hydrochloride	Control	3hrs	0.000	***	1.29
	3hrs	2 days	0.013	*	-1.22
Alpha-Glucose	Control	1 week	0.006	**	-0.80
	3hrs	1 week	0.011	*	-0.75
Citrulline	Control	3hrs	0.007	**	-2.55
Creatine	Control	3hrs	0.012	*	-0.70
Creatinine	Control	3hrs	0.048	*	0.38
	3hrs	2 days	0.026	*	-0.44
	3hrs	1 week	0.021	*	-0.45
Cytidine	3hrs	1 week	0.034	*	-0.76
Cytosine	Control	3hrs	0.039	*	0.56
	3hrs	1 week	0.019	*	-0.45
Deoxycytidine	Control	3hrs	0.025	*	0.56
	3hrs	1 week	0.038	*	-0.40
Galactitol	Control	3hrs	0.002	**	1.08

	3hrs	2 days	0.028	*	-0.93
	3hrs	1 week	0.008	**	-0.99
Galactosamine	3hrs	1 week	0.003	**	-0.64
Gluconic Acid	3hrs	2 days	0.011	*	-0.50
	3hrs	1 week	0.001	**	-0.59
Glucuronic Acid	3hrs	2 days	0.007	**	-1.46
	3hrs	1 week	0.026	*	-1.07
Isocitric Acid	Control	3hrs	0.019	*	0.91
	3hrs	1 week	0.031	*	-0.79
L-Alanine	Control	3hrs	0.034	*	-1.22
L-Allothreonine	Control	2 days	0.030	*	-1.63
L-Arginine	Control	3hrs	0.004	**	-2.34
L-Asparagine	Control	3hrs	0.013	*	-3.20
L-Glutamine	Control	3hrs	0.013	*	-2.38
	Control	2 days	0.040	*	-2.01
L-Histidine	Control	3hrs	0.029	*	-0.99
	3hrs	2 days	0.026	*	0.76
L-Serine	Control	3hrs	0.022	*	-1.92
L-Threonine	Control	2 days	0.030	*	-1.63
Lactate	3hrs	1 week	0.017	*	0.44
Mannitol	3hrs	2 days	0.002	**	-1.03
	3hrs	1 week	0.003	**	-1.03
N-Acetyl-L-Alanine	3hrs	1 week	0.019	*	-0.45
N-Acetyl-L-Leucine	3hrs	1 week	0.005	**	-0.46
N-Acetylglycine	Control	3hrs	0.020	*	0.35
N-Acetylputrescine	3hrs	1 week	0.021	*	-0.66
N-Methyltryptamine	Control	3hrs	0.004	**	-2.36
N-Methyl-L-Histidine	3hrs	1 week	0.006	**	-0.85

Trimethyl-L-Lysine	3hrs	1 week	0.006	**	-0.31
Nicotinamide	Control	3hrs	0.028	*	1.53
	3hrs	2 days	0.028	*	-1.54
	3hrs	1 week	0.023	*	-1.49
Pantothenic Acid	3hrs	2 days	0.004	**	0.59
Rac-Glycerol-1-Myristate	Control	1 week	0.020	*	-0.16
	3hrs	1 week	0.046	*	-0.15
	2 days	1 week	0.046	*	-0.17
Suberic Acid	Control	1 week	0.045	*	-1.66
Thymidine	Control	3hrs	0.008	**	0.53
	3hrs	1 week	0.019	*	-0.52
Thymine	Control	3hrs	0.007	**	0.93
Uracil	Control	3hrs	0.012	*	0.42
	3hrs	1 week	0.004	**	-0.49
Uridine	Control	3hrs	0.003	**	0.47
	3hrs	2 days	0.031	*	-0.37
	3hrs	1 week	0.005	**	-0.45
Xanthine	Control	3hrs	0.005	**	0.89

Table S3: metabolites showing significantly different intensities by group-to-group univariate comparisons found in serum 3hrs, 2 days, and 1 week after acoustically-mediated BBB opening. * < 0.05, ** < 0.01 and *** 0.001.

Metabolites	Groups		Adjusted p-value	Signif.	Log2(FC)
1-Oleoyl-Rac-Glycerol	Control	1 week	0.047	*	-0.29
	3hrs	1 week	0.013	*	-0.32
3-Amino-4-Hydroxybenzoic Acid	3hrs	2 days	0.008	**	-1.35
3-Hydroxybutanoic Acid	Control	3hrs	0.008	**	1.45
	3hrs	1 week	0.000	***	-1.74
3-Methyladipic Acid	Control	3hrs	0.007	**	0.74
	3hrs	2 days	0.036	*	-0.57
	3hrs	1 week	0.001	***	-1.11
3-Ureidopropionate	Control	3hrs	0.008	**	-1.48
	3hrs	2 days	0.015	*	1.35
	3hrs	1 week	0.018	*	1.33
3,4-Dihydroxy-L-Phenylalanine	3hrs	1 week	0.015	*	-4.39
4-Acetamidobutanoate	3hrs	2 days	0.033	*	-2.20
4-Coumarate	Control	3hrs	0.030	*	1.70
4-Ethylphenol	3hrs	1 week	0.025	*	-0.33
4-Methyl-2-Oxo-Pentanoic Acid	Control	3hrs	0.002	**	1.71
	Control	2 days	0.041	*	1.29
	3hrs	1 week	0.012	*	-1.24
4-Methyl-2-Oxovaleric Acid	Control	3hrs	0.005	**	1.75
	Control	2 days	0.050	*	1.41
	3hrs	1 week	0.021	*	-1.27
5'-Methylthioadenosine	3hrs	2 days	0.042	*	-0.56
	3hrs	1 week	0.004	**	-0.68
5-Hydroxylysine	3hrs	1 week	0.022	*	0.55
5-Oxo-L-Proline	3hrs	2 days	0.011	*	1.11

	3hrs	1 week	0.025	*	0.95
Adenine	Control	3hrs	0.043	*	0.69
Adenosine	3hrs	2 days	0.045	*	-0.40
	3hrs	1 week	0.036	*	-0.42
	Control	3hrs	0.046	*	-3.29
Alpha-Glucose-1-Phosphate	3hrs	2 days	0.003	**	-1.40
	3hrs	1 week	0.037	*	-0.88
Betaine	Control	3hrs	0.005	*	-0.43
	3hrs	1 week	0.023	***	0.56
Bilirubin	3hrs	1 week	0.013	**	-1.69
Citramalate	Control	3hrs	0.017	**	0.65
	3hrs	1 week	0.000	**	-0.66
Cytidine	3hrs	2 days	0.008	***	-0.80
	3hrs	1 week	0.008	*	-0.63
Deoxycholate	3hrs	1 week	0.008	*	-1.58
Ethanolamine Phosphate	3hrs	2 days	0.001	*	-0.57
Formyl-L-Methionyl Peptide	Control	3hrs	0.016	**	0.90
	3hrs	1 week	0.025	**	-0.93
Gluconic Acid	Control	2 days	0.047	**	-1.07
	3hrs	2 days	0.002	*	-0.94
Glucuronic Acid	Control	2 days	0.001	*	-1.41
	3hrs	2 days	0.006	****	-0.29
	3hrs	1 week	0.017	**	-0.32
Glycerate	Control	3hrs	0.023	*	-1.35
Glycine	3hrs	1 week	0.000	*	1.45
Glycocholate	3hrs	1 week	0.006	**	-1.74
Guanidinoacetate	3hrs	2 days	0.021	*	0.74
Indole-3-Acetaldehyde	Control	1 week	0.028	*	-0.57

Inosine	Control	3hrs	0.010	*	-1.11
Isocitric Acid	Control	3hrs	0.028	**	-1.48
	3hrs	2 days	0.037	**	1.35
	3hrs	1 week	0.018	***	1.33
L-Alanine	3hrs	1 week	0.005	*	-4.39
	3hrs	2 days	0.005	*	-2.20
L-Arginine	3hrs	2 days	0.000	**	1.70
	3hrs	1 week	0.015	**	-0.33
L-Asparagine	Control	3hrs	0.011	*	1.71
	3hrs	2 days	0.008	*	1.29
	3hrs	1 week	0.006	*	-1.24
L-Aspartate	3hrs	1 week	0.013	*	1.75
L-Carnitine	3hrs	1 week	0.040	**	1.41
L-Glutamic Acid	Control	3hrs	0.014	**	-1.27
	3hrs	1 week	0.031	*	-0.56
	Control	3hrs	0.006	*	-0.68
	3hrs	2 days	0.004	*	0.55
	3hrs	1 week	0.015	*	1.11
L-Glutamine	Control	3hrs	0.016	*	0.95
	3hrs	1 week	0.016	*	0.69
	Control	3hrs	0.035	*	-0.40
L-Isoleucine	2 days	1 week	0.047	*	-0.42
L-Methionine	3hrs	2 days	0.005	**	-0.32
L-Pipecolic Acid	2 days	1 week	0.016	*	0.85
L-Proline	3hrs	1 week	0.001	**	0.78
	3hrs	2 days	0.004	***	-0.43
	3hrs	1 week	0.023	*	0.56
L-Serine	3hrs	1 week	0.009	**	-1.69

	3hrs	1 week	0.000	*	0.65
L-Threonine	3hrs	1 week	0.022	*	-0.66
L-Valine	Control	3hrs	0.009	*	-0.80
	3hrs	1 week	0.011	***	-0.63
Lactate	3hrs	1 week	0.035	*	-1.58
Leucine	2 days	1 week	0.011	*	-0.57
Linoleate	Control	3hrs	0.000	**	0.90
	3hrs	1 week	0.010	**	-0.93
Lyxose	Control	2 days	0.022	*	-1.07
	3hrs	2 days	0.003	*	-0.94
Melatonin	Control	3hrs	0.009	**	-1.41
N-Acetyl-L-Alanine	Control	3hrs	0.014	*	-0.29
	3hrs	1 week	0.038	**	-0.32
N-Acetyl-L-Glutamic Acid	Control	3hrs	0.007	*	-1.35
	3hrs	1 week	0.015	*	1.45
N-Acetyl-L-Leucine	Control	3hrs	0.001	**	-1.74
	3hrs	1 week	0.034	***	0.74
N-Acetyl-L-Methionine	Control	3hrs	0.024	*	-0.57
N-Acetyl-L-Phenylalanine	Control	3hrs	0.001	**	-1.11
	3hrs	1 week	0.000	**	-1.48
N-Acetyl-L-Serine	Control	3hrs	0.044	**	1.35
	3hrs	1 week	0.002	*	1.33
N-Acetyl-Tryptophan	3hrs	2 days	0.003	**	-4.39
	3hrs	1 week	0.003	**	-2.20
N-Acetylneuraminate	Control	3hrs	0.017	*	1.70
	3hrs	2 days	0.007	**	-0.33
	3hrs	1 week	0.006	**	1.71
N-Methyltryptamine	3hrs	2 days	0.049	**	1.29

N-Methyl-L-Histidine	Control	3hrs	0.003	*	-1.24
	3hrs	2 days	0.005	**	1.75
	3hrs	1 week	0.003	**	1.41
N-Isopentenyladenine	3hrs	1 week	0.029	*	-1.27
Trimethyl-L-Lysine	3hrs	1 week	0.004	*	-0.56
Nicotinamide	Control	3hrs	0.007	**	-0.68
	3hrs	2 days	0.025	***	0.55
	3hrs	1 week	0.017	**	1.11
Palmitate	Control	3hrs	0.006	*	0.95
	3hrs	1 week	0.001	*	0.69
Phosphocholine	3hrs	1 week	0.004	**	-0.40
Putrescine	3hrs	2 days	0.015	*	-0.42
	3hrs	1 week	0.014	***	-3.29
Pyridoxamine	Control	3hrs	0.004	*	-1.40
Retinoate	Control	3hrs	0.028	**	-0.88
	3hrs	1 week	0.001	**	-0.32
Sarcosine	3hrs	1 week	0.035	*	0.85
Shikimate	Control	3hrs	0.002	*	0.78
	3hrs	2 days	0.001	*	-0.43
Spermidine	Control	3hrs	0.037	*	0.56
	3hrs	1 week	0.046	**	-1.69
Thymidine	Control	3hrs	0.011	*	0.65
	3hrs	1 week	0.034	*	-0.66
Urate	3hrs	2 days	0.001	*	-0.80
	3hrs	1 week	0.038	*	-0.63
Urocanic Acid	Control	3hrs	0.045	*	-1.58

Table S4: metabolites showing significantly different intensities by group-to-group univariate comparisons found in urine 3hrs, 2 days, and 1 week after acoustically-mediated BBB opening. * < 0.05 and ** < 0.01.

Metabolites	Groups		Adjusted p-value	Signif.	Log2(FC)
1-Methyl-L-Histidine	Control	3hrs	0.043	*	3.24
	3hrs	2 days	0.048	*	-2.80
	3hrs	1 week	0.016	*	-2.83
2-AminoAdipic Acid	3hrs	1 week	0.018	*	-0.65
2-Deoxycytidine	3hrs	1 week	0.005	**	-0.61
2-Oxoglutarate	3hrs	1 week	0.027	*	1.59
2-Picolinic Acid	3hrs	1 week	0.025	*	-1.09
Allantoin	3hrs	1 week	0.012	*	-0.25
D-Galactose	3hrs	2 days	0.022	*	-1.45
	3hrs	1 week	0.037	*	-1.47
D-Glucuronic Acid	3hrs	1 week	0.026	*	-1.07
D-Maltose	Control	3hrs	0.046	*	1.58
	3hrs	1 week	0.041	*	-1.08
Inosine	3hrs	2 days	0.003	**	-1.40
	3hrs	1 week	0.010	*	-1.15
Isobutyrate	Control	3hrs	0.039	*	2.28
Kynurenic Acid	3hrs	2 days	0.025	*	-1.25
	3hrs	1 week	0.005	**	-1.53
L-Arabitol	3hrs	1 week	0.019	*	-0.83
L-Glutamic Acid	3hrs	1 week	0.049	*	-0.41
L-Glutamine	3hrs	2 days	0.024	*	-0.58
L-Leucine	3hrs	1 week	0.019	*	-0.92
L-Phenylalanine	3hrs	1 week	0.004	**	-0.65
L-Proline	3hrs	1 week	0.044	*	-0.43
Mandelic Acid	3hrs	2 days	0.030	*	-1.19

	3hrs	1 week	0.009	**	-1.21
Myo-Inositol	3hrs	1 week	0.008	**	-1.33
Nicotinuric Acid	3hrs	2 days	0.010	**	-1.42
	3hrs	1 week	0.015	*	-1.54
Quinolinic Acid	3hrs	1 week	0.011	*	-0.85
Saccaric Acid	3hrs	1 week	0.005	**	-1.03
Taurine	3hrs	1 week	0.025	*	-1.56
Threitol	Control	3hrs	0.003	**	2.27
	3hrs	2 days	0.031	*	-1.95
	3hrs	1 week	0.011	*	-1.88
trans-Ferulic Acid	3hrs	1 week	0.012	*	-0.60
UDPG	Control	3hrs	0.022	*	1.22
Vanillic Acid	3hrs	2 days	0.048	*	-1.34
	3hrs	1 week	0.005	**	-1.39
Xylitol	3hrs	2 days	0.044	*	-2.86
	3hrs	1 week	0.009	**	-2.65

Table S5: Details of intersection between matrices of upset diagram (Figure 2).

Intersection	Size	Metabolites
Striatum – CSF – Serum – Urine	60	L-Glutamic Acid; L-Alanine; Succinate; L-Lysine; L-Aspartate; L-Arginine; L-Glutamine; L-Methionine; L-Ornithine; L-Tryptophane; L-Phenylalanine; L-Tyrosine; Beta-Alanine; Uracil; Glycerol; Fumaric Acid; L-Histidine; Myo-Inositol; L-Proline; L-Asparagine; Glycogen; L-Valine; L-Threonine; D-Glucuronic Acid; Adenosine; Taurine; D-Gluconic Acid; Glyceric Acid; Inosine; Uridine; Isocitric Acid; Spermidine; L-Citrulline; L-Isoleucine; 5-AminoValericAcid; L-Cystine; Trimethylamine; Phosphocholine; Betaine; Creatinine; Saccaric Acid; Pantothenic Acid; 2-Deoxycytidine; Trigonelline; N-Acetyl-L-Aspartic Acid; 3-Hydroxybutyrate; TMAO; 3-Methyl-L-Histidine; L-Anserine; trans-Ferulic Acid; Allantoin; Hippuric Acid; Pyroglutamic Acid; Methylmalonic Acid; Methylguanidine; 3-Hydroxyphenyl Acetic Acid; 3-Phenyl Propionic Acid; alpha-Hydroxyisobutyric Acid; Adipic Acid; Azelaic Acid
Striatum – CSF – Serum	64	Acetic Acid; L-Serine; Adenine; Malate; Nicotinamide; 5'-Methylthioadenosine; Thymine; Thymidine; Guanine; Riboflavin; Lactate; Homoserine; Glycolaldehyde Dimer; Alpha-Glucose; N-Acetylneuraminic acid; Creatine; L-Carnitine; Glucosamine-6-Phosphate; Urate; Cytosine; Guanosine; Histamine; L-Pipecolic Acid; Trans-Cinnamate; 5,6-Dihydrouracil; Cytidine; Guanidinoacetic Acid; 2-Deoxy-Glucose; Glycerophosphocholine; Oleate; Serotonin; Urocanate; Citramalate; Indole-3-Acetic Acid; D-Fucose; 4-Guanidinobutanoate; 3-(4-Hydroxyphenyl)Pyruvate; Lumichrome; L-Norvaline; 3-Ureidopropionate; N-Acetyl-L-Methionine; N-Acetylputrescine; 10-Hydroxydecanoate; N-Acetyl-L-Phenylalanine; 3-(4-Hydroxyphenyl)Lactate; Tri-methyl-lysine; N ⁶ -(Delta ² -Isopentenyl)-Adenine; Reichsteins Substance S; Deoxycarnitine; 4-Hydroxy-3-Methoxyphenylglycol; N-Acetylglycine; 5-Hydroxyindoleacetate; 3-Methyl-2-Oxindole; N-Methyltryptamine; Gamma-Linolenic Acid; Diethanolamine; Suberic Acid; Methyl Jasmonate; Nalpha-Acetyl-L-Lysine; Heptanoic Acid; N-Acetyl-L-Serine; Levoglucosan; Beta-Hydroxyisovaleric Acid; 1-Oleoyl-Rac-Glycerol
Striatum – CSF – Urine	1	Sebacic Acid
Striatum – Serum – Urine	6	L-Glycine; GABA; L-Carnosine; 2-AminoAdipicAcid; 2-Propanol; 4-EthylPhenol
CSF - Serum – Urine	15	Pyruvic-Acid; Formate; L-Leucine; 2-Oxoisovalerate; Citrate; D-Maltose; Sarcosine; Glutaric Acid; 2-Deoxyadenosine; trans-4-Hydroxy-L-Proline; Galactitol; Trans-Acotinic Acid; O-Acetyl-L-Carnitine; Homovanillic Acid; Threitol
Striatum – CSF	17	L-Glutathione-oxidized; Hypoxanthine; Xanthine; Mannitol; Tyramine; N-Acetyl-Mannosamine; Pterin; Cortisol; Spermine; Trans-Cinnamaldehyde;

		5-Methylcytosine Hydrochloride; Alpha-Tocopherol; 2-Hydroxypyridine; Glucuronolactone; L-Allothreonine; Galacturonic Acid; N-Acetyl glycine
Striatum – Serum	21	Amp; Putrescine; Palmitate; 2-Deoxyguanosine; Ethanolamine Phosphate; Levulinic acid; Shikimate; Ll-2,6-Diaminoheptanedioate; Retinoate; 4-Hydroxy-L-Proline; 3-(2-Hydroxyphenyl)Propanoate; 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylat; Xanthosine; Cholesteryl Acetate; N-Acetyl-Tryptophan; Glycolic Acid; Dopamine; 3-Methoxy-4-Hydroxymandelate; Glyceraldehyde-3-Phosphate Diethyl acetal; Ethylmalonic Acid; Choline chloride
Striatum – Urine	3	Nicotinic Acid; Threonic Acid; Nicotinuric Acid
CSF – Serum	35	D-Glucose; Choline; D-Mannose; Ethanolamine; Acetone; 4-Methyl-2-Oxo-Pentanoic Acid; L-Kynurenine; 3,4-Dihydroxy-L-Phenylalanine; Thiamine; Malonate; Pyridoxamine; N-Acetyl-L-Glutamic Acid; Epinephrine; Salicylate; 4-Coumarate; D-Glucose-6-Phosphate; Caffeate; Melatonin; Corticosterone; Leukotriene B4; 1-Methyladenosine; N-Acetyl-L-Leucine; Formyl-L-Methionyl Peptide; Malic Acid; N,N-Dimethyl-1,4-Phenylenediamine; N-Acetyl-L-Alanine; Indoxylsulfate; Caprylic Acid; Theophylline; 3-Amino-4-Hydroxybenzoic Acid; Paraxanthine; 2-Methylglutaric Acid; 3-Methylglutaric Acid; Methyl-Indole-3-Acetate; 2-Acetamido-2-Deoxy-Beta-Glucosyl
CSF – Urine	4	Lactose; Dihydrothymine; 1-Methylhydantoin; Dimethylsulfone
Serum – Urine	21	UDPG; L-Glutathione-reduced; 2-Oxobutyrate; Acetoacetate; Methylamine; Xylitol; Hypotaaurine; 4-HydroxyphenylAceticAcid; Valerate; D-Galactose; 1,3-Diaminopropane; Dimethylglycine; Kynurenic Acid; Mandelic Acid; 2-Aminobutyric Acid; Isobutyrate; Argininosuccinic Acid; Phenethylamine; Vanillic Acid; Isovaleric Acid; Syringic Acid

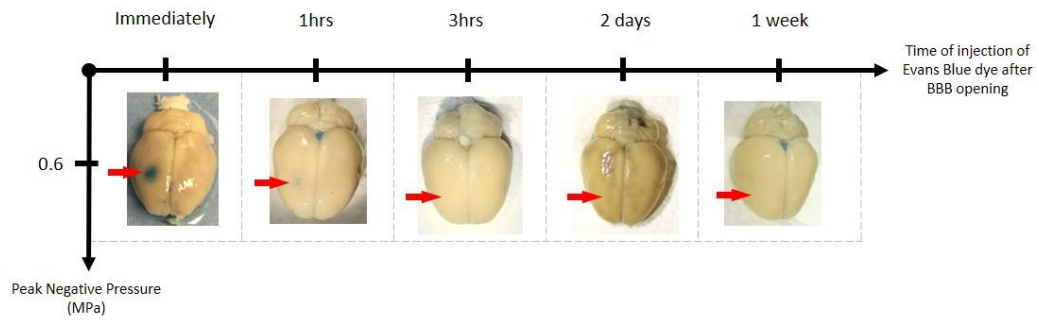


Figure S1: Assessment of acoustically-mediated blood-brain barrier opening (BBBO). To evaluate the kinetics of BBB closing, an intravenous bolus of Evans blue (EB; 5mL/kg at 2% w/v) dye was injected immediately, at 1 hrs, 3 hrs, 2 days, and 1 week after the application of microbubble-assisted ultrasound. The rats were intracardially perfused with saline and brains were dissected.

Partie VI

Références bibliographiques



Références bibliographiques

A

- Abbott, N.J., 2002. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat* 200, 629–638. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2002.00064.x>
- Abbott, N.J., Patabendige, A.A., Dolman, D.E., Yusof, S.R., Begley, D.J., 2010. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* 37, 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030>
- Abe, J., Berk, B.C., 2014. Novel mechanisms of endothelial mechanotransduction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 34, 2378–2386. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303428>
- Abraham, A., Meng, Y., Llinas, M., Huang, Y., Hamani, C., Mainprize, T., Aubert, I., Heyn, C., Black, S.E., Hynynen, K., Lipsman, N., Zinman, L., 2019. First-in-human trial of blood–brain barrier opening in amyotrophic lateral sclerosis using MR-guided focused ultrasound. *Nat Commun* 10, 4373. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12426-9>
- Adams, D.L., Piserchia, V., Economides, J.R., Horton, J.C., 2015. Vascular Supply of the Cerebral Cortex is Specialized for Cell Layers but Not Columns. *Cerebral Cortex* 25, 3673–3681. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhu221>
- Aguado-Llera, D., Goormaghtigh, E., de Geest, N., Quan, X.-J., Prieto, A., Hassan, B.A., Gómez, J., Neira, J.L., 2010. The basic helix-loop-helix region of human neurogenin 1 is a monomeric natively unfolded protein which forms a “fuzzy” complex upon DNA binding. *Biochemistry* 49, 1577–1589. <https://doi.org/10.1021/bi901616z>
- Ait-Oufella, H., Maury, E., Guidet, B., Offenstadt, G., 2008. L’endothélium : un nouvel organe. *Réanimation* 17, 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.reaurg.2007.12.005>
- Alarcan, H., Chaumond, R., Emond, P., Benz-De Bretagne, I., Lefevre, A., Bakkouche, S.E., Veyrat-Durebex, C., Vourc’h, P., Andres, C., Corcia, P., Blasco, H., 2021. Some CSF Kynurenine Pathway Intermediates Associated with Disease Evolution in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Biomolecules* 11. <https://doi.org/10.3390/biom11050691>
- Albrecht, M., Henke, J., Tacke, S., Markert, M., Guth, B., 2014. Effects of isoflurane, ketamine-xylazine and a combination of medetomidine, midazolam and fentanyl on physiological variables continuously measured by telemetry in Wistar rats. *BMC Veterinary Research* 10, 198. <https://doi.org/10.1186/s12917-014-0198-3>
- Al-Lamki, R.S., Mayadas, T.N., 2015. TNF receptors: signaling pathways and contribution to renal dysfunction. *Kidney International* 87, 281–296. <https://doi.org/10.1038/ki.2014.285>
- Alonso, A., 2015. Ultrasound-induced blood-brain barrier opening for drug delivery. *Front Neurol Neurosci* 36, 106–115. <https://doi.org/10.1159/000366242>
- Alonso, A., Reinz, E., Fatar, M., Hennerici, M.G., Meairs, S., 2011. Clearance of albumin following ultrasound-induced blood-brain barrier opening is mediated by glial but not neuronal cells. *Brain Res* 1411, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.07.006>
- Alshammari, T.M., Al-Hassan, A.A., Hadda, T.B., Aljofan, M., 2015. Comparison of different serum sample extraction methods and their suitability for mass spectrometry analysis. *Saudi Pharm J* 23, 689–97. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2015.01.023>
- Anders, S., Pyl, P.T., Huber, W., 2015. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31, 166–169. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>
- Andersen, J.V., Westi, E.W., Jakobsen, E., Urruticoechea, N., Borges, K., Aldana, B.I., 2021. Astrocyte metabolism of the medium-chain fatty acids octanoic acid and decanoic acid promotes GABA synthesis in neurons via elevated glutamine supply. *Molecular Brain* 14, 132. <https://doi.org/10.1186/s13041-021-00842-2>
- Anderson, C.M., Nedergaard, M., 2003. Astrocyte-mediated control of cerebral microcirculation. *Trends Neurosci* 26, 340–344; author reply 344–345. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(03\)00141-3](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(03)00141-3)
- Apte, S.S., 2009. A disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin-type) with thrombospondin type 1 motif (ADAMTS) superfamily: functions and mechanisms. *J Biol Chem* 284, 31493–31497. <https://doi.org/10.1074/jbc.R109.052340>
- Arakawa, H., Iguchi, Y., 2018. Ethological and multi-behavioral analysis of learning and memory performance in laboratory rodent models. *Neurosci Res* 135, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2018.02.001>
- Aroulanda, C., Billault, I., 2019. Chimactiv - Ressources pédagogiques numériques interactives dans l’analyse chimique de milieux complexes [WWW Document]. URL <http://chimactiv.agroparistech.fr/fr/bases/rmn/theorie-illustrée/2> (accessed 5.23.22).
- Aryal, M., Vykhodtseva, N., Zhang, Y.-Z., McDannold, N., 2015. Multiple sessions of liposomal doxorubicin delivery via focused ultrasound mediated blood-brain barrier disruption: a safety study. *J Control Release* 204, 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.02.033>
- Attwell, D., Buchan, A.M., Charpak, S., Lauritzen, M., MacVicar, B.A., Newman, E.A., 2010. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* 468, 232–243. <https://doi.org/10.1038/nature09613>

B

- Barar, J., Rafi, M.A., Pourseif, M.M., Omid, Y., 2016. Blood-brain barrier transport machineries and targeted therapy of brain diseases. *Bioimpacts* 6, 225–248. <https://doi.org/10.15171/bi.2016.30>
- Baseri, B., Choi, J.J., Tung, Y.S., Konofagou, E.E., 2010. Multi-modality safety assessment of blood-brain barrier opening using focused ultrasound and definity microbubbles: a short-term study. *Ultrasound Med Biol* 36, 1445–59. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2010.06.005>
- Basu, S., Hess, S., Nielsen Braad, P.-E., Olsen, B.B., Inglev, S., Høilund-Carlsen, P.F., 2014. The Basic Principles of FDG-PET/CT Imaging. *PET Clin* 9, 355–370, v. <https://doi.org/10.1016/j.cpet.2014.07.006>
- Bazzoni, G., Dejana, E., 2004. Endothelial Cell-to-Cell Junctions: Molecular Organization and Role in Vascular Homeostasis. *Physiological Reviews* 84, 869–901. <https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2003>
- Bazzoni, G., Martinez-Estrada, O.M., Orsenigo, F., Cordenonsi, M., Citi, S., Dejana, E., 2000. Interaction of Junctional Adhesion Molecule with the Tight Junction Components ZO-1, Cingulin, and Occludin*. *Journal of Biological Chemistry* 275, 20520–20526. <https://doi.org/10.1074/jbc.M905251199>
- Bélanger, M., Allaman, I., Magistretti, P.J., 2011. Brain Energy Metabolism: Focus on Astrocyte-Neuron Metabolic Cooperation. *Cell Metabolism* 14, 724–738. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.08.016>
- Bellmann, C., Schreivogel, S., Günther, R., Dabrowski, S., Schumann, M., Wolburg, H., Blasig, I.E., 2014. Highly Conserved Cysteines Are Involved in the Oligomerization of Occludin—Redox Dependency of the Second Extracellular Loop. *Antioxid Redox Signal* 20, 855–867. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5288>
- Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 57, 289–300.
- Benton, H.P., Want, E.J., Ebbels, T.M.D., 2010. Correction of mass calibration gaps in liquid chromatography-mass spectrometry metabolomics data. *Bioinformatics* 26, 2488–2489. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq441>
- Bernardo-Castro, S., Sousa, J.A., Brás, A., Cecília, C., Rodrigues, B., Almendra, L., Machado, C., Santo, G., Silva, F., Ferreira, L., Santana, I., Sargento-Freitas, J., 2020. Pathophysiology of Blood-Brain Barrier Permeability Throughout the Different Stages of Ischemic Stroke and Its Implication on Hemorrhagic Transformation and Recovery. *Front Neurol* 11, 594672. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.594672>
- Berndt, P., Winkler, L., Cording, J., Breikreuz-Korff, O., Rex, A., Dithmer, S., Rausch, V., Blasig, R., Richter, M., Sporbert, A., Wolburg, H., Blasig, I.E., Haseloff, R.F., 2019. Tight junction proteins at the blood-brain barrier: far more than claudin-5. *Cell Mol Life Sci* 76, 1987–2002. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03030-7>
- Black, A., Black, J., 2013. Protein kinase C signaling and cell cycle regulation. *Frontiers in Immunology* 3.
- Blasig, I.E., Winkler, L., Lassowski, B., Mueller, S.L., Zuleger, N., Krause, E., Krause, G., Gast, K., Kolbe, M., Piontek, J., 2006. On the self-association potential of transmembrane tight junction proteins. *Cell Mol Life Sci* 63, 505–514. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5472-x>
- Bloem, B.R., Okun, M.S., Klein, C., 2021. Parkinson's disease. *Lancet* 397, 2284–2303. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00218-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00218-X)
- Bolam, J.P., Hanley, J.J., Booth, P.A.C., Bevan, M.D., 2000. Synaptic organisation of the basal ganglia. *J Anat* 196, 527–542. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.2000.19640527.x>
- Brayman, A.A., Miller, M.W., 1999. Sonolysis of Alunex®-supplemented, 40% hematocrit human erythrocytes by pulsed 1-MHz ultrasound: pulse number, pulse duration and exposure vessel rotation dependence. *Ultrasound in Medicine & Biology* 25, 307–314. [https://doi.org/10.1016/S0301-5629\(98\)00157-4](https://doi.org/10.1016/S0301-5629(98)00157-4)
- Brighi, C., Salimova, E., de Veer, M., Puttick, S., Egan, G., 2022. Translation of focused ultrasound for blood-brain barrier opening in glioma. *Journal of Controlled Release* 345, 443–463. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.03.035>
- Brown, J.A., Codreanu, S.G., Shi, M., Sherrod, S.D., Markov, D.A., Neely, M.D., Britt, C.M., Hoilett, O.S., Reiserer, R.S., Samson, P.C., McCawley, L.J., Webb, D.J., Bowman, A.B., McLean, J.A., Wiksw, J.P., 2016. Metabolic consequences of inflammatory disruption of the blood-brain barrier in an organ-on-chip model of the human neurovascular unit. *J Neuroinflammation* 13, 306. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0760-y>
- Bundgaard, M., Abbott, N.J., 2008. All vertebrates started out with a glial blood-brain barrier 4–500 million years ago. *Glia* 56, 699–708. <https://doi.org/10.1002/glia.20642>

C

- Cavaglia, M., Dombrowski, S.M., Drazba, J., Vasanji, A., Bokesch, P.M., Janigro, D., 2001. Regional variation in brain capillary density and vascular response to ischemia. *Brain Research* 910, 81–93. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02637-3](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02637-3)
- Ceaglio, N., Orozco, G., Etcheverrigaray, M., Mattio, M., Kratje, R., Perotti, N., Oggero, M., 2013. High performance collection of cerebrospinal fluid in rats: Evaluation of erythropoietin penetration after osmotic opening of the blood-brain barrier. *Journal of Neuroscience Methods* 219, 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2013.07.009>

- Charnay, Y., Leger, L., 2010. Brain serotonergic circuitries. *Dialogues Clin Neurosci* 12, 471–87.
- Chavhan, G.B., Babyn, P.S., Thomas, B., Shroff, M.M., Haacke, E.M., 2009. Principles, Techniques, and Applications of T2*-based MR Imaging and Its Special Applications. *Radiographics* 29, 1433–1449. <https://doi.org/10.1148/rg.295095034>
- Chen, I., Lui, F., 2022. Neuroanatomy, Neuron Action Potential, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Chen, W., Chen, Y., Xu, B., Juang, Y.-C., Stippec, S., Zhao, Y., Cobb, M.H., 2009. Regulation of a third conserved phosphorylation site in SGK1. *J Biol Chem* 284, 3453–3460. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807502200>
- Chien, C.-Y., Yang, Y., Gong, Y., Yue, Y., Chen, H., 2022. Blood-Brain Barrier Opening by Individualized Closed-Loop Feedback Control of Focused Ultrasound. *BME Frontiers* 2022. <https://doi.org/10.34133/2022/9867230>
- Cho, K.-O., Hunt, C.A., Kennedy, M.B., 1992. The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the drosophila discs-large tumor suppressor protein. *Neuron* 9, 929–942. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90245-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90245-9)
- Choe, H., Lee, H., Lee, J., Kim, Y., 2021. Protective effect of gamma-aminobutyric acid against oxidative stress by inducing phase II enzymes in C2C12 myoblast cells. *J Food Biochem* 45, e13639. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13639>
- Choi, J.J., Pernot, M., Small, S.A., Konofagou, E.E., 2007. Noninvasive, transcranial and localized opening of the blood-brain barrier using focused ultrasound in mice. *Ultrasound Med Biol* 33, 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2006.07.018>
- Cooke, J.P., 2003. NO and angiogenesis. *Atheroscler Suppl* 4, 53–60. [https://doi.org/10.1016/s1567-5688\(03\)00034-5](https://doi.org/10.1016/s1567-5688(03)00034-5)
- Corcoran, S.E., O'Neill, L.A.J., 2016. HIF1 α and metabolic reprogramming in inflammation. *J Clin Invest* 126, 3699–3707. <https://doi.org/10.1172/JCI84431>
- Craig, A., Cloarec, O., Holmes, E., Nicholson, J.K., Lindon, J.C., 2006. Scaling and normalization effects in NMR spectroscopic metabonomic data sets. *Anal Chem* 78, 2262–7. <https://doi.org/10.1021/ac0519312>
- Crowley, T., Cryan, J.F., Downer, E.J., O'Leary, O.F., 2016. Inhibiting neuroinflammation: The role and therapeutic potential of GABA in neuro-immune interactions. *Brain Behav Immun* 54, 260–277. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.02.001>
- Cucullo, L., Hossain, M., Puvenna, V., Marchi, N., Janigro, D., 2011. The role of shear stress in Blood-Brain Barrier endothelial physiology. *BMC Neurosci* 12, 40. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-12-40>

D

- Davies, P.F., 1995. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev* 75, 519–560. <https://doi.org/10.1152/physrev.1995.75.3.519>
- Desai, B.S., Monahan, A.J., Carvey, P.M., Hendey, B., 2007. Blood-brain barrier pathology in Alzheimer's and Parkinson's disease: implications for drug therapy. *Cell Transplant* 16, 285–299. <https://doi.org/10.3727/000000007783464731>
- Dieterle, F., Ross, A., Schlotterbeck, G., Senn, H., 2006. Probabilistic quotient normalization as robust method to account for dilution of complex biological mixtures. Application in 1H NMR metabonomics. *Anal Chem* 78, 4281–90. <https://doi.org/10.1021/ac051632c>
- DiMicco, J.A., Abshire, V.M., Shekhar, A., Wilbe, J.H., 1987. Role of GABAergic mechanisms in the central regulation of arterial pressure. *Eur Heart J* 8 Suppl B, 133–138. https://doi.org/10.1093/eurheartj/8.suppl_b.133
- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., Gingeras, T.R., 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>
- Dong, X., 2018. Current Strategies for Brain Drug Delivery. *Theranostics* 8, 1481–1493. <https://doi.org/10.7150/thno.21254>
- Downs, M.E., Buch, A., Sierra, C., Karakatsani, M.E., Teichert, T., Chen, S., Konofagou, E.E., Ferrera, V.P., 2015. Long-Term Safety of Repeated Blood-Brain Barrier Opening via Focused Ultrasound with Microbubbles in Non-Human Primates Performing a Cognitive Task. *PLoS One* 10, e0125911. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125911>
- Dunn, O.J., 1964. Multiple Comparisons Using Rank Sums. *Technometrics* 6, 241–252. <https://doi.org/10.1080/00401706.1964.10490181>
- Dunn, O.J., 1961. Multiple Comparisons among Means. *Journal of the American Statistical Association* 56, 52–64. <https://doi.org/10.1080/01621459.1961.10482090>
- Dunton, A.D., Göpel, T., Ho, D.H., Burggren, W., 2021. Form and Function of the Vertebrate and Invertebrate Blood-Brain Barriers. *Int J Mol Sci* 22, 12111. <https://doi.org/10.3390/ijms22212111>
- Durinck, S., Moreau, Y., Kasprzyk, A., Davis, S., De Moor, B., Brazma, A., Huber, W., 2005. BioMart and Bioconductor: a powerful link between biological databases and microarray data analysis. *Bioinformatics* 21, 3439–3440. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti525>
- Durinck, S., Spellman, P.T., Birney, E., Huber, W., 2009. Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nat Protoc* 4, 1184–1191. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.97>

E

- Ebnet, K., Aurrand-Lions, M., Kuhn, A., Kiefer, F., Butz, S., Zander, K., Meyer zu Brickwedde, M.-K., Suzuki, A., Imhof, B.A., Vestweber, D., 2003. The junctional adhesion molecule (JAM) family members JAM-2 and JAM-3 associate with the cell polarity protein PAR-3: a possible role for JAMs in endothelial cell polarity. *J Cell Sci* 116, 3879–3891. <https://doi.org/10.1242/jcs.00704>
- Eelen, G., de Zeeuw, P., Treps, L., Harjes, U., Wong, B.W., Carmeliet, P., 2018. Endothelial Cell Metabolism. *Physiol Rev* 98, 3–58. <https://doi.org/10.1152/physrev.00001.2017>
- Eimerl, S., Schramm, M., 1991. Acute glutamate toxicity in cultured cerebellar granule cells: agonist potency, effects of pH, Zn²⁺ and the potentiation by serum albumin. *Brain Research* 560, 282–290. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91244-U](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91244-U)
- Engelhardt, B., 2008. The blood-central nervous system barriers actively control immune cell entry into the central nervous system. *Curr Pharm Des* 14, 1555–1565. <https://doi.org/10.2174/138161208784705432>
- Errico, C., Pierre, J., Pezet, S., Desailly, Y., Lenkei, Z., Couture, O., Tanter, M., 2015. Ultrafast ultrasound localization microscopy for deep super-resolution vascular imaging. *Nature* 527, 499–502. <https://doi.org/10.1038/nature16066>
- Escoffre, J.-M., Campomanes, P., Tarek, M., Bouakaz, A., 2020. New insights on the role of ROS in the mechanisms of sonoporation-mediated gene delivery. *Ultrason Sonochem* 64, 104998. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.104998>
- Escoffre, J.-M., Derieppe, M., Lammertink, B., Bos, C., Moonen, C., 2017. Microbubble-Assisted Ultrasound-Induced Transient Phosphatidylserine Translocation. *Ultrasound in Medicine & Biology* 43, 838–851. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2016.12.002>
- Evangelou, M., Rendon, A., Ouweland, W.H., Wernisch, L., Dudbridge, F., 2012. Comparison of Methods for Competitive Tests of Pathway Analysis. *PLOS ONE* 7, e41018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041018>

F

- Falkowska, A., Gutowska, I., Goschorska, M., Nowacki, P., Chlubek, D., Baranowska-Bosiacka, I., 2015. Energy Metabolism of the Brain, Including the Cooperation between Astrocytes and Neurons, Especially in the Context of Glycogen Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences* 16, 25959–25981. <https://doi.org/10.3390/ijms161125939>
- Ferezin, C. de C., Basei, F.L., Melo-Hanchuk, T.D., de Oliveira, A.L., Peres de Oliveira, A., Mori, M.P., de Souza-Pinto, N.C., Kobarg, J., 2021. NEK5 interacts with LonP1 and its kinase activity is essential for the regulation of mitochondrial functions and mtDNA maintenance. *FEBS Open Bio* 11, 546–563. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13108>
- Figley, C.R., Stroman, P.W., 2011. The role(s) of astrocytes and astrocyte activity in neurometabolism, neurovascular coupling, and the production of functional neuroimaging signals. *Eur J Neurosci* 33, 577–588. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07584.x>
- Fry, F.J., Barger, J.E., 1978. Acoustical properties of the human skull. *J Acoust Soc Am* 63, 1576–1590. <https://doi.org/10.1121/1.381852>

G

- Gaillard, A., Jaber, M., 2011. Rewiring the brain with cell transplantation in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 34, 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.01.003>
- Gardner, J.L., 2010. Is cortical vasculature functionally organized? *NeuroImage* 49, 1953–1956. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.07.004>
- Gasca-Salas, C., Fernández-Rodríguez, B., Pineda-Pardo, J.A., Rodríguez-Rojas, R., Obeso, I., Hernández-Fernández, F., del Álamo, M., Mata, D., Guida, P., Ordás-Bandera, C., Montero-Roblas, J.I., Martínez-Fernández, R., Foffani, G., Rachmilevitch, I., Obeso, J.A., 2021. Blood-brain barrier opening with focused ultrasound in Parkinson's disease dementia. *Nat Commun* 12, 779. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21022-9>
- Gene Ontology Consortium, 2015. Gene Ontology Consortium: going forward. *Nucleic Acids Res* 43, D1049–1056. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1179>
- Gerstenmayer, M., Fellah, B., Magnin, R., Selingue, E., Larrat, B., 2018. Acoustic Transmission Factor through the Rat Skull as a Function of Body Mass, Frequency and Position. *Ultrasound Med Biol* 44, 2336–2344. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2018.06.005>
- Giacomini, F., Le Corguillé, G., Monsoor, M., Landi, M., Pericard, P., Pétéra, M., Duperier, C., Tremblay-Franco, M., Martin, J.-F., Jacob, D., Goullitquer, S., Thévenot, E.A., Caron, C., 2015. Workflow4Metabolomics: a collaborative research infrastructure for computational metabolomics. *Bioinformatics* 31, 1493–1495. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu813>

- Gillespie, M., Jassal, B., Stephan, R., Milacic, M., Rothfels, K., Senff-Ribeiro, A., Griss, J., Sevilla, C., Matthews, L., Gong, C., Deng, C., Varusai, T., Ragueneau, E., Haider, Y., May, B., Shamovsky, V., Weiser, J., Brunson, T., Sanati, N., Beckman, L., Shao, X., Fabregat, A., Sidiropoulos, K., Murillo, J., Viteri, G., Cook, J., Shorser, S., Bader, G., Demir, E., Sander, C., Haw, R., Wu, G., Stein, L., Hermjakob, H., D'Eustachio, P., 2022. The reactome pathway knowledgebase 2022. *Nucleic Acids Research* 50, D687–D692. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1028>
- Giroux, M.-C., Hélie, P., Burns, P., Vachon, P., 2015. Anesthetic and pathological changes following high doses of ketamine and xylazine in Sprague Dawley rats. *Exp Anim* 64, 253–260. <https://doi.org/10.1538/expanim.14-0088>
- Giroux, M.-C., Santamaria, R., Hélie, P., Burns, P., Beaudry, F., Vachon, P., 2016. Physiological, pharmacokinetic and liver metabolism comparisons between 3-, 6-, 12- and 18-month-old male Sprague Dawley rats under ketamine-xylazine anesthesia. *Exp Anim* 65, 63–75. <https://doi.org/10.1538/expanim.15-0039>
- Glezer, I., Simard, A.R., Rivest, S., 2007. Neuroprotective role of the innate immune system by microglia. *Neuroscience* 147, 867–883. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.02.055>
- Gogiasvili, M., Nowacki, J., Hergenröder, R., Hengstler, J.G., Lambert, J., Edlund, K., 2019. HR-MAS NMR Based Quantitative Metabolomics in Breast Cancer. *Metabolites* 9, E19. <https://doi.org/10.3390/metabo9020019>
- González-Mariscal, L., Tapia, R., Chamorro, D., 2008. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, Apical Junctional Complexes Part I* 1778, 729–756. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.08.018>
- Gosselet, F., Loiola, R.A., Roig, A., Rosell, A., Culot, M., 2021. Central nervous system delivery of molecules across the blood-brain barrier. *Neurochemistry International* 144, 104952. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104952>
- Govindarajan, R., Duraiyan, J., Kaliyappan, K., Palanisamy, M., 2012. Microarray and its applications. *J Pharm Bioallied Sci* 4, S310–S312. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.100283>
- Grider, M.H., Jessu, R., Kabir, R., 2022. Physiology, Action Potential, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Guitton, Y., Tremblay-Franco, M., Le Corguillé, G., Martin, J.-F., Pétéra, M., Roger-Mele, P., Delabrière, A., Goulitquer, S., Monsoor, M., Duperier, C., Canlet, C., Servien, R., Tardivel, P., Caron, C., Giacomoni, F., Thévenot, E.A., 2017. Create, run, share, publish, and reference your LC–MS, FIA–MS, GC–MS, and NMR data analysis workflows with the Workflow4Metabolomics 3.0 Galaxy online infrastructure for metabolomics. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 93, 89–101. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.07.002>

H

- Haim, L.B., Rowitch, D.H., 2017. Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nat Rev Neurosci* 18, 31–41. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.159>
- Hall, C.N., Reynell, C., Gesslein, B., Hamilton, N.B., Mishra, A., Sutherland, B.A., O'Farrell, F.M., Buchan, A.M., Lauritzen, M., Attwell, D., 2014. Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature* 508, 55–60. <https://doi.org/10.1038/nature13165>
- Haller, S., Haacke, E.M., Thurnher, M.M., Barkhof, F., 2021. Susceptibility-weighted Imaging: Technical Essentials and Clinical Neurologic Applications. *Radiology* 299, 3–26. <https://doi.org/10.1148/radiol.2021203071>
- Harder, D.R., Zhang, C., Gebremedhin, D., 2002. Astrocytes function in matching blood flow to metabolic activity. *News Physiol Sci* 17, 27–31. <https://doi.org/10.1152/physiologyonline.2002.17.1.27>
- Harhaj, N.S., Antonetti, D.A., 2004. Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 1206–1237. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.08.007>
- Hashimoto, Y., Campbell, M., 2020. Tight junction modulation at the blood-brain barrier: Current and future perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1862, 183298. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183298>
- Herrero, M.-T., Barcia, C., Navarro, J., 2002. Functional anatomy of thalamus and basal ganglia. *Childs Nerv Syst* 18, 386–404. <https://doi.org/10.1007/s00381-002-0604-1>
- Ho, D.M., Artavanis-Tsakonas, S., Louvi, A., 2020. The Notch pathway in CNS homeostasis and neurodegeneration. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 9, e358. <https://doi.org/10.1002/wdev.358>
- Holmseth, S., Dehnes, Y., Huang, Y.H., Follin-Arbelet, V.V., Grutle, N.J., Mylonakou, M.N., Plachez, C., Zhou, Y., Furness, D.N., Bergles, D.E., Lehre, K.P., Danbolt, N.C., 2012. The Density of EAAC1 (EAAT3) Glutamate Transporters Expressed by Neurons in the Mammalian CNS. *J Neurosci* 32, 6000–6013. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5347-11.2012>
- Horodyckid, C., Canney, M., Vignot, A., Boisgard, R., Drier, A., Huberfeld, G., Francois, C., Prigent, A., Santin, M.D., Adam, C., Willer, J.C., Lafon, C., Chapelon, J.Y., Carpentier, A., 2017. Safe long-term repeated disruption of the blood-brain barrier using an implantable ultrasound device: a multiparametric study in a primate model. *J Neurosurg* 126, 1351–1361. <https://doi.org/10.3171/2016.3.JNS151635>

- Houstěk, J., Cannon, B., Lindberg, O., 1975. Glycerol-3-phosphate shuttle and its function in intermediary metabolism of hamster brown-adipose tissue. *Eur J Biochem* 54, 11–18. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1975.tb04107.x>
- Howarth, C., Gleeson, P., Attwell, D., 2012. Updated energy budgets for neural computation in the neocortex and cerebellum. *J Cereb Blood Flow Metab* 32, 1222–1232. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.35>
- Howe, K.L., Achuthan, P., Allen, James, Allen, Jamie, Alvarez-Jarreta, J., Amode, M.R., Armean, I.M., Azov, A.G., Bennett, R., Bhai, J., Billis, K., Boddu, S., Charkhchi, M., Cummins, C., Da Rin Fioretto, L., Davidson, C., Dodiya, K., El Houdaigui, B., Fatima, R., Gall, A., Garcia Giron, C., Grego, T., Guijarro-Clarke, C., Haggerty, L., Hemrom, A., Hourlier, T., Izuogu, O.G., Juettemann, T., Kaikala, V., Kay, M., Lavidas, I., Le, T., Lemos, D., Gonzalez Martinez, J., Marugán, J.C., Maurel, T., McMahon, A.C., Mohanan, S., Moore, B., Muffato, M., Oheh, D.N., Paraschas, D., Parker, A., Parton, A., Prosovetskaia, I., Sakthivel, M.P., Salam, A.I.A., Schmitt, B.M., Schuilenburg, H., Sheppard, D., Steed, E., Szpak, M., Szuba, M., Taylor, K., Thormann, A., Threadgold, G., Walts, B., Winterbottom, A., Chakiachvili, M., Chaubal, A., De Silva, N., Flint, B., Frankish, A., Hunt, S.E., Iisley, G.R., Langridge, N., Loveland, J.E., Martin, F.J., Mudge, J.M., Morales, J., Perry, E., Ruffier, M., Tate, J., Thybert, D., Trevanion, S.J., Cunningham, F., Yates, A.D., Zerbino, D.R., Flicek, P., 2021. Ensembl 2021. *Nucleic Acids Res* 49, D884–D891. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa942>
- Hylin, M.J., Kerr, A.L., Holden, R., 2017. Understanding the Mechanisms of Recovery and/or Compensation following Injury. *Neural Plasticity* 2017, e7125057. <https://doi.org/10.1155/2017/7125057>
- Hynynen, K., McDannold, N., Sheikov, N.A., Jolesz, F.A., Vykhodtseva, N., 2005. Local and reversible blood–brain barrier disruption by noninvasive focused ultrasound at frequencies suitable for trans-skull sonications. *NeuroImage* 24, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2004.06.046>

I

- Itani, M., Mattrey, R.F., 2012. The Effect of Inhaled Gases on Ultrasound Contrast Agent Longevity In Vivo. *Mol Imaging Biol* 14, 40–46. <https://doi.org/10.1007/s11307-011-0475-5>

J

- Jalali, S., Huang, Y., Dumont, D.J., Hynynen, K., 2010. Focused ultrasound-mediated bbb disruption is associated with an increase in activation of AKT: experimental study in rats. *BMC Neurol* 10, 114. <https://doi.org/10.1186/1471-2377-10-114>
- Jassal, B., Matthews, L., Viteri, G., Gong, C., Lorente, P., Fabregat, A., Sidiropoulos, K., Cook, J., Gillespie, M., Haw, R., Loney, F., May, B., Milacic, M., Rothfels, K., Sevilla, C., Shamovsky, V., Shorser, S., Varusai, T., Weiser, J., Wu, G., Stein, L., Hermjakob, H., D'Eustachio, P., 2020. The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res* 48, D498–D503. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1031>
- Jesse, S., Koenig, A., Ellenrieder, V., Menke, A., 2010. Lef-1 isoforms regulate different target genes and reduce cellular adhesion. *International Journal of Cancer* 126, 1109–1120. <https://doi.org/10.1002/ijc.24802>
- Ji, R., Karakatsani, M.E., Burgess, M., Smith, M., Murillo, M.F., Konofagou, E.E., 2021. Cavitation modulated inflammatory response following focused ultrasound blood-brain barrier opening. *J Control Release*. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.07.042>
- Jia, C., Shi, J., Yao, Y., Han, T., Yu, A.C.H., Qin, P., 2021. Plasma Membrane Blebbing Dynamics Involved in the Reversibly Perforated Cell by Ultrasound-Driven Microbubbles. *Ultrasound in Medicine and Biology* 47, 733–750. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2020.11.029>
- Jiang, W., Chalich, Y., Deen, M.J., 2019. Sensors for Positron Emission Tomography Applications. *Sensors* 19, 5019. <https://doi.org/10.3390/s19225019>
- Johanson, C.E., 1989. Ontogeny and Phylogeny of the Blood-Brain Barrier, in: Neuwelt, E.A. (Ed.), *Implications of the Blood-Brain Barrier and Its Manipulation: Volume 1 Basic Science Aspects*. Springer US, Boston, MA, pp. 157–198. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0701-3_7
- Juffermans, L.J.M., Kamp, O., Dijkmans, P.A., Visser, C.A., Musters, R.J.P., 2008. Low-Intensity Ultrasound-Exposed Microbubbles Provoke Local Hyperpolarization of the Cell Membrane Via Activation of BKCa Channels. *Ultrasound in Medicine & Biology* 34, 502–508. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2007.09.010>

K

- Kadry, H., Noorani, B., Cucullo, L., 2020. A blood–brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. *Fluids and Barriers of the CNS* 17, 69. <https://doi.org/10.1186/s12987-020-00230-3>
- Kanehisa, M., Goto, S., 2000. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 28, 27–30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>

- Karanovic, N., Pecotic, R., Valic, M., Jeroncic, A., Carev, M., Karanovic, S., Ujevic, A., Dogas, Z., 2010. The acute hypoxic ventilatory response under halothane, isoflurane, and sevoflurane anaesthesia in rats*. *Anaesthesia* 65, 227–234. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2044.2009.06194.x>
- Kastler, B., Vetter, D., 2018. *Comprendre l'IRM*, 8ième. ed. Elsevier Masson.
- Keaney, J., Campbell, M., 2015. The dynamic blood–brain barrier. *The FEBS Journal* 282, 4067–4079. <https://doi.org/10.1111/febs.13412>
- Keller, D., Erö, C., Markram, H., 2018. Cell Densities in the Mouse Brain: A Systematic Review. *Frontiers in Neuroanatomy* 12.
- Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B.A., Thiessen, P.A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., Bolton, E.E., 2021. PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces. *Nucleic Acids Res* 49, D1388–D1395. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa971>
- Kirst, C., Skriabine, S., Vieites-Prado, A., Topilko, T., Bertin, P., Gerschenfeld, G., Verny, F., Topilko, P., Michalski, N., Tessier-Lavigne, M., Renier, N., 2020. Mapping the Fine-Scale Organization and Plasticity of the Brain Vasculature. *Cell* 180, 780–795.e25. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.01.028>
- Kobayashi, K., 2001. Role of catecholamine signaling in brain and nervous system functions: new insights from mouse molecular genetic study. *J Investig Dermatol Symp Proc* 6, 115–121. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.00011.x>
- Kosten, L., Deleye, S., Stroobants, S., Wyffels, L., Mingote, S., Rayport, S., Staelens, S., 2019. Molecular Imaging of mGluR5 Availability with [¹¹C]ABP68 in Glutaminase Heterozygous Mice. *Cell Mol Neurobiol* 39, 255–263. <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0645-y>
- Kovacs, Z.I., Kim, S., Jikaria, N., Qureshi, F., Milo, B., Lewis, B.K., Bresler, M., Burks, S.R., Frank, J.A., 2017. Disrupting the blood-brain barrier by focused ultrasound induces sterile inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E75–E84. <https://doi.org/10.1073/pnas.1614777114>
- Kramerova, I.A., Kawaguchi, N., Fessler, L.I., Nelson, R.E., Chen, Y., Kramerov, A.A., Kusche-Gullberg, M., Kramer, J.M., Ackley, B.D., Sieron, A.L., Prockop, D.J., Fessler, J.H., 2000. Papilin in development; a pericellular protein with a homology to the ADAMTS metalloproteinases. *Development* 127, 5475–5485. <https://doi.org/10.1242/dev.127.24.5475>
- Kreitzer, A.C., Malenka, R.C., 2008. Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron* 60, 543–554. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.11.005>
- Ku, M.-C., Waiczies, S., Niendorf, T., Pohlmann, A., 2018. Assessment of Blood Brain Barrier Leakage with Gadolinium-Enhanced MRI, in: García Martín, M.L., López Larrubia, P. (Eds.), *Preclinical MRI: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Springer, New York, NY, pp. 395–408. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7531-0_23
- Kukurba, K.R., Montgomery, S.B., 2015. RNA Sequencing and Analysis. *Cold Spring Harb Protoc* 2015, 951–969. <https://doi.org/10.1101/pdb.top084970>

L

- Law, C.W., Chen, Y., Shi, W., Smyth, G.K., 2014. voom: precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biology* 15, R29. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r29>
- Lee, H.-W., Xu, Y., Zhu, X., Jang, C., Choi, W., Bae, H., Wang, W., He, L., Jin, S.-W., Arany, Z., Simons, M., 2022. Endothelium-derived lactate is required for pericyte function and blood–brain barrier maintenance. *The EMBO Journal* 41, e109890. <https://doi.org/10.15252/embj.2021109890>
- Lefevre, A., Mavel, S., Nadal-Desbarats, L., Galineau, L., Attucci, S., Dufour, D., Sokol, H., Emond, P., 2019. Validation of a global quantitative analysis methodology of tryptophan metabolites in mice using LC-MS. *Talanta* 195, 593–598. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.094>
- Lefort, G., Liaubet, L., Canlet, C., Tardivel, P., Pere, M.C., Quesnel, H., Paris, A., Iannuccelli, N., Vialaneix, N., Servien, R., 2019. ASICS: an R package for a whole analysis workflow of 1D 1H NMR spectra. *Bioinformatics* 35, 4356–4363. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz248>
- Liao, W.-H., Hsiao, M.-Y., Kung, Y., Liu, H.-L., Béra, J.-C., Insera, C., Chen, W.-S., 2020. TRPV4 promotes acoustic wave-mediated BBB opening via Ca²⁺/PKC- δ pathway. *Journal of Advanced Research* 26, 15–28. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.06.012>
- Lim, S.A.O., Kang, U.J., McGehee, D.S., 2014. Striatal cholinergic interneuron regulation and circuit effects. *Front Synaptic Neurosci* 6, 22. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2014.00022>
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J., 2001. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings IPII of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 3–25.1. *Advanced Drug*

Delivery Reviews, Special issue dedicated to Dr. Eric Tomlinson, *Advanced Drug Delivery Reviews*, A Selection of the Most Highly Cited Articles, 1991-1998 46, 3–26. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00129-0)

- Lipsman, N., Meng, Y., Bethune, A.J., Huang, Y., Lam, B., Masellis, M., Herrmann, N., Heyn, C., Aubert, I., Boutet, A., Smith, G.S., Hynynen, K., Black, S.E., 2018. Blood–brain barrier opening in Alzheimer’s disease using MR-guided focused ultrasound. *Nat Commun* 9, 2336. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04529-6>
- Liu, H.L., Wai, Y.Y., Chen, W.S., Chen, J.C., Hsu, P.H., Wu, X.Y., Huang, W.C., Yen, T.C., Wang, J.J., 2008. Hemorrhage detection during focused-ultrasound induced blood-brain-barrier opening by using susceptibility-weighted magnetic resonance imaging. *Ultrasound Med Biol* 34, 598–606. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2008.01.011>
- Liu, J., Tu, H., Zhang, D., Zheng, H., Li, Y.-L., 2012. Voltage-gated sodium channel expression and action potential generation in differentiated NG108-15 cells. *BMC Neuroscience* 13, 129. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-13-129>
- Liu, W.-Y., Wang, Z.-B., Zhang, L.-C., Wei, X., Li, L., 2012. Tight Junction in Blood-Brain Barrier: An Overview of Structure, Regulation, and Regulator Substances. *CNS Neuroscience & Therapeutics* 18, 609–615. <https://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2012.00340.x>
- Lochhead, J.J., McCaffrey, G., Quigley, C.E., Finch, J., DeMarco, K.M., Nametz, N., Davis, T.P., 2010. Oxidative stress increases blood–brain barrier permeability and induces alterations in occludin during hypoxia–reoxygenation. *J Cereb Blood Flow Metab* 30, 1625–1636. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2010.29>
- Lochhead, J.J., Yang, J., Ronaldson, P.T., Davis, T.P., 2020. Structure, Function, and Regulation of the Blood-Brain Barrier Tight Junction in Central Nervous System Disorders. *Frontiers in Physiology* 11.
- Luissint, A.-C., Artus, C., Glacial, F., Ganeshamoorthy, K., Couraud, P.-O., 2012. Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation. *Fluids Barriers CNS* 9, 23. <https://doi.org/10.1186/2045-8118-9-23>

M

- Madsen, R., Lundstedt, T., Trygg, J., 2010. Chemometrics in metabolomics—A review in human disease diagnosis. *Analytica Chimica Acta* 659, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.11.042>
- Majdalawieh, A., Ro, H.-S., 2010. PPAR γ 1 and LXR α face a new regulator of macrophage cholesterol homeostasis and inflammatory responsiveness, AEBP1. *Nucl Recept Signal* 8, e004. <https://doi.org/10.1621/nrs.08004>
- Marcinowski, F., 2020. Max Lewandowsky (1876–1918). *J Neurol* 267, 1223–1224. <https://doi.org/10.1007/s00415-019-09393-y>
- Mardis, E.R., 2013. Next-Generation Sequencing Platforms. *Annual Review of Analytical Chemistry* 6, 287–303. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-062012-092628>
- Marquet, F., Teichert, T., Wu, S.-Y., Tung, Y.-S., Downs, M., Wang, S., Chen, C., Ferrera, V., Konofagou, E.E., 2014. Real-time, transcranial monitoring of safe blood-brain barrier opening in non-human primates. *PLoS One* 9, e84310. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084310>
- Martí i Líndez, A.-A., Reith, W., 2021. Arginine-dependent immune responses. *Cell. Mol. Life Sci.* 78, 5303–5324. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03828-4>
- Martinelli, D.C., Chew, K.S., Rohlmann, A., Lum, M.Y., Ressler, S., Hattar, S., Brunger, A.T., Missler, M., Südhof, T.C., 2016. Expression of C1ql3 in Discrete Neuronal Populations Controls Efferent Synapse Numbers and Diverse Behaviors. *Neuron* 91, 1034–1051. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.07.002>
- Martínez-Colón, G.J., Moore, B.B., 2018. Prostaglandin E2 as a Regulator of Immunity to Pathogens. *Pharmacol Ther* 185, 135–146. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.12.008>
- Mathern, D.R., Heeger, P.S., 2015. Molecules Great and Small: The Complement System. *Clin J Am Soc Nephrol* 10, 1636–1650. <https://doi.org/10.2215/CJN.06230614>
- McDannold, N., Vykhodtseva, N., Raymond, S., Jolesz, F.A., Hynynen, K., 2005. MRI-guided targeted blood-brain barrier disruption with focused ultrasound: histological findings in rabbits. *Ultrasound Med Biol* 31, 1527–37. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2005.07.010>
- McDannold, N., Zhang, Y., Vykhodtseva, N., 2017. The Effects of Oxygen on Ultrasound-Induced Blood–Brain Barrier Disruption in Mice. *Ultrasound in Medicine & Biology* 43, 469–475. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2016.09.019>
- McMahon, D., Bendayan, R., Hynynen, K., 2017. Acute effects of focused ultrasound-induced increases in blood-brain barrier permeability on rat microvascular transcriptome. *Sci Rep* 7, 45657. <https://doi.org/10.1038/srep45657>
- McMahon, D., Hynynen, K., 2017. Acute Inflammatory Response Following Increased Blood-Brain Barrier Permeability Induced by Focused Ultrasound is Dependent on Microbubble Dose. *Theranostics* 7, 3989–4000. <https://doi.org/10.7150/thno.21630>

- McMahon, D., Mah, E., Hynynen, K., 2018. Angiogenic response of rat hippocampal vasculature to focused ultrasound-mediated increases in blood-brain barrier permeability. *Sci Rep* 8, 12178. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30825-8>
- McMahon, D., Poon, C., Hynynen, K., 2019. Evaluating the safety profile of focused ultrasound and microbubble-mediated treatments to increase blood-brain barrier permeability. *Expert Opin Drug Deliv* 16, 129–142. <https://doi.org/10.1080/17425247.2019.1567490>
- Meijering, B.D.M., Juffermans, L.J.M., van Wamel, A., Henning, R.H., Zuhorn, I.S., Emmer, M., Versteilen, A.M.G., Paulus, W.J., van Gilst, W.H., Kooiman, K., de Jong, N., Musters, R.J.P., Deelman, L.E., Kamp, O., 2009. Ultrasound and Microbubble-Targeted Delivery of Macromolecules Is Regulated by Induction of Endocytosis and Pore Formation. *Circulation Research* 104, 679–687. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.183806>
- Mergenthaler, P., Lindauer, U., Dienel, G.A., Meisel, A., 2013. Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci* 36, 587–597. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.07.001>
- Miller, D.L., Gies, R.A., 1998. The interaction of ultrasonic heating and cavitation in vascular bioeffects on mouse intestine. *Ultrasound in Medicine & Biology* 24, 123–128. [https://doi.org/10.1016/S0301-5629\(97\)00209-3](https://doi.org/10.1016/S0301-5629(97)00209-3)
- Montero, A.-S., Bielle, F., Goldwirt, L., Lalot, A., Bouchoux, G., Canney, M., Belin, F., Beccaria, K., Pradat, P.-F., Salachas, F., Boillée, S., Lobsiger, C., Lafon, C., Chapelon, J.-Y., Carpentier, A., 2019. Ultrasound-Induced Blood–Spinal Cord Barrier Opening in Rabbits. *Ultrasound in Medicine & Biology* 45, 2417–2426. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2019.05.022>
- Monti, S., Tamayo, P., Mesirov, J., Golub, T., 2003. Consensus Clustering: A Resampling-Based Method for Class Discovery and Visualization of Gene Expression Microarray Data. *Machine Learning* 52, 91–118. <https://doi.org/10.1023/A:1023949509487>
- Morris, S.M., Jr., 2007. Arginine Metabolism: Boundaries of Our Knowledge. *The Journal of Nutrition* 137, 1602S–1609S. <https://doi.org/10.1093/jn/137.6.1602S>
- Mulvihill, J.J., Cunnane, E.M., Ross, A.M., Duskey, J.T., Tosi, G., Grabrucker, A.M., 2020. Drug delivery across the blood–brain barrier: recent advances in the use of nanocarriers. *Nanomedicine* 15, 205–214. <https://doi.org/10.2217/nmm-2019-0367>

N

- Nadal, A., Fuentes, E., Pastor, J., McNaughton, P.A., 1995. Plasma albumin is a potent trigger of calcium signals and DNA synthesis in astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1426–1430.
- Nakamura, K., 2013. The role of the dorsal raphe nucleus in reward-seeking behavior. *Front Integr Neurosci* 7, 60. <https://doi.org/10.3389/fnint.2013.00060>
- Ni, R.-J., Huang, Z.-H., Shu, Y.-M., Wang, Y., Li, T., Zhou, J.-N., 2018. Atlas of the Striatum and Globus Pallidus in the Tree Shrew: Comparison with Rat and Mouse. *Neurosci Bull* 34, 405–418. <https://doi.org/10.1007/s12264-018-0212-z>
- Nirogi, R., Kandikere, V., Mudigonda, K., Bhyrapuneni, G., Muddana, N., Saralaya, R., Benade, V., 2009. A simple and rapid method to collect the cerebrospinal fluid of rats and its application for the assessment of drug penetration into the central nervous system. *J Neurosci Methods* 178, 116–119. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.12.001>
- Norena-Caro, D., 2017. Liquid chromatography MS spectrum 3D analysis.

O

- Okumoto, K., Tamura, S., Honsho, M., Fujiki, Y., 2020. Peroxisome: Metabolic Functions and Biogenesis. *Adv Exp Med Biol* 1299, 3–17. https://doi.org/10.1007/978-3-030-60204-8_1
- Olumolade, O.O., Wang, S., Samiotaki, G., Konofagou, E.E., 2016. Longitudinal Motor and Behavioral Assessment of Blood-Brain Barrier Opening with Transcranial Focused Ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 42, 2270–82. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2016.05.004>
- O'Reilly, M.A., Hough, O., Hynynen, K., 2017. Blood-Brain Barrier Closure Time After Controlled Ultrasound-Induced Opening Is Independent of Opening Volume. *J Ultrasound Med* 36, 475–483. <https://doi.org/10.7863/ultra.16.02005>

P

- Pan, L., Feigin, A., 2021. Huntington's Disease: New Frontiers in Therapeutics. *Curr Neurol Neurosci Rep* 21, 10. <https://doi.org/10.1007/s11910-021-01093-3>
- Panov, A., Orynbayeva, Z., Vavilin, V., Lyakhovich, V., 2014. Fatty acids in energy metabolism of the central nervous system. *Biomed Res Int* 2014, 472459. <https://doi.org/10.1155/2014/472459>
- Pardridge, W.M., 2007. Blood-brain barrier delivery. *Drug Discovery Today* 12, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2006.10.013>
- Pardridge, W.M., 2005. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx* 2, 3–14. <https://doi.org/10.1602/neurorx.2.1.3>
- Park, J., Fan, Z., Kumon, R.E., El-Sayed, M.E.H., Deng, C.X., 2010. Modulation of Intracellular Ca²⁺ Concentration in Brain Microvascular Endothelial Cells in vitro by Acoustic Cavitation. *Ultrasound in Medicine & Biology* 36, 1176–1187. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2010.04.006>
- Park, J., Zhang, Y., Vykhodtseva, N., Jolesz, F.A., McDannold, N.J., 2012. The kinetics of blood brain barrier permeability and targeted doxorubicin delivery into brain induced by focused ultrasound. *Journal of Controlled Release* 162, 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.06.012>
- Patel, A.B., de Graaf, R.A., Mason, G.F., Rothman, D.L., Shulman, R.G., Behar, K.L., 2005. The contribution of GABA to glutamate/glutamine cycling and energy metabolism in the rat cortex in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 5588–5593. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501703102>
- Pawlina, W., Ross, M., 2018. *Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology*, 8e édition. ed. LWW, Philadelphia.
- Paxinos, G., Watson, C., 2013. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Elsevier.
- Pereira, S.G., Oakley, F., 2008. Nuclear factor-kappaB1: regulation and function. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 1425–30. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.05.004>
- Prager, E.M., Plotkin, J.L., 2019. Compartmental function and modulation of the striatum. *J Neurosci Res* 97, 1503–1514. <https://doi.org/10.1002/jnr.24522>
- Presset, A., Bodard, S., Lefèvre, A., Millet, A., Oujagir, E., Dupuy, C., Iazourène, T., Bouakaz, A., Emond, P., Escoffre, J.-M., Nadal-Desbarats, L., 2022. First metabolomic signature of blood brain barrier opening induced by microbubble-assisted ultrasound. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 15.
- Presset, A., Bonneau, C., Kazuyoshi, S., Nadal-Desbarats, L., Mitsuyoshi, T., Bouakaz, A., Kudo, N., Escoffre, J.M., Sasaki, N., 2020. Endothelial Cells, First Target of Drug Delivery Using Microbubble-Assisted Ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 46, 1565–1583. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2020.03.013>

Q

- Qin, P., Han, T., Yu, A.C.H., Xu, L., 2018. Mechanistic understanding the bioeffects of ultrasound-driven microbubbles to enhance macromolecule delivery. *Journal of Controlled Release* 272, 169–181. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.01.001>

R

- Rabinowitz, J.D., Enerbäck, S., 2020. Lactate: the ugly duckling of energy metabolism. *Nat Metab* 2, 566–571. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0243-4>
- Rabut, G., Peter, M., 2008. Function and regulation of protein neddylation. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' Review Series. *EMBO Rep* 9, 969–976. <https://doi.org/10.1038/embor.2008.183>
- Rahimi, N., 2017. Defenders and Challengers of Endothelial Barrier Function. *Front Immunol* 8, 1847. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01847>
- Raymond, S.B., Skoch, J., Hynynen, K., Bacskai, B.J., 2007. Multiphoton imaging of ultrasound/Optison mediated cerebrovascular effects in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab* 27, 393–403. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600336>
- Reese, T.S., Karnovsky, M.J., 1967. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* 34, 207–217. <https://doi.org/10.1083/jcb.34.1.207>
- Reis, M., Liebner, S., 2013. Wnt signaling in the vasculature. *Experimental Cell Research, Special Issue: Endothelial Biology* 319, 1317–1323. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.12.023>
- Ribatti, D., Nico, B., Crivellato, E., Artico, M., 2006. Development of the blood-brain barrier: a historical point of view. *Anat Rec B New Anat* 289, 3–8. <https://doi.org/10.1002/ar.b.20087>
- Ritchie, M.E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C.W., Shi, W., Smyth, G.K., 2015. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 43, e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>

- Robinson, M.D., Oshlack, A., 2010. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biology* 11, R25. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-3-r25>
- Rucker, H.K., Wynder, H.J., Thomas, W.E., 2000. Cellular mechanisms of CNS pericytes. *Brain Research Bulletin* 51, 363–369. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(99\)00260-9](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(99)00260-9)

S

- Samiotaki, G., Vlachos, F., Tung, Y.-S., Konofagou, E.E., 2012. A Quantitative Pressure and Microbubble-Size Dependence Study of Focused Ultrasound-Induced Blood-Brain Barrier Opening Reversibility in vivo Using MRI. *Magn Reson Med* 67, 769–777. <https://doi.org/10.1002/mrm.23063>
- Sanches, P.G., Rossin, R., Bohmer, M., Tiemann, K., Grull, H., 2013. Real-time imaging and kinetics measurements of focused ultrasound-induced extravasation in skeletal muscle using SPECT/CT. *J Control Release* 168, 262–70. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.03.024>
- Saria, A., Lundberg, J.M., 1983. Evans blue fluorescence: quantitative and morphological evaluation of vascular permeability in animal tissues. *Journal of Neuroscience Methods* 8, 41–49. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(83\)90050-X](https://doi.org/10.1016/0165-0270(83)90050-X)
- Sato, H., Kato, R., Isogai, Y., Saka, G., Ohtsuki, M., Taketomi, Y., Yamamoto, K., Tsutsumi, K., Yamada, J., Masuda, S., Ishikawa, Y., Ishii, T., Kobayashi, T., Ikeda, K., Taguchi, R., Hatakeyama, S., Hara, S., Kudo, I., Itabe, H., Murakami, M., 2008. Analyses of Group III Secreted Phospholipase A2 Transgenic Mice Reveal Potential Participation of This Enzyme in Plasma Lipoprotein Modification, Macrophage Foam Cell Formation, and Atherosclerosis. *J Biol Chem* 283, 33483–33497. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804628200>
- Savtchouk, I., Volterra, A., 2018. Gliotransmission: Beyond Black-and-White. *J Neurosci* 38, 14–25. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0017-17.2017>
- Schnog, J.-J.B., Jager, E.H., van der Dijs, F.P.L., Duits, A.J., Moshage, H., Muskiet, F.D., Muskiet, F.A.J., 2004. Evidence for a metabolic shift of arginine metabolism in sickle cell disease. *Ann Hematol* 83, 371–375. <https://doi.org/10.1007/s00277-004-0856-9>
- Schwinn, D.A., McIntyre, R.W., Reves, J.G., 1990. Isoflurane-induced vasodilation: role of the alpha-adrenergic nervous system. *Anesth Analg* 71, 451–459. <https://doi.org/10.1213/00000539-199011000-00001>
- Sheikov, N., McDannold, N., Jolesz, F., Zhang, Y.Z., Tam, K., Hynynen, K., 2006. Brain arterioles show more active vesicular transport of blood-borne tracer molecules than capillaries and venules after focused ultrasound-evoked opening of the blood-brain barrier. *Ultrasound Med Biol* 32, 1399–409. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2006.05.015>
- Sheikov, N., McDannold, N., Vykhodtseva, N., Jolesz, F., Hynynen, K., 2004. Cellular mechanisms of the blood-brain barrier opening induced by ultrasound in presence of microbubbles. *Ultrasound Med Biol* 30, 979–89. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2004.04.010>
- Shen, Y., Zhang, A., Guo, J., Dan, G., Chen, S., Yu, H., 2014. Fluorescence imaging of Evans blue extravasation into mouse brain induced by low frequency ultrasound with microbubble. *Bio-Medical Materials and Engineering* 24, 2831–2838. <https://doi.org/10.3233/BME-141101>
- Simon, M.J., Iliff, J.J., 2016. Regulation of cerebrospinal fluid (CSF) flow in neurodegenerative, neurovascular and neuroinflammatory disease. *Biochim Biophys Acta* 1862, 442–51. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.10.014>
- Sinharay, S., Tu, T.W., Kovacs, Z.I., Schreiber-Stainthorp, W., Sundby, M., Zhang, X., Papadakis, G.Z., Reid, W.C., Frank, J.A., Hammoud, D.A., 2019. In vivo imaging of sterile microglial activation in rat brain after disrupting the blood-brain barrier with pulsed focused ultrasound: [18F]DPA-714 PET study. *J Neuroinflammation* 16, 155. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1543-z>
- Siracusa, R., Fusco, R., Cuzzocrea, S., 2019. Astrocytes: Role and Functions in Brain Pathologies. *Frontiers in Pharmacology* 10.
- Smith, C.A., Want, E.J., O'Maille, G., Abagyan, R., Siuzdak, G., 2006. XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. *Anal. Chem.* 78, 779–787. <https://doi.org/10.1021/ac051437y>
- Somersalo, E., Calvetti, D., 2013. Quantitative in silico Analysis of Neurotransmitter Pathways Under Steady State Conditions. *Frontiers in Endocrinology* 4.
- Song, K.-H., Harvey, B.K., Borden, M.A., 2018. State-of-the-art of microbubble-assisted blood-brain barrier disruption. *Theranostics* 8, 4393–4408. <https://doi.org/10.7150/thno.26869>
- Sun, S., Hood, M., Scott, L., Peng, Q., Mukherjee, S., Tung, J., Zhou, X., 2017. Differential expression analysis for RNAseq using Poisson mixed models. *Nucleic Acids Res* 45, e106. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx204>
- Sun, T., Samiotaki, G., Wang, S., Acosta, C., Chen, C.C., Konofagou, E.E., 2015. Acoustic Cavitation-Based Monitoring of the Reversibility and Permeability of Ultrasound-Induced Blood-Brain Barrier Opening. *Phys Med Biol* 60, 9079–9094. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/60/23/9079>

T

- Takakura, Y., Audus, K.L., Borchardt, R.T., 1991. Blood—Brain Barrier: Transport Studies in Isolated Brain Capillaries and in Cultured Brain Endothelial Cells, in: August, J.T., Anders, M.W., Murad, F. (Eds.), *Advances in Pharmacology*. Academic Press, pp. 137–165. [https://doi.org/10.1016/S1054-3589\(08\)60034-4](https://doi.org/10.1016/S1054-3589(08)60034-4)
- Taketomi, Y., Ueno, N., Kojima, T., Sato, H., Murase, R., Yamamoto, K., Tanaka, S., Sakanaka, M., Nakamura, Masanori, Nishito, Y., Kawana, M., Kambe, N., Ikeda, K., Taguchi, R., Nakamizo, S., Kabashima, K., Gelb, M.H., Arita, M., Yokomizo, T., Nakamura, Motonao, Watanabe, K., Hirai, H., Nakamura, Masataka, Okayama, Y., Ra, C., Aritake, K., Urade, Y., Morimoto, K., Sugimoto, Y., Shimizu, T., Narumiya, S., Hara, S., Murakami, M., 2013. Mast cell maturation is driven via a group III phospholipase A2-prostaglandin D2–DP1 receptor paracrine axis. *Nat Immunol* 14, 554–563. <https://doi.org/10.1038/ni.2586>
- Tanaka, M., Toth, F., Polyak, H., Szabo, A., Mandi, Y., Vecsei, L., 2021. Immune Influencers in Action: Metabolites and Enzymes of the Tryptophan-Kynurenine Metabolic Pathway. *Biomedicines* 9. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9070734>
- Tardivel, P.J.C., Canlet, C., Lefort, G., Tremblay-Franco, M., Debrauwer, L., Concordet, D., Servien, R., 2017. ASICS: an automatic method for identification and quantification of metabolites in complex 1D 1H NMR spectra. *Metabolomics* 13, 109. <https://doi.org/10.1007/s11306-017-1244-5>
- Tautenhahn, R., Böttcher, C., Neumann, S., 2008. Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS. *BMC Bioinformatics* 9, 504. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-504>
- Tétrault, S., Chever, O., Sik, A., Amzica, F., 2008. Opening of the blood-brain barrier during isoflurane anaesthesia. *Eur J Neurosci* 28, 1330–1341. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06443.x>
- Thevenot, E.A., Roux, A., Xu, Y., Ezan, E., Junot, C., 2015. Analysis of the Human Adult Urinary Metabolome Variations with Age, Body Mass Index, and Gender by Implementing a Comprehensive Workflow for Univariate and OPLS Statistical Analyses. *J Proteome Res* 14, 3322–35. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00354>
- Thomsen, J.H., Etzerodt, A., Svendsen, P., Moestrup, S.K., 2013. The Haptoglobin-CD163-Heme Oxygenase-1 Pathway for Hemoglobin Scavenging. *Oxid Med Cell Longev* 2013, 523652. <https://doi.org/10.1155/2013/523652>
- Todd, N., Zhang, Y., Livingstone, M., Borsook, D., McDannold, N., 2019. The neurovascular response is attenuated by focused ultrasound-mediated disruption of the blood-brain barrier. *NeuroImage* 201, 116010. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2019.116010>
- Tsai, H.C., Chen, W.S., Inserra, C., Wei, K.C., Liu, H.L., 2018. Safety evaluation of frequent application of microbubble-enhanced focused ultrasound blood-brain-barrier opening. *Sci Rep* 8, 17720. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35677-w>

V

- van den Berg, R.A., Hoefsloot, H.C., Westerhuis, J.A., Smilde, A.K., van der Werf, M.J., 2006. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics* 7, 142. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-142>
- Van Itallie, C.M., Anderson, J.M., 2018. Phosphorylation of tight junction transmembrane proteins: Many sites, much to do. *Tissue Barriers* 6, e1382671. <https://doi.org/10.1080/21688370.2017.1382671>
- Verkhatsky, A., Nedergaard, M., 2018. Physiology of Astroglia. *Physiol Rev* 98, 239–389. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016>
- Vodovar, D., Aboab, J., Silva, S., Tournier, N., 2019. Comprendre la tomographie par émission de positons (TEP) — une modalité d'imagerie pour la réanimation ? *Méd. Intensive Réa.* 28, 347–352. <https://doi.org/10.3166/rea-2019-0092>

W

- Wallez, Y., Huber, P., 2008. Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, Apical Junctional Complexes Part I* 1778, 794–809. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.09.003>
- Walter, J.K., Rueckert, C., Voss, M., Mueller, S.L., Piontek, J., Gast, K., Blasig, I.E., 2009. The oligomerization of the coiled coil-domain of occludin is redox sensitive. *Ann N Y Acad Sci* 1165, 19–27. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04058.x>
- Walter, W., Sánchez-Cabo, F., Ricote, M., 2015. GOpot: an R package for visually combining expression data with functional analysis. *Bioinformatics* 31, 2912–2914. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv300>
- Waselus, M., Galvez, J.P., Valentino, R.J., Van Bockstaele, E.J., 2006. Differential projections of dorsal raphe nucleus neurons to the lateral septum and striatum. *J Chem Neuroanat* 31, 233–42. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2006.01.007>

- Wegmann, F., Ebnet, K., Du Pasquier, L., Vestweber, D., Butz, S., 2004. Endothelial adhesion molecule ESAM binds directly to the multidomain adaptor MAGI-1 and recruits it to cell contacts. *Experimental Cell Research* 300, 121–133. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.07.010>
- Williams, A.R., Kubowicz, G., Cramer, E., Schlieff, R., 1991. The effects of the microbubble suspension SH U 454 (Echovist) on ultrasound-induced cell lysis in a rotating tube exposure system. *Echocardiography* 8, 423–433. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8175.1991.tb01003.x>
- Wishart, D.S., Feunang, Y.D., Marcu, A., Guo, A.C., Liang, K., Vazquez-Fresno, R., Sajed, T., Johnson, D., Li, C., Karu, N., Sayeeda, Z., Lo, E., Assempour, N., Berjanskii, M., Singhal, S., Arndt, D., Liang, Y., Badran, H., Grant, J., Serra-Cayuela, A., Liu, Y., Mandal, R., Neveu, V., Pon, A., Knox, C., Wilson, M., Manach, C., Scalbert, A., 2018. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res* 46, D608–D617. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1089>
- Won, M., Park, K.A., Byun, H.S., Kim, Y.-R., Choi, B.L., Hong, J.H., Park, J., Seok, J.H., Lee, Y.-H., Cho, C.-H., Song, I.S., Kim, Y.K., Shen, H.-M., Hur, G.M., 2009. Protein kinase SGK1 enhances MEK/ERK complex formation through the phosphorylation of ERK2: implication for the positive regulatory role of SGK1 on the ERK function during liver regeneration. *J Hepatol* 51, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.02.027>
- Wu, H., Southam, A.D., Hines, A., Viant, M.R., 2008. High-throughput tissue extraction protocol for NMR- and MS-based metabolomics. *Analytical Biochemistry* 372, 204–212. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.10.002>
- Wu, Y., Li, L., 2016. Sample normalization methods in quantitative metabolomics. *J Chromatogr A* 1430, 80–95. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.12.007>

X

- Xu, L., Nirwane, A., Yao, Y., 2018. Basement membrane and blood–brain barrier. *Stroke Vasc Neurol* 4, 78–82. <https://doi.org/10.1136/svn-2018-000198>
- Yaffe, Y., Shepshelovitch, J., Nevo-Yassaf, I., Yehekel, A., Shmerling, H., Kwiatek, J.M., Gaus, K., Pasmanik-Chor, M., Hirschberg, K., 2012. The MARVEL transmembrane motif of occludin mediates oligomerization and targeting to the basolateral surface in epithelia. *J Cell Sci* 125, 3545–3556. <https://doi.org/10.1242/jcs.100289>

Y

- Yamamoto, M., Ramirez, S.H., Sato, S., Kiyota, T., Cerny, R.L., Kaibuchi, K., Persidsky, Y., Ikezu, T., 2008. Phosphorylation of Claudin-5 and Occludin by Rho Kinase in Brain Endothelial Cells. *Am J Pathol* 172, 521–533. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070076>
- Yang, F.Y., Chang, W.Y., Chen, J.C., Lee, L.C., Hung, Y.S., 2014. Quantitative assessment of cerebral glucose metabolic rates after blood-brain barrier disruption induced by focused ultrasound using FDG-MicroPET. *Neuroimage* 90, 93–8. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.12.033>
- Yousaf, T., Dervenoulas, G., Politis, M., 2018. Advances in MRI Methodology. *Int Rev Neurobiol* 141, 31–76. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2018.08.008>
- Yu, G., He, Q.-Y., 2016. ReactomePA: an R/Bioconductor package for reactome pathway analysis and visualization. *Mol. Biosyst.* 12, 477–479. <https://doi.org/10.1039/C5MB00663E>

Z

- Zhang, S., Hulver, M.W., McMillan, R.P., Cline, M.A., Gilbert, E.R., 2014. The pivotal role of pyruvate dehydrogenase kinases in metabolic flexibility. *Nutrition & Metabolism* 11, 10. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-11-10>
- Zhou, Y., Danbolt, N.C., 2013. GABA and Glutamate Transporters in Brain. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4, 165. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00165>



Antoine Presset

Etude des conséquences neurophysiologiques de l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique par sonoporation

Résumé :

Au cours de ces dernières années, chercheurs et cliniciens ont accordé une attention particulière à la technique innovante dite de sonoporation comme méthode non-invasive et ciblée de délivrance intracérébrale de molécules thérapeutiques. La sonoporation est un processus par lequel l'activation des microbulles par ultrasons à proximité de la barrière hématoencéphalique (BHE) augmente transitoirement sa perméabilité, et permet l'extravasation de molécules thérapeutiques dans le tissu cérébral. Bien que des études translationnelles démontrent l'efficacité de la sonoporation dans le traitement de tumeurs cérébrales, la démonstration de son innocuité n'est pas complètement établie et est soumise à de nombreuses conditions. Dans ce travail de thèse, nous émettons l'hypothèse que cette technologie pourrait moduler la neurotransmission et induire une neuroinflammation, neutralisant ainsi l'efficacité des molécules thérapeutiques, et causant des effets indésirables graves. Cette thèse a pour objectif d'étudier les conséquences neurophysiologiques de la perméabilisation de la BHE par sonoporation au cours du temps en utilisant des approches de transcriptomique, de métabolomique et d'histologie. Pour atteindre cet objectif, nous avons développé un modèle animal de la perméabilisation de la BHE du striatum par sonoporation chez le rat. Les tissus cérébraux, le liquide cébrospinal, le sérum sanguin et les urines ont été prélevés chez les animaux avant et après sonoporation. Les résultats histologiques n'ont pas montré de dommage sévère et irréversible. Les résultats de transcriptomique suggèrent l'apparition d'une réponse spécifique relative à une hypoxie transitoire et à l'activation du système immunitaire. Les résultats métabolomiques ont montré une perturbation générale des voies métaboliques dans l'ensemble des matrices biologiques explorées. Leurs cinétiques d'apparition et de résolution varient selon le compartiment biologique. L'analyse des voies métaboliques montre l'implication du métabolisme de l'arginine et de ceux qui lui sont associés. De plus, le dosage des dérivés du tryptophane suggère l'induction d'une neuroinflammation d'origine vasculaire et la déstabilisation de la neurotransmission sérotoninergique. Ce projet de thèse constitue le premier travail de mise en application de méthodes exploratoires métabolomiques dans le cadre de la détermination des conséquences métaboliques de l'ouverture de la BHE par sonoporation.

Mots clés : barrière hémato-encéphalique, sonoporation, microbulles, métabolomique, transcriptomique, neurophysiologie

Abstract:

In recent years, researchers and clinicians have paid attention to the innovative technique termed sonoporation as a non-invasive and targeted method for the intracerebral delivery of therapeutic molecules. Sonoporation is a process by which ultrasound activation of microbubbles (MB) in the vicinity of the blood-brain barrier (BBB) transiently increases its permeability and allows extravasation of therapeutics into brain tissue. Although translational studies showed the efficacy of sonoporation in the treatment of brain tumors, the demonstration of its safety is not completely proved and is conditioned by several considerations. In this work, we hypothesize that MB-assisted ultrasound could modulate neurotransmission and induce neuroinflammation, thus alleviating the efficacy of therapeutics, and causing severe adverse effects. The aim of this PhD project is to study the neurophysiological consequences of acoustically-mediated BBB opening within a short, medium, and long-term using transcriptomic (RNAseq), metabolomic and histological approaches. To achieve this goal, we developed a model of acoustically-mediated BBB opening in the rat striatum. Brain tissue, cerebrospinal fluid, blood serum, and urine were collected from animals before and after sonoporation. Histological findings did not show severe and irreversible damage. Transcriptomic results suggest the appearance of a specific response related to transient hypoxia and immune system activation. Metabolomic results showed a general disruption of metabolic pathways in all explored biological matrices. Kinetics of perturbation appearance and their resolution depend on the biological compartment. Analyses of metabolic pathways showed the involvement of arginine and arginine-associated metabolisms. Also, tryptophan derivate dosages revealed the induction of vascular-mediated neuroinflammation and disruption of serotonergic neurotransmission. This PhD project is the first application of exploratory metabolomic methods to find the metabolic consequences of acoustically-mediated BBB opening.

Keywords : blood-brain barrier, sonoporation, microbubbles, metabolomics, transcriptomics, neurophysiology