



HAL
open science

Les colloïdes magnétiques et leur utilisation biophysique dans la détection, le guidage et le suivi cellulaire in vitro et in vivo

Charlotte Riviere

► To cite this version:

Charlotte Riviere. Les colloïdes magnétiques et leur utilisation biophysique dans la détection, le guidage et le suivi cellulaire in vitro et in vivo. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2005. Français. NNT : 2005PA066244 . tel-00096699

HAL Id: tel-00096699

<https://theses.hal.science/tel-00096699>

Submitted on 19 Sep 2006

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 4.0 International License

THESE de Doctorat
de l'université Paris 6 - Pierre et Marie Curie

présentée par

Charlotte RIVIERE

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Paris 6
École doctorale Inter///Bio

**Les colloïdes magnétiques et leur utilisation
biophysique dans la détection, le guidage et le
suivi cellulaire in vitro et in vivo.**

Soutenu le 22 septembre 2005, devant le jury composé de :

| | | |
|--------------------------------------|---|-------------------------------|
| M. Olivier CLEMENT | <i>Professeur d'université et Praticien hospitalier</i> | Rapporteur |
| M. Bertrand FOURCADE | <i>Professeur de l'université Joseph Fourier</i> | Rapporteur |
| M. Jean-François JOANNY | <i>Professeur de l'université Paris 6</i> | Examineur |
| M. Jean-Louis VIOVY | <i>Directeur de recherche 1^{ère} classe CNRS, Institut Curie</i> | Examineur |
| Mme Marie-Danielle NAGEL | <i>Professeur à l'Université de Technologie de Compiègne</i> | Examineur |
| Mme Régine PERZYNSKI | <i>Professeur de l'université Paris 6</i> | Directrice de thèse |
| Invitée : Mme Florence GAZEAU | <i>Chargée de recherche 1^{ère} classe CNRS, MSC, Paris 7</i> | Co-directrice de thèse |

Je tiens tout d'abord à remercier Olivier Clément et Bertrand Fourcade d'avoir accepté d'être mes rapporteurs, ainsi que Jean-Louis Viovy, Jean-François Joanny et Marie-Danielle Nagel d'avoir bien voulu faire partie de mon jury. Un merci tout particulier à la présidente de mon jury, Marie-Danielle Nagel, qui m'a initiée à la biologie cellulaire pendant mon DEA, m'a fait découvrir le travail pluridisciplinaire et m'a incitée à continuer dans cette voie.

Je tiens également à remercier Alain Mauger de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, le LMDH.

Un grand merci à Jean-Claude Bacri, le « père » de l'équipe ferrofluides au sein duquel s'est déroulé cette thèse, toujours présents pour trouver une solution aux problèmes théoriques ou expérimentaux, et dont l'esprit bouillonnant passe allègrement du mouvement amibien à la résonance des bulles!

Je remercie tout particulièrement Régine Perzynski et Florence Gazeau, mes deux directrices de thèse. Régine, merci pour ton dynamisme et ton optimisme à tout épreuve. Florence, merci pour ton soutien aussi bien sur le plan scientifique qu'humain. Tu as su guider mes pas dans tous les projets auxquels j'ai été impliquée, et su m'apprendre à gérer et à concrétiser le travail en collaboration. Je vous remercie également toutes deux pour m'avoir accordé votre confiance et votre temps tout au long de ces trois années de thèse.

Un grand merci évidemment à Claire Wilhelm...surtout en pensant aux heures passées à essayer de dépouiller et de comprendre le mouvement de ces amibes soumises à une force magnétique...ta ténacité et ta vivacité rivalise avec ton enthousiasme débordant...Merci pour ton aide précieuse ! En fait, un grand merci à toute l'équipe « bio » des ferrofluides : les « permanentes » Florence et Claire bien sûr, mais également Jean-Paul Fortin et Pierre Smirnov, mes compagnons de bureau et de paillasse...Merci à eux deux pour m'avoir éclairé de leur lumière et pour avoir toujours été prêts à me donner un coup de main....ou à dérider l'atmosphère comme ils en ont le secret ! Je pense que j'aurais longtemps la nostalgie de nos conversations, scientifiques ou non, et de la bonne humeur générale qui régnait dans cette équipe. Merci à vous 4 pour votre amitié.

Une pensée aussi pour les autres membres de l'équipe ferrofluides : Florence Elias, Martin Devaud, Thierry Hocquet, Caroline Derec, Jean-François Berret ; ainsi que pour les membres du LI2C délocalisés à Boucicaut : Vincent Dupuis et Elie Wandersman. Merci pour les déjeuners et les pauses thés animés et les débats enflammés ! Un merci particulier à Martin pour tes conseils avisés, notamment dans la préparation de la soutenance de thèse.

J'ai également une pensée pour les anciens thésards du groupe : Valentin Leroy et Eric Janiaud. Bonne route à vous deux et j'espère que nos chemins se recroiseront.

Merci aussi à Claudine Héneaux pour ta constante disponibilité et ta connaissance des méambres administratifs de la recherche française ; ainsi qu'à Jacques Servais, Patrick Lepert et Maurice Gilbert pour leur soutien technique, mécanique et électronique dans la mise en place des dispositifs expérimentaux.

Merci enfin à François Gendron, Claude Naud et Christian Julien pour m'avoir initié et aidé dans les expériences de RPE.

Cette thèse n'aurait pu être menée sans moyens financiers ; et je tiens à remercier la DGA, qui à financer ma bourse de thèse, et m'a donc permis de me lancer dans cette grande aventure.

Je n'aurai bien évidemment pas non plus pu mener à bien cette thèse sans la forte interaction entre équipes de différentes disciplines. Je tiens donc ici à remercier toutes les personnes impliquées dans les différents projets et qui ont également contribué à la réussite de ce travail de thèse.

Merci aux chimistes du LI2C : Jacky Roger, Jean-Noël Pons, Christine Ménager, Marie-Françoise Salis et Delphine Talbot, qui ont toujours été disponibles pour préparer des ferrofluides, doser le fer ou discuter des résultats.

C'est grâce entre autre à l'aide et l'implication de Fabrice Cousin et Vincent Dupuis que les résultats sur les expériences de biréfringence et de diffusion de neutrons aux petits angles pour les endosomes magnétiques ont pu être réalisées. Je vous en remercie tous deux vivement.

Concernant le projet sur la thérapie de l'anévrisme, ce travail n'a pu aboutir que grâce à l'implication et au dynamisme de Jainping Dai, Eric Allaire, Frank Boudghène, Jean-François Deux et Didier Letourneur. Un merci particulier à Jean-François pour ton enthousiasme sans faille, à Eric Allaire pour tes conseils avisés et ton recul scientifique et à Didier Letourneur pour ton aide scientifique et également pour nos discussions sur le métier de chercheur. Merci aussi à l'équipe du CIERM de Jacques Bittoun, grâce à qui les images IRM 1,5T ont pu être faites et à l'équipe de RMN biologique de Gif-sur-Yvette, en particulier Philippe Méric et Brigitte Gillet pour les analyses ex vivo en IRM à 9,4T.

Merci à René Yiou et Constant Lecoœur pour m'avoir fait découvrir la thérapie cellulaire par injection d'explants et pour avoir rendu possible notre collaboration. Constant, merci pour ta ténacité à toute épreuve. J'espère que le marquage magnétique apportera par la suite des réponses à certaines de vos questions sur le devenir des cellules précurseurs musculaires.

Merci également à Patrick Devauchelle et Eric Rousseau, grâce à qui il a été possible d'obtenir des images IRM à 0,3T.

Un grand merci également à toute l'équipe de Lariboisière, qui m'ont fait découvrir le monde fascinant de la microcirculation cérébrale : Jacques Seylaz, Elisabeth Pinard, Yutaka Tomita, Alexi Tran Dinh et Nathalie Kubis. Merci pour votre constante disponibilité, votre bonne humeur, et votre pertinence scientifique. Merci aussi à Sylviane Lesieur et Marie-Sophie Martina, pour qui la synthèse des liposomes magnétiques et fluorescents n'a plus de secret et sans qui le guidage magnétique de magnétoliposomes n'aurait pu être testé....Merci Marie-Sophie d'avoir cru en ce modèle et en son intérêt et d'avoir trouvé le temps dans ton emploi du temps surchargé de fin de thèse de prendre une part active dans cette étude.

*Pour finir, je tiens aussi à remercier l'équipe de Parasitologie de l'institut Pasteur qui travaille sur l'amibe *Entamoeba histolytica* : Nancy Guillén, Sabrina Marion, Elisabeth Labruyère-Dadaglio et Samantha Blazquez qui m'ont ouvert les portes du monde très mystérieux de cette amibe. Un merci tout particulier à Nancy et Sabrina, pour avoir cru jusqu'au bout dans notre modèle expérimentale et pour ne pas s'être découragées devant les résultats parfois peu optimistes. Merci à toi Sabrina pour ton aide précieuse et pour avoir toujours su recentrer nos expériences sur des problématiques et des questions biologiques pertinentes.*

Merci enfin à mes parents, sœurs et amis pour leur soutien avant et pendant ces trois années de thèses. Merci d'abord à mes parents pour avoir toujours cru en moi et pour m'avoir laissé libre arbitre dans mes choix. Merci aussi à mes sœurs, Mathilde, Hélène et Camille, ainsi qu'à Dany, Laeti, Sophie, Mélanie, Hélène, Cécile et Steph pour nos fous rires partagées et à venir. Merci également à toute la troupe de mes amis insaliens et associés...en particulier Alex, Erwan, Marjorie, Sébastien, Alix, Bertrand, Hélène, Jérôme, Luc, et tous les Guillaumes...toujours présents dans les moments difficiles, malgré les kilomètres qui nous séparent souvent.

Enfin, un merci chargé d'émotions pour toi Olivier, pour ta confiance et ton soutien quotidien...et pour tout le reste ! Je te dédie ce manuscrit.

Table des matières

| | |
|---|-----------|
| TABLE DES MATIERES | 1 |
| ABREVIATIONS UTILISEES | 5 |
| RESUME | 7 |
| INTRODUCTION | 11 |
| PROBLEMATIQUE GENERALE | 11 |
| ANNONCE DU PLAN..... | 13 |
| CHAPITRE 1 DESCRIPTION DES COLLOÏDES MAGNETIQUES | 19 |
| 1.1 DEFINITION ET STABILITE DES SOLUTIONS COLLOÏDALES | 19 |
| 1.2 STRUCTURES ET PROPRIETES MAGNETIQUES..... | 20 |
| 1.2.1 <i>Différentes propriétés magnétiques rencontrées</i> | 20 |
| 1.2.2 <i>Propriétés magnétiques des particules nanométriques</i> | 22 |
| 1.3 LES PARTICULES MAGNETIQUES POUR LE BIOMEDICAL..... | 25 |
| 1.3.1 <i>Nanoparticules des bactéries magnétiques</i> | 26 |
| 1.3.2 <i>Nanoparticules magnétiques polymériques</i> | 27 |
| 1.3.3 <i>Nanoparticules magnétiques anioniques</i> | 28 |
| 1.4 LES PARTICULES UTILISEES | 29 |
| 1.4.1 <i>Les particules citratées</i> | 29 |
| 1.4.2 <i>Les particules ADMS</i> | 30 |
| 1.4.3 <i>Sinerem® de la société Guerbet</i> | 31 |
| 1.4.4 <i>Dynabeads de la société Dymal</i> | 31 |
| CHAPITRE 2 LES NANOPARTICULES COMME OUTIL DIAGNOSTIQUE IN VITRO | 34 |
| 2.1 DIFFERENTES METHODES D'IMMUNODETECTION UTILISANT DES NANOPARTICULES MAGNETIQUES | 35 |
| 2.2 PRINCIPE DE LA TECHNIQUE MAGNETO-OPTIQUE | 37 |
| 2.2.1 <i>Biréfringence des ferrofluides</i> | 37 |
| 2.2.2 <i>Relaxation de Biréfringence des ferrofluides</i> | 38 |
| 2.2.3 <i>Détermination de la relaxation de biréfringence</i> | 38 |
| 2.3 INTERACTION DES PARTICULES ANIONIQUES AVEC LA MEMBRANE CELLULAIRE..... | 40 |
| 2.4 SUIVI DE L'INTERACTION PARTICULES/CELLULES PAR METHODE MAGNETO-OPTIQUE | 42 |
| 2.4.1 <i>Sur cellules entières</i> | 43 |
| 2.4.2 <i>Sur objets biologiques isolés</i> | 44 |

| | | |
|-------------------|---|-----------|
| 2.5 | ANALYSE DE L'ORGANISATION STRUCTURALE DES PARTICULES AU COURS DES DIFFERENTES ETAPES DE L'INTERNALISATION | 48 |
| 2.5.1 | <i>Observation par microscopie électronique à transmission</i> | 48 |
| 2.5.2 | <i>Expériences de diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA)</i> | 49 |
| 2.6 | CONCLUSION | 53 |
| CHAPITRE 3 | DETECTION ET SUIVI DE CELLULES EN IRM | 59 |
| 3.1 | ENJEUX ET AVANCEES ACTUELS EN IMAGERIE CELLULAIRE..... | 60 |
| 3.1.1 | <i>La thérapie cellulaire</i> | 60 |
| 3.1.2 | <i>Imagerie cellulaire : étape de marquage cellulaire</i> | 63 |
| 3.1.3 | <i>Les différentes techniques d'imagerie cellulaire</i> | 64 |
| 3.2 | PRINCIPE DE BASE DE L'IRM | 69 |
| 3.2.1 | <i>Le phénomène de résonance magnétique nucléaire</i> | 69 |
| 3.2.2 | <i>Application d'une impulsion radiofréquence</i> | 71 |
| 3.2.3 | <i>Retour à la position d'équilibre : phénomène de relaxation</i> | 73 |
| 3.2.4 | <i>Détection du signal</i> | 76 |
| 3.2.5 | <i>Création de l'image</i> | 77 |
| 3.2.6 | <i>Séquences d'acquisition des images</i> | 77 |
| 3.3 | LES AGENTS DE CONTRASTE EN IRM..... | 81 |
| 3.3.1 | <i>Agents de contraste de type T_1</i> | 82 |
| 3.3.2 | <i>Agents de contraste de type T_2</i> | 82 |
| 3.3.3 | <i>Agents de contraste caractérisé par leur relaxivité</i> | 83 |
| 3.4 | LE MARQUAGE MAGNETIQUE | 85 |
| 3.5 | OPTIMISATION DE LA DETECTION DES CELLULES MARQUEES..... | 86 |
| 3.6 | IRON OXIDE NANOPARTICLE-LABELED RAT SMOOTH MUSCLE CELLS: CARDIAC MR IMAGING FOR CELL GRAFT MONITORING AND QUANTITATION..... | 89 |
| 3.7 | L'ANEVRISME ET LA THERAPIE PAR CELLULES MUSCULAIRES LISSES..... | 98 |
| 3.8 | MRI ASSESSMENT AND FOLLOW-UP OF IRON LABELED CELLS IN ENDOVASCULAR CELL THERAPY OF ABDOMINAL AORTIC ANEURYSM IN RAT..... | 101 |
| | <i>Abstract</i> | 101 |
| | <i>Introduction</i> | 102 |
| | <i>Materials and methods</i> | 102 |
| | <i>Results</i> | 104 |
| | <i>Discussion</i> | 107 |
| | <i>Limitations</i> | 108 |
| | <i>Conclusion</i> | 109 |
| 3.9 | MODELE D'INCONTINENCE URINAIRE | 110 |
| 3.9.1 | <i>Problématique</i> | 110 |
| 3.9.2 | <i>Démarche expérimentale</i> | 110 |
| 3.9.3 | <i>Résultats</i> | 112 |

| | | |
|-------------------|---|------------|
| 3.10 | CONCLUSION ET PERSPECTIVES..... | 117 |
| CHAPITRE 4 | GUIDAGE MAGNETIQUE <i>IN VIVO</i> | 123 |
| 4.1 | GUIDER MAGNÉTIQUEMENT LES CELLULES | 123 |
| 4.2 | GUIDER MAGNETIQUEMENT DES VECTEURS DE MEDICAMENTS..... | 124 |
| 4.3 | SYSTEMIC TARGETING OF BRAIN BY MAGNETIC DRIVING OF NANO-HYBRID CARRIERS | 126 |
| | <i>Abstract</i> | 126 |
| | <i>Introduction</i> | 127 |
| | <i>Materials and Methods</i> | 128 |
| | <i>Results</i> | 131 |
| | <i>Discussion</i> | 133 |
| | <i>Conclusion</i> | 136 |
| 4.4 | GUIDAGE MAGNETIQUE CELLULAIRE : PERSPECTIVES | 137 |
| CHAPITRE 5 | EXPLORATION DU MOUVEMENT CELLULAIRE <i>IN VITRO</i> | 141 |
| 5.1 | LA MIGRATION CELLULAIRE..... | 142 |
| 5.1.1 | <i>Le cycle de la migration</i> | 143 |
| 5.1.2 | <i>Importance de la polarisation</i> | 144 |
| 5.1.3 | <i>Les protrusions membranaires</i> | 145 |
| 5.1.4 | <i>Le gel d'actine intracellulaire : un partenaire clé pour le mouvement</i> | 146 |
| 5.1.5 | <i>Les forces mécaniques générées par la cellule</i> | 148 |
| 5.1.6 | <i>La cellule comme capteur</i> | 153 |
| 5.2 | LA MIGRATION DIRIGEE | 154 |
| 5.2.1 | <i>Rôle des signaux chimiques : chimiotaxie</i> | 155 |
| 5.2.2 | <i>Rôle des interactions mécaniques : mécanotaxie</i> | 156 |
| 5.3 | MISE EN EVIDENCE EXPERIMENTALE D'UN MECANISME DE MECANOTRANSDUCTION EN REPONSE A UNE FORCE MECANIQUE LOCALE..... | 160 |
| 5.4 | À L'ECHELLE DE LA CELLULE INDIVIDUELLE: <i>ENTAMOEB</i> A <i>HISTOLYTICA</i> COMME MODELE..... | 160 |
| 5.4.1 | <i>Introduction à Entamoeba histolytica</i> | 160 |
| 5.4.2 | <i>Intérêt du modèle</i> | 163 |
| 5.5 | PI3-KINASE SIGNALING AT THE REAR POLE OF <i>ENTAMOEB</i> A <i>HISTOLYTICA</i> REGULATES MAGNETICALLY INDUCED MECHANOTAXIS | 165 |
| | <i>Abstract</i> | 165 |
| | <i>Introduction</i> | 165 |
| | <i>Materials and Methods</i> | 167 |
| | <i>Results</i> | 170 |
| | <i>Discussion</i> | 174 |
| | <i>Conclusion</i> | 176 |
| 5.6 | CONCLUSION SUR LE MOUVEMENT A L'ECHELLE DE LA CELLULE INDIVIDUELLE | 177 |
| 5.7 | ANALYSE COMPLEMENTAIRE SUR LE MOUVEMENT DE CETTE AMIBE | 179 |
| 5.7.1 | <i>Modélisation du mouvement cellulaire</i> | 179 |

| | | |
|--|--|------------|
| 5.7.2 | <i>Résultats et interprétations de ce mouvement</i> | 180 |
| 5.8 | DE L'ECHELLE DE LA CELLULE INDIVIDUELLE A L'ECHELLE MULTICELLULAIRE..... | 183 |
| 5.9 | À L'ECHELLE D'UNE POPULATION DE CELLULES : MODELE DE L'AMIBE DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM..... | 183 |
| 5.9.1 | <i>Choix du modèle</i> | 183 |
| 5.9.2 | <i>Présentation de Dictyostelium discoideum</i> | 183 |
| 5.9.3 | <i>Démarche expérimentale</i> | 187 |
| 5.9.4 | <i>Premiers résultats</i> | 187 |
| 5.9.5 | <i>Premières interprétations</i> | 188 |
| 5.10 | CONCLUSION ET PERSPECTIVES : GUIDAGE MAGNETIQUE DE CELLULES | 191 |
| 5.10.1 | <i>Pour l'ingénierie tissulaire</i> | 191 |
| 5.10.2 | <i>Pour la thérapie cellulaire in vivo</i> | 192 |
| CONCLUSION GENERALE | | 195 |
| ANNEXE 1 : TRAITEMENT DES SPECTRES DE DNPA | | 201 |
| PRINCIPE DE LA DIFFUSION DE NEUTRONS AUX PETITS ANGLES : | | 201 |
| | <i>Suspension diluée et facteur de forme</i> | 203 |
| | <i>Suspension concentrée et facteur de structure</i> | 203 |
| PREAMBULES AU TRAITEMENT : | | 203 |
| VARIATION DE CONTRASTE | | 204 |
| | <i>Soustraction du bruit de fond incohérent</i> | 204 |
| | <i>Variation du rapport D₂O/H₂O</i> | 206 |
| NANOPARTICULES DE MAGHEMITE EN SOLUTION DILUEE..... | | 207 |
| MEMBRANES MAGNETIQUES ET ENDOSOMES MAGNETIQUES : SOUSTRACON DU BRUIT DE FOND..... | | 208 |
| MEMBRANES MAGNETIQUES ET ENDOSOMES MAGNETIQUES : SOUSTRACON DU SIGNAL COHERENT DES MEMBRANES | | 210 |
| FACTEUR DE STRUCTURE DES NANOPARTICULES MAGNETIQUES AU SEIN DES OBJETS BIOLOGIQUES | | 211 |
| ANNEXE 2 : ARCHITECTURE DE LA CELLULE ET ADHESION | | 215 |
| ROLE DE L'ADHESION DANS LA MIGRATION | | 215 |
| LES ACTEURS IMPLIQUES DANS LES DEUX PROCESSUS | | 216 |
| | <i>La matrice extracellulaire</i> | 216 |
| | <i>Les fibres protéiques</i> | 217 |
| | <i>Les molécules d'adhésion cellulaire</i> | 218 |
| | <i>Le cytosquelette</i> | 220 |
| | <i>Jonctions cellule/matrice extracellulaire : points focaux d'adhésion</i> | 223 |
| | <i>Interactions des différents partenaires</i> | 224 |
| ANNEXE 3 : MAGNETOHYDRODYNAMICS, VOL. 40 (2004), NO. 4, PP. 321–335 | | 226 |
| RÉFÉRENCES | | 241 |

Abréviations utilisées

| | |
|------------|---|
| ADMS | Acide dimercaptosuccinique. Aussi employé pour désigner les particules d'oxyde de fer anioniques chélatées par l'ADMS |
| ATP | Adénosine Triphosphate |
| CAM | Cell adhesion Molecule |
| CML | Cellules musculaires lisses |
| DAPI | Di Aminido Phenyl Indol |
| DNPA | Diffusion de Neutrons aux petits angles |
| E_a | Energie d'anisotropie magnétocristalline |
| ELISA | Enzyme Linked Immunosorbent Assay |
| FTTC | Fluoresceine isothiocyanate |
| GAG | Glycosaminoglycanes |
| GFP | Green Fluorescent Protein |
| GTP | Guanosine Tri-Phosphate |
| ICAMs | Intercellular Cell Adhesion Molecules |
| Ig | immunoglobulines |
| IRM | Imagerie par Résonance Magnétique |
| K | Energie d'anisotropie magnétique uniaxiale par unité de volume |
| k ou k_b | constante de Boltzmann (1.381×10^{-23} J/K) |
| K_s | Energie d'anisotropie magnétique uniaxiale par unité de surface |
| M | molaire (mol/L) |
| MARIA | Magnetic Relaxation ImmunoAssay |
| MEC | Matrice Extracellulaire |
| mM | millimolaire |
| MP | Magnétophorèse |
| η | viscosité |

| | |
|-------|--|
| PDMS | Poly(dimethylsiloxan) |
| PEG | polyéthylène-glycol |
| PI3K | Phosphoinositide 3-kinase |
| PIP2 | Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate |
| PIP3 | Phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate |
| PKH26 | fluorochrome qui s'incorpore dans les régions lipidiques de la membrane cellulaire |
| PMMA | Poly(methyl methacrylate) |
| PNS | Post-Nuclear-Supernatant |
| PTEN | Phosphatase and <i>TEN</i> sin homologue |
| R_1 | Vitesse de relaxation longitudinale |
| r_1 | relaxivité longitudinale |
| R_2 | Vitesse de relaxation transversale |
| r_2 | relaxivité transversale |
| RGD | séquences spécifiques des 3 acides aminés (arginine, glycine, acide aspartique), |
| RMN | Résonance Magnétique Nucléaire |
| RPE | Résonance Paramagnétique Electronique |
| SQUID | Superconducting Quantum interference Device |
| T_1 | Temps de relaxation longitudinale |
| T_2 | Temps de relaxation transversale |
| T_E | Temps d'écho |
| TEP | Tomographie par Emission de Positron |
| T_R | Temps de Répétition |
| [...] | désigne une concentration |
| 2D | Deux dimensions |
| 3D | Trois dimensions |

Résumé

Les colloïdes utilisés sont des suspensions de nanoparticules magnétiques (nanocristaux d'oxyde de fer de 10 nm) stables en solution aqueuse.

De part l'interaction de ces particules avec la membrane cellulaire, il est possible de ce que l'on appelle « marquer magnétiquement » les cellules. Les propriétés magnétiques de ces cellules ainsi marquées peuvent être utilisées dans des problématiques de thérapie cellulaire pour d'une part **détecter et suivre *in vivo* par IRM et de manière non-invasive le devenir de populations cellulaires à finalité thérapeutique implantées au sein de l'organisme**, et pour d'autre part **soumettre ces mêmes cellules à des forces magnétiques, de façon à les manipuler à distance *in vitro* et *in vivo***.

Nous avons utilisé des nanoparticules magnétiques chargées négativement en surface, qui s'adsorbent de manière aspécifique sur la membrane de la plupart des types cellulaires, conduisant à un processus spontané d'internalisation cellulaire. **Par une méthode magnéto-optique déjà utilisée par ailleurs, nous avons pu suivre les différentes étapes conduisant à l'internalisation de ces nanoparticules dans des vésicules d'endocytose tardives et caractériser l'état des particules au sein de ces objets biologiques.**

La présence des nanoparticules magnétiques confinées au sein d'endosomes magnétiques nous a ainsi permis de détecter ces mêmes cellules par IRM. Nous avons en particulier utilisé cette propriété pour marquer magnétiquement des cellules musculaires lisses dans un modèle d'anévrisme et des explants musculaires dans un modèle d'incontinence urinaire. Pour chaque modèle, l'évolution des propriétés de contraste des cellules marquées au cours du temps a été étudiée *in vitro* et après implantation *in vivo* au sein de l'animal. Ce suivi a pu être fait même trois mois après transplantation.

Ce marquage magnétique nous a également permis de soumettre les cellules à des forces magnétiques et analyser leur influence sur la migration cellulaire *in vitro* et la faisabilité d'un guidage magnétique *in vivo*.

Même si la faisabilité d'un guidage magnétique *in vivo* n'a pas pu être réalisé sur un modèle cellulaire, nous avons montré qu'il était possible de stopper des objets magnétiques dans la microcirculation cérébrale à l'aide d'aimants externes. **Nous avons en effet pu guider magnétiquement au sein de la microvasculature intracérébrale des vésicules lipidiques (liposomes) de 200 nm dans lesquelles ont été encapsulées des nanoparticules magnétiques.** Ce résultat est également intéressant en tant que tel, puisque de tels magnétoliposomes peuvent être utilisés comme vecteurs de médicaments. Le guidage magnétique pourrait ainsi permettre d'augmenter la dose médicamenteuse présente dans des zones par ailleurs peu accessibles tels que le cerveau. Le développement de ce type de méthodes apparaît ainsi comme une approche non-invasive prometteuse pour le traitement de tumeurs cérébrales, mais également de certaines maladies neurodégénératives.

En parallèle aux essais de faisabilité de guidage magnétique *in vivo*, nous avons également mené **des études *in vitro* permettant de mieux comprendre et d'analyser la réponse cellulaire à une force magnétique, notamment en terme de migration cellulaire.** Nous avons mis au point une méthode de micromanipulation permettant l'application de forces magnétiques locales. Notre modèle d'étude est l'amibe *Entamoeba histolytica*, parasite motile responsable de l'amibiase intestinale. Sur ce modèle, nous avons mis en évidence des réponses cellulaires différentes en terme de migration et de polarisation en fonction du point d'application de la force et démontré le rôle d'une mécanotransduction dans la réponse cellulaire à ce stimulus mécanique.

Au vu de ces différents résultats, il apparaît donc clairement que l'utilisation astucieuse des propriétés de ces nanoparticules magnétiques ouvrent de nouvelles possibilités aussi bien pour la visualisation de thérapies cellulaires, que pour le traitement local de zones très peu accessibles, mais également pour des études plus fondamentales sur les relations entre migration cellulaire et stress mécanique *in vitro* et *in vivo*.

Introduction générale

Introduction

Problématique générale

Ce manuscrit présente l'utilisation de colloïdes magnétiques, c'est-à-dire de **suspensions de particules magnétiques, pour la détection, le guidage et le suivi cellulaire dans des applications *in vitro*, mais également *in vivo***. Le but de cette thèse était d'analyser, par une approche biophysique, l'intérêt de particules magnétiques pour les sciences de la vie, aussi bien d'un point de vue fondamental, que pour des applications pré-cliniques. Les différentes études présentées se rassemblent autour d'un centre d'intérêt commun : **le contrôle de la localisation et du mouvement cellulaire**.

Cette problématique rentre dans le cadre de l'ingénierie tissulaire et cellulaire ou encore de la thérapie cellulaire (Melo et al., 2004; Savitz et al., 2004). Le développement de thérapies fondées sur l'action des cellules elles-mêmes nécessite en effet une compréhension de l'architecture et de la communication intracellulaire, cellulaire et tissulaire. Ces aspects affectent à différentes échelles de nombreux processus physiologiques, incluant le développement et la maintenance des tissus, l'angiogenèse¹, la cicatrisation des plaies ou encore la dissémination des métastases, la lutte contre l'invasion parasitaire et la mise en place de la réponse immunitaire. Dans ce contexte, une des questions clés est de savoir comment les cellules communiquent entre elles et avec leur environnement et comment l'environnement influe sur la réponse cellulaire. La recherche sur l'organisation cellulaire et tissulaire est assez ancienne et nous savons aujourd'hui que la cellule est capable d'intégrer des informations de différentes natures : biochimiques (Dormann and Weijer, 2003 ; Van Haastert and Devreotes, 2004), topographiques (Dalby, 2005) ou mécaniques (Curtis, 2005; Huang et al., 2004).

L'essentiel de la communication intercellulaire est la libération et la capture de molécules biochimiques. À la réception du signal biochimique, la cellule pourra déclencher une migration dirigée (chimiotaxie), mais également une sécrétion de molécules de signalisation (facteurs d'inflammation, facteurs de croissance par exemple) voire même une différenciation cellulaire.

¹ L'angiogenèse est un processus actif et complexe qui permet la formation de nouveaux capillaires sanguins à partir de vaisseaux sanguins existants.

Ainsi, une des grandes avancées de la thérapie cellulaire actuelle a été de tirer partie des propriétés chimiotactiques des cellules.

Le suivi *in situ* de l'efficacité de ces thérapies cellulaires a nécessité en parallèle la mise au point de nouvelles techniques d'imagerie cellulaire non invasive. De nombreuses stratégies pour arriver à une imagerie cellulaire *in vivo* chez l'animal vivant, alliant résolution et sensibilité, se sont développées (Weissleder and Mahmood, 2001). Les méthodes d'imagerie les plus utilisées actuellement sont l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), les techniques optiques et la scintigraphie. Ce sont les deux premières méthodes qui ont été employées dans le cadre de cette thèse.

Même si une grande partie de la recherche en thérapie cellulaire est fondée sur la découverte des facteurs chimiotactiques, le rôle de la topographie (Weiss, 1934; Weiss, 1945) et des contraintes mécaniques (Belousov et al., 1975; Curtis and Seehar, 1978) dans l'organisation cellulaire, s'est depuis plusieurs décennies également avéré fondamental (Schwarz and Bischofs, 2005). L'arrivée des nanotechnologies dans les sciences de la vie a permis de préciser la sensibilité de la cellule pour ces stimuli mécaniques et topographiques. Les nanotechnologies permettent en effet de contrôler l'architecture cellulaire et intracellulaire, soit en jouant sur la nanotopographie (Curtis and Wilkinson, 2001), soit en jouant sur les forces mécaniques appliquées à la cellule (Chen et al., 2004; Huang et al., 2004).

Dans le cadre de cette thèse, le contrôle du mouvement cellulaire a été étudié soit grâce à l'action synergique des molécules chimiotactiques et du microenvironnement cellulaire *in vivo*, soit grâce à l'application d'une force magnétique, via des particules magnétiques au sein de la cellule.

Notre paramètre de contrôle cellulaire est le marquage magnétique pour obtenir une « cellule magnétique ». On peut ensuite soit les détecter par IRM, soit les soumettre à des forces magnétiques. La première étape de ce travail est donc centrée sur l'interaction particules magnétiques/cellules. La quantité de particules nécessaire ainsi que leur localisation au sein de la cellule variant d'une application à l'autre, il a fallu s'adapter à la problématique et au système cellulaire pour moduler l'interaction particules/cellules.

Pour optimiser leur détection par IRM à long terme, il est nécessaire de comprendre comment ces particules vont se répartir après plusieurs divisions cellulaires et de moduler le marquage magnétique en conséquence. Cette optimisation passe également par une compréhension des propriétés magnétiques des complexes particuliers formés au sein de la cellule, responsables du contraste en IRM.

De même, pour contrôler la force magnétique appliquée au corps cellulaire, la cellule doit posséder des propriétés magnétiques bien définies spatialement. Pour influencer la migration cellulaire *in vitro* et *in vivo*, il est de plus nécessaire de connaître le système dans son ensemble, à savoir l'architecture interne de la cellule, mais également les forces d'interactions qu'elle a avec son environnement.

Cette thèse s'inscrit dans le contexte pluridisciplinaire des nanotechnologies dans la recherche biomédicale et n'aurait bien évidemment pas pu être menée à bien sans une forte interaction avec des équipes de différentes disciplines. Les résultats présentés ici ne sont donc pas issus de mon seul travail, mais d'une collaboration dynamique avec des physiciens, chimistes, pharmaciens, biologistes, radiologues et chirurgiens. La réussite de ces projets est le résultat de la mise en commun de nos compétences respectives.

Les résultats de cette thèse sont présentés dans cinq chapitres différents, la plupart en grande partie exposés sous forme d'article publié ou en cours de publication. Étant donné la différence de problématique d'une application à l'autre, une introduction permettant la compréhension des enjeux et des résultats est faite pour chaque partie. Du fait du contexte interdisciplinaire, ces introductions se veulent dans la mesure du possible « pédagogiques » de façon à rendre la biologie accessible aux physiciens et chimistes et la physique accessible aux biologistes et médecins.

Annonce du plan

Les colloïdes utilisés ici sont des nanoparticules magnétiques (des nanocristaux d'oxyde de fer de diamètre de l'ordre de 10 nm) portant des charges négatives et dispersées en solution aqueuse. **Le premier chapitre de ce manuscrit présente les propriétés magnétiques et physico-chimiques des différentes solutions colloïdales magnétiques utilisées dans le cadre de cette thèse, en mettant l'accent sur les propriétés ayant un intérêt particulier pour les applications biomédicales.**

Les nanoparticules chargées négativement en surface s'adsorbent de manière aspécifique sur la membrane plasmique de la plupart des types cellulaires, conduisant à un processus spontané d'internalisation cellulaire (Wilhelm et al., 2003a; Wilhelm et al., 2002a). De cette façon, **il est possible de « marquer magnétiquement » des compartiments intracellulaires.**

En utilisant les propriétés optiques et magnétiques de ces marqueurs cellulaires, nous avons montré qu'il était possible de détecter sur cellules vivantes leur présence sur la membrane

plasmique ou au sein de vésicules intracellulaires. La méthode utilisée est une méthode magnéto-optique dont la capacité à détecter l'accrochage d'effecteurs biologiques sur la surface des particules a déjà été démontrée (Wilhelm et al., 2002b). Nous avons ici testé si cette méthode pouvait être utilisée pour développer un test diagnostique d'immunodétection sur cellules vivantes.

D'autre part, puisque les nanoparticules ne sont pas utilisées ici à l'état dispersé mais internalisées au sein de vésicules intracellulaires, en complément des informations dynamiques obtenues par la méthode magnéto-optique, nous avons également analysé la structure des nanoparticules dans ces « objets biologiques » par des observations par microscopie électronique et des expériences de diffusion de neutrons aux petits angles.

Le deuxième chapitre de cette thèse expose donc d'une part les premiers résultats de l'utilisation de la méthode magnéto-optique pour l'immunodétection sur cellules vivantes et d'autre part l'analyse des propriétés dynamiques et structurales de ces nouveaux « objets biologiques magnétiques » qui vont ensuite être utilisés tout au long de ce manuscrit.

En effet, l'une des applications majeures des nanoparticules magnétiques est leur utilisation en tant que marqueurs intracellulaires pour suivre *in vivo* par IRM et de manière non-invasive des cellules à finalité thérapeutique implantées au sein de l'organisme. Nous nous concentrons dans le troisième chapitre de cette thèse sur ce domaine d'application prometteur, par une étude de faisabilité d'imagerie cellulaire par IRM sur deux modèles de thérapie cellulaire.

Pour la thérapie cellulaire d'anévrisme, nous avons marqué magnétiquement des cellules musculaires lisses d'aorte de rat, et étudié l'évolution de leurs propriétés de contraste IRM au cours du temps *in vitro* et après implantation *in vivo* au sein d'un anévrisme d'aorte abdominal. Dans le cadre de la thérapie cellulaire de l'incontinence urinaire, nous avons également optimisé le marquage d'explants musculaires et pu détecter et suivre leur implantation dans l'urètre de truie. Dans les deux cas, nous démontrons l'intérêt de ces nanoparticules comme marqueurs intracellulaires pour le suivi longitudinal, au sein du même organisme, de la thérapie cellulaire par IRM.

Un second intérêt de ce type de marquage cellulaire est qu'il devient également possible d'utiliser les propriétés magnétiques des cellules pour les guider magnétiquement au sein

de l'organisme : ceci fera l'objet du quatrième chapitre de cette thèse. Nous avons ainsi pu guider magnétiquement au sein de la microvasculature intracérébrale, non pas des cellules, mais des vésicules lipidiques (liposomes) de 200 nm dans lesquelles ont été encapsulées des nanoparticules magnétiques. L'utilisation de tels magnétoliposomes comme vecteurs de médicaments et même de gènes apparaît comme une méthode thérapeutique non-invasive prometteuse pour le traitement des tumeurs cérébrales, et plus généralement de certaines maladies neurodégénératives.

En revanche, le guidage de cellules magnétiques *in vivo* est beaucoup plus complexe car il faut alors tenir compte des interactions des cellules avec leur environnement *in vivo*. Nous n'avons pas réussi dans le cadre de cette thèse à comprendre de façon suffisante ces interactions pour guider magnétiquement les cellules. Nous avons alors décidé de mener en parallèle **des études *in vitro* permettant de mieux comprendre et d'analyser la réponse cellulaire à une force magnétique, notamment en terme de migration cellulaire. L'importance et la complexité de la migration cellulaire ainsi que les différents résultats obtenus seront exposés dans le cinquième et dernier chapitre de la thèse.**

Nous avons mis au point une méthode de micromanipulation permettant l'application de forces magnétiques locales. Notre modèle d'étude est l'amibe *Entamoeba histolytica*, parasite motile responsable de l'amibiase intestinale. Sur ce modèle, nous avons mis en évidence des réponses cellulaires différentes en terme de migration et de polarisation en fonction du point d'application de la force: des forces intracellulaires de l'ordre de 50 pN ne modifient pas la migration de l'amibe. En revanche, **l'application d'une force du même ordre de grandeur au pôle arrière de la cellule induit un mouvement dirigé dans la direction opposée à cette force.** Nous avons enfin pu démontrer le rôle d'une mécanotransduction dans la réponse cellulaire à ce stimulus mécanique.

Au vu de ces différents résultats, il apparaît donc clairement que l'utilisation astucieuse des propriétés des particules magnétiques ouvre de nouvelles possibilités thérapeutiques, aussi bien pour le suivi de thérapies cellulaires, mais également pour le traitement local de zones très peu accessibles par ailleurs telles que le cerveau. D'un point de vue plus fondamental, le marquage magnétique peut également nous permettre de mieux comprendre les relations entre migration cellulaire et stress mécanique, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, connaissance primordiale dans de nombreux processus physiologiques.

Chapitre 1 :

Description des colloïdes magnétiques

| | | |
|-------|---|-----------|
| 1.1 | DEFINITION ET STABILITE DES SOLUTIONS COLLOÏDALES | 19 |
| 1.2 | STRUCTURES ET PROPRIETES MAGNETIQUES..... | 20 |
| 1.2.1 | <i>Différentes propriétés magnétiques rencontrées</i> | <i>20</i> |
| 1.2.2 | <i>Propriétés magnétiques des particules nanométriques.....</i> | <i>22</i> |
| 1.3 | LES PARTICULES MAGNETIQUES POUR LE BIOMEDICAL..... | 25 |
| 1.3.1 | <i>Nanoparticules des bactéries magnétiques.....</i> | <i>26</i> |
| 1.3.2 | <i>Nanoparticules magnétiques polymériques.....</i> | <i>27</i> |
| 1.3.3 | <i>Nanoparticules magnétiques anioniques.....</i> | <i>28</i> |
| 1.4 | LES PARTICULES UTILISEES..... | 29 |
| 1.4.1 | <i>Les particules citratées</i> | <i>29</i> |
| 1.4.2 | <i>Les particules ADMS</i> | <i>30</i> |
| 1.4.3 | <i>Sinerem[®] de la société Guerbet.....</i> | <i>31</i> |
| 1.4.4 | <i>Dynabeads de la société Dynal.....</i> | <i>31</i> |

Chapitre 1

Description des colloïdes magnétiques

1.1 Définition et Stabilité des solutions colloïdales

Les colloïdes sont formés de particules de petite taille dispersées dans un solvant. Pour qu'elles soient considérées comme un système colloïdal, la taille des particules doit être comprise entre 1 nm et quelques μm . La taille maximale définissant le domaine des colloïdes est assez arbitraire et est généralement définie entre 1 et 10 μm . Comme nous le verrons par la suite, toutes les particules que nous avons utilisées peuvent donc rentrer dans la classe des colloïdes.

La stabilité des solutions colloïdales nanométriques va être régie par différents niveaux d'interactions attractives et répulsives entre les objets colloïdaux. On trouve tout d'abord les **interactions de Van der Waals**, forces attractives très fortes à courte distance entre objets de même nature. Ces forces sont d'autant plus importantes que la taille des particules est élevée. Viennent ensuite les **interactions électrostatiques**, qui sont soit attractives entre éléments de charges opposées, soit répulsives entre éléments de même charge. Un dernier type d'interactions entre particules sont les répulsions par effet stérique.

Pour des solutions de nanoparticules magnétiques, viennent s'ajouter les interactions dipolaires magnétiques, globalement attractives. Suivant le moment magnétique des nanoparticules, ces interactions seront soit négligeables devant les interactions de Van der Waals (diamètre $< 7\text{nm}$), soit comparables aux interactions de Van der Waals (diamètre proche de 10 nm) (Hasmonay, 1998).

Pour assurer la stabilité colloïdale, il est évidemment nécessaire que les forces répulsives soient supérieures aux forces attractives. La stabilité de la solution est donc assurée soit par des interactions électrostatiques répulsives, soit par des répulsions stériques. Ces interactions doivent surpasser les interactions de Van der Waals et les interactions magnétiques dipolaires. Dans le cas contraire, les particules de la solution colloïdale peuvent s'agréger, pouvant conduire au final à la floculation de la solution colloïdale. Cette stabilité va donc dépendre du pH, de la

force ionique, de la nature des ions présents en solution, mais également de la nature et de la quantité de ligands fixés à la surface des particules.

1.2 Structures et propriétés magnétiques²

1.2.1 Différentes propriétés magnétiques rencontrées

Le magnétisme est une des propriétés fondamentales de la matière. Ces propriétés magnétiques ont principalement deux origines : (1) les mouvements des protons des noyaux (magnétisme nucléaire), (2) les électrons qui gravitent autour (magnétisme électronique).

La rotation des électrons autour du noyau est appelée moment cinétique orbital (ou spin électronique) et la rotation du noyau autour de lui-même est appelée moment cinétique intrinsèque (ou spin nucléaire). C'est la rotation des électrons et des protons qui va provoquer l'apparition d'un moment magnétique électronique ou nucléaire respectivement.

Il existe également une troisième origine pour le moment magnétique d'un atome libre : la variation du moment orbital créée par l'application d'un champ magnétique.

Le moment magnétique nucléaire et le moment magnétique électronique sont responsables du **comportement paramagnétique**, alors que **la perturbation du moment orbital par un champ magnétique extérieur** donne lieu à un **comportement diamagnétique**.

Le comportement diamagnétique est commun à toutes les substances, bien que masqué dans la plupart des cas par l'effet paramagnétique. Le paramagnétisme électronique est 100 à 1000 fois plus important que le paramagnétisme nucléaire. C'est pourquoi, lorsque l'on parle de « matériaux magnétiques », on se réfère souvent au paramagnétisme électronique. **En IRM**, comme nous le verrons dans le chapitre 3, **c'est le paramagnétisme nucléaire qui est utilisé**.

Paramagnétisme nucléaire et Diamagnétisme

Dans les matériaux paramagnétiques, en l'absence d'un champ magnétique, **les différents moments magnétiques électroniques ou nucléaires** présents dans le matériau sont **distribués de façon aléatoire** et il n'en résulte **aucune aimantation macroscopique**.

² D'après :

Dormann, J. L. and Fiorani, D. (1991). Magnetic properties of fine particles.
Cullity. (1972). Introduction to magnetic material.
Kittel, C. (1983). Physique de l'état solide: Dumod Université.
Alaux, A. (1992). L'image par résonance magnétique: Sauramps Medical.

En présence d'un champ magnétique H , les différents moments magnétiques électroniques ou nucléaires vont s'orienter parallèlement au champ magnétique. Il en résulte dans le matériau, une aimantation macroscopique notée M .

Les matériaux diamagnétiques ne présentent aucun moment magnétique en l'absence de champ et l'aimantation est induite par l'application d'un champ magnétique, dans la direction opposée au champ.

Dans les deux cas, l'aimantation est proportionnelle à l'intensité du champ magnétique. Le coefficient de proportionnalité, noté χ , définit la susceptibilité magnétique du matériau considéré :

$$\vec{M} = \chi \vec{H} \quad \text{Eq1.1}$$

La susceptibilité des matériaux paramagnétiques est faible ($\chi \sim 10^{-5}$) et positive. La susceptibilité des matériaux diamagnétiques est négative et encore plus faible.

Ferromagnétisme, Antiferromagnétisme et ferrimagnétisme

Certains matériaux ont des propriétés magnétiques plus importantes : c'est les cas des matériaux ferromagnétiques et ferrimagnétiques, qui ont une susceptibilité bien plus grande que les matériaux para- et diamagnétiques ($\chi \sim 50$ à $10\,000$).

Dans ces matériaux, la répartition des différents ions (par exemple Fe^{3+} et Fe^{2+} pour la maghémite) conduit à l'obtention de **propriétés magnétiques coopératives**. Des interactions dites d'échanges tendent à aligner parallèlement entre eux les spins électroniques voisins. Les propriétés magnétiques du matériau dépendent de leur structure cristalline. Les spins électroniques forment des domaines au sein desquels ils sont tous alignés, délimités parce que l'on appelle des parois de Bloch³. **Chaque domaine porte ainsi un moment magnétique électronique**, résultant de l'orientation des spins. Ce moment magnétique est orienté à l'équilibre dans la direction dite de facile aimantation, dont la définition sera donnée dans le paragraphe suivant. L'ensemble des domaines est assemblé au sein du matériau de façon à minimiser l'énergie du cristal.

Les moments magnétiques des différents domaines des substances ferromagnétiques vont s'aligner dans la direction du champ magnétique (Figure 1) pour atteindre une aimantation à

³ Une paroi de Bloch dans un cristal est la couche de transition qui sépare des domaines adjacents aimantés dans des directions différentes.

saturation importante. En l'absence de champ magnétique, le matériau conserve une aimantation appelée aimantation rémanente.

Les moments magnétiques des différents domaines des matériaux antiferromagnétiques tendent quant à eux à s'aligner antiparallèlement les uns par rapport aux autres (Figure 1). L'aimantation macroscopique est donc nulle.

Les matériaux ferrimagnétiques ont une organisation proche des matériaux antiferromagnétiques, mais les moments magnétiques de chaque sous-réseau n'ont pas la même importance et globalement, le cristal possède une aimantation macroscopique. **La maghémite** par exemple, qui possède à la fois des ions Fe^{2+} et Fe^{3+} , est un composé ferrimagnétique.

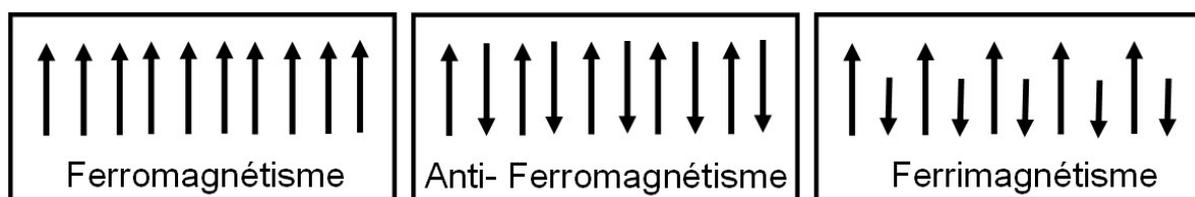


Figure 1.

Différentes propriétés magnétiques coopératives : orientation des moments magnétiques dans les matériaux ferromagnétiques, anti-ferromagnétiques et ferrimagnétiques.

1.2.2 Propriétés magnétiques des particules nanométriques

À l'échelle nanométrique, les propriétés physiques (en particulier magnétiques) et chimiques des particules vont différer radicalement des propriétés du matériau massif, principalement en raison du rapport surface/volume élevé.

Monodomaines magnétiques

Pour des particules nanométriques suffisamment petites (de l'ordre de 20 nm pour l'oxyde de fer), il est énergétiquement favorable (taille des particules proche de la taille des parois de Bloch) de ne former qu'un seul domaine magnétique. Chaque particule possède donc un moment magnétique permanent :

$$\mu = m_s V \quad \text{Eq1.2}$$

où m_s est l'aimantation à saturation du matériau massif et V , le volume de la particule. Compte tenu du nombre de magnétons de Bohr⁴ μ_B par maille de ferrite, le moment magnétique μ d'une particule de 10 nm est très important (de l'ordre de $10^4 \mu_B$).

⁴ Le magnéton de Bohr μ_B est égal au moment magnétique de spin d'un électron libre.

Anisotropie magnétique

Dans les matériaux cristallins, l'aimantation s'oriente à l'équilibre selon des directions cristallographiques privilégiées, énergétiquement plus favorables, dites directions de facile aimantation. Pour passer d'une direction de facile aimantation à l'autre, une énergie de barrière, l'énergie d'anisotropie magnétocristalline E_a doit être fournie.

Lorsque l'anisotropie magnétocristalline peut être modélisée comme uniaxe, elle est représentée par l'énergie :

$$E_a = KV \sin^2\theta \quad \text{Eq.1.3}$$

Où K est l'énergie d'anisotropie magnétique uniaxiale par unité de volume et θ est l'angle entre le moment magnétique et l'axe de facile aimantation du matériau. L'anisotropie magnétocristalline est alors spécifique du matériau et est indépendante de la forme de la particule.

Pour des particules nanométriques, d'autres types d'anisotropie peuvent se rajouter à l'anisotropie magnétocristalline : des anisotropies de surface et de forme, si la nanoparticule n'est pas parfaitement sphérique. Dans le cas des particules utilisées ici, l'anisotropie prédominante est uniaxiale et d'origine surfacique (Gazeau et al., 1998)

$$E_a = K_s S \sin^2\theta \quad \text{Eq.1.4}$$

Où K_s est l'énergie d'anisotropie magnétique uniaxiale par unité de surface ($K_s = 2.7 \times 10^{-2}$ erg/cm² à 3.5 K) et S la surface des nanoparticules.

Superparamagnetisme des grains

Si la taille des particules magnétiques est suffisamment faible, les particules deviennent « superparamagnétiques ». Leur taille est si petite que l'énergie d'anisotropie diminue dramatiquement et peut être inférieure à l'énergie des fluctuations thermiques (kT). Dans ce cas et en l'absence de champ magnétique, les fluctuations thermiques peuvent dépasser la barrière d'anisotropie et le moment magnétique fluctue spontanément à l'intérieur du grain, conduisant à une aimantation nulle en moyenne dans le temps.

A l'inverse, si l'énergie d'anisotropie des grains est grande devant kT , le moment magnétique est bloqué à l'intérieur du grain dans la direction de facile aimantation.

Paramagnétisme géant des solutions de nanoparticules

Du fait de leur petite taille, les nanoparticules employées ici peuvent être dispersées dans un liquide pour former une solution colloïdale. L'agitation thermique et des interactions répulsives suffisantes leur permettent de rester en suspension stable en milieu aqueux. **Les degrés de**

liberté de rotation des nanoparticules conduisent à un comportement paramagnétique des solutions. Les moments magnétiques des nanoparticules, distribués au hasard et fluctuant soit dans le grain ($E_a \ll kT$), soit avec le grain ($E_a \gg kT$), conduisent à une **aimantation nulle en l'absence de champ magnétique.**

En présence d'un champ magnétique, le champ va avoir tendance à aligner les moments magnétiques de chaque particule, en limitant les fluctuations des moments magnétiques, ce qui conduit à une aimantation globale de la solution. Cette aimantation augmente avec le champ magnétique, jusqu'à atteindre une aimantation à saturation, lorsque tous les moments magnétiques sont parfaitement orientés dans la direction du champ. **L'aimantation à saturation est bien plus importante** que pour des matériaux paramagnétiques massiques, d'où le nom de **paramagnétisme géant.**

Relaxation des moments magnétiques

Lorsque l'on coupe le champ magnétique, les moments magnétiques des particules superparamagnétiques vont donc relaxer vers des directions aléatoires. Le mécanisme de relaxation va dépendre de l'anisotropie magnétique et de la température. Dans un liquide où les particules sont libres de tourner sur elles-mêmes (dues aux fluctuations d'orientation des grains) il existe en fait deux mécanismes de relaxation du moment magnétique :

(1) La relaxation brownienne du grain dans son ensemble, caractérisée par un temps de relaxation τ_B , où

$$\tau_B = \frac{3\eta V_H}{kT} \quad \text{Eq1.4}$$

avec V_H , le volume hydrodynamique de la particule, η la viscosité du fluide porteur et kT , l'énergie thermique définie précédemment. Typiquement τ_B est de l'ordre de 10^{-6} s pour des particules de 10 nm dispersées dans l'eau.

(2) La relaxation de Néel du moment magnétique dans sa matrice cristalline, caractérisée par un temps de relaxation τ_N , où

$$\tau_N = \tau_0 \exp\left(\frac{E_a}{kT}\right) \quad \text{Eq1.5}$$

avec E_a , l'énergie d'anisotropie et τ_0 le temps caractéristique de la relaxation, de l'ordre de 10^{-9} s.

Ces deux processus de relaxation (qui dépendent différemment de la taille des particules), peuvent coexister dans un liquide magnétique. Le processus de relaxation dominant est celui qui

est le plus rapide. Si $\tau_N \ll \tau_B$, c'est la relaxation de Néel qui domine, alors que si $\tau_N \gg \tau_B$, c'est la relaxation brownienne qui prend le dessus.

1.3 Les particules magnétiques pour le biomédical

Plusieurs points des propriétés des nanoparticules magnétiques offrent des possibilités très attrayantes pour la médecine.

Premièrement, leur taille nanométrique les place dans l'ordre de grandeur des dimensions cellulaires (10-100 μm) et protéiques (5-50 nm). Elles peuvent donc facilement interagir avec ces éléments biologiques, sans altérer leurs fonctions. Leur taille leur permet également d'avoir un rapport surface sur volume très important : il est alors possible de fonctionnaliser ces particules avec une quantité importante de marqueurs biologiques. Ce point est particulièrement intéressant dans les applications impliquant une détection spécifique d'un ligand. Par exemple, si l'on fonctionnalise les particules avec un anticorps, on pourra alors détecter spécifiquement les cellules présentant en surface l'antigène complémentaire (par l'intermédiaire d'un processus de reconnaissance anticorps-antigène).

Deuxièmement, les propriétés magnétiques de ces particules peuvent être mises à profit pour manipuler ces objets à distance. De nombreuses applications des particules magnétiques pour le tri cellulaire et l'immunodétection ont vu le jour ces dernières années. Quelques unes seront d'ailleurs décrites dans le chapitre 2. *In vivo*, l'association des ces particules magnétiques avec des entités biologiques peut permettre de détecter et suivre une population cellulaire ou un type de protéines par IRM (voir chapitre 3), mais peut également permettre de guider magnétiquement ces même entités biologiques « marquées » magnétiquement vers une zone donnée de l'organisme. Ce procédé peut permettre par exemple de délivrer plus sélectivement des thérapies anticancéreuses ou cellulaires (voir chapitre 4).

Enfin, une autre propriété magnétique intéressante est la capacité de ces particules à générer localement de la chaleur, sous l'application d'un champ magnétique alternatif. Cette propriété, qui sera évoquée dans le chapitre 4, permet d'utiliser ces particules comme nanosources de chaleur dans un traitement anticancéreux appelé hyperthermie. L'élévation de température provoque alors la mort des cellules cancéreuses.

1.3.1 Nanoparticules des bactéries magnétiques

Un exemple intéressant de nanoparticules magnétiques d'origine « biologique » est celles que l'on trouve au sein des bactéries magnétiques (revue : (Schuler and Frankel, 1999)). Ces bactéries aquatiques s'orientent et migrent le long des lignes du champ magnétique terrestre. Ces bactéries se comportent comme des dipôles magnétiques permanent auto-propulsés. Ces dipôles magnétiques permanent sont dus à des particules magnétiques monodomaines intracellulaires synthétisés par la bactérie, connues sous le nom de magnétosomes (Figure 2).

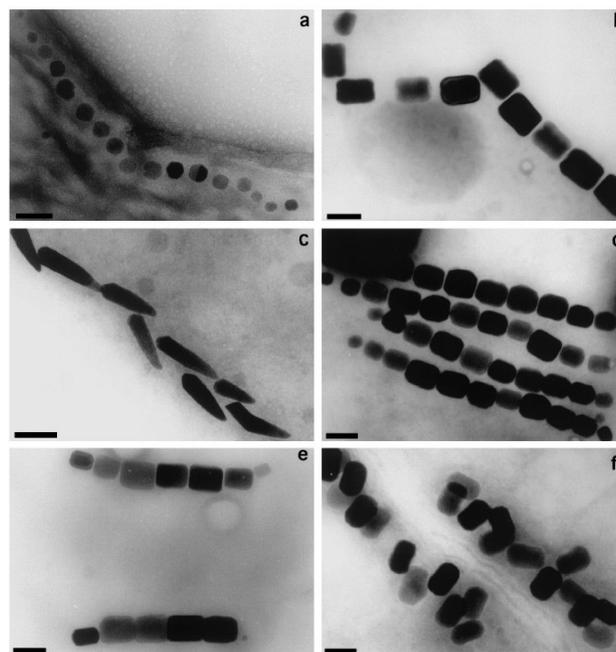


Figure 2

Clichés de microscopie électronique de la morphologie et de l'organisation intracellulaire des magnétosomes trouvés dans différentes bactéries magnétiques. Barre = 100 nm. D'après (Schuler and Frankel, 1999).

Les magnétosomes de la plupart des bactéries magnétiques qui ont été étudiées sont composés de cristaux de magnetite Fe_3O_4 de 35 à 120 nm. Ils restent dans la gamme d'existence d'un monodomaine magnétique pour la magnetite.

De part leurs propriétés magnétiques et cristallines uniques, leur très grande monodispersité, et la présence naturelle d'une membrane biologique isolant la particule de son environnement, ces magnétosomes isolés et purifiés deviennent des particules biologiques intéressantes dans de nombreuses applications dans le domaine biomédical. Ils ont par exemple été employés pour la séparation et la quantification d'anticorps. Ils pourraient également s'avérer des agents de contrastes IRM intéressants (Herborn et al., 2003).

1.3.2 Nanoparticules magnétiques polymériques

Les particules magnétiques synthétisées chimiquement les plus « classiques » sont composées d'un cœur magnétique, recouvert d'un polymère biocompatible qui permet (1) d'assurer la biocompatibilité des particules et de conserver leur stabilité dans des environnements très différents et (2) de fonctionnaliser, c'est-à-dire de coupler ces particules à un effecteur biologique (protéines ou anticorps) par l'intermédiaire le plus souvent de groupements carboxyles. Les polymères les plus utilisés pour les applications *in vivo* sont le dextran et le PVA (Polyvinyl Alcohol). Les particules Sinerem[®] commercialisées par la société Guerbet (que nous avons utilisées à titre de comparaison avec les nanoparticules magnétiques anioniques dans le chapitre 3 sur l'IRM cellulaire) font partie de cette catégorie. Pour des applications *in vitro*, le polystyrène reste le polymère de base pour la fabrication de latex magnétiques calibrés et présentant une forte aimantation à saturation.

De nouveaux types de polymères pour l'enrobage de magnétite ou de maghémite se sont ensuite développés tels que des polymères biodégradables (Arias et al., 2001; Gomez-Lopera et al., 2001) ou des polymères hydrophiles thermosensibles (Deng et al., 2003). Ces matériaux « intelligents » peuvent permettre un contrôle plus fin de la quantité et de la conformation des protéines adsorbées (en jouant sur le degré d'hydrophobie) ainsi que de la cinétique de libération des principes actifs.

Au lieu d'enrober la particule magnétique par un polymère, il est également possible d'utiliser une matrice poreuse, dans laquelle les particules magnétiques sont précipitées. Ceci permet d'avoir des particules extrêmement bien calibrées et présentant une fraction volumique en nanoparticules magnétiques importantes (et donc une forte aimantation à saturation). Les particules utilisées dans le chapitre 5 de cette thèse, pour l'étude de la migration cellulaire font partie de cette catégorie.

Récemment des enrobages inorganiques comme la silice ont également été développés pour le guidage magnétique de médicaments (Gruttner and Teller, 1999).

Les magnétoliposomes, sont d'autres objets nanométriques magnétiques particulièrement prometteurs. Ils sont constitués d'une double couche lipidique délimitant un espace intérieur où est encapsulée une solution aqueuse de nanoparticules magnétiques. Puisque l'on peut également y encapsuler des agents thérapeutiques tels que des anticancéreux, ces magnétoliposomes constituent des vecteurs de médicaments intéressants. Leur utilisation pour le guidage magnétique sera détaillée dans le chapitre 4.

1.3.3 Nanoparticules magnétiques anioniques

Un ferrofluide n'est autre qu'une suspension colloïdale de nanoparticules magnétiques. C'est un liquide magnétique (d'où le nom ferrofluide) capable d'être déplacé ou déformé sous l'action d'un champ magnétique ou d'un gradient de champ magnétique (Figure 3).

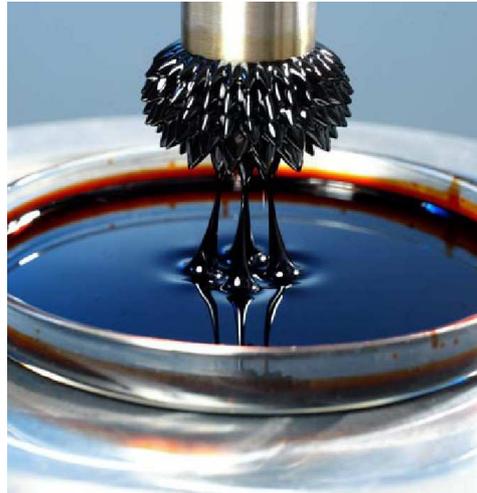


Figure 3

Solution de ferrofluide (en bas de l'image) sous l'action d'un aimant permanent (en haut de l'image). D'après Degussa Advanced Nanomaterials, Hanau.

Les ferrofluides que nous utilisons sont des ferrofluides ioniques à base de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), synthétisés au Laboratoire des Liquides Ioniques et Interfaces Chargées (LI2C⁵). Ils sont obtenus par coprécipitation alcaline d'ions ferreux (Fe^{2+}) et ferriques (Fe^{3+}). La synthèse, mise au point par (Massart, 1981), permet de contrôler la taille et la charge superficielle des particules. Les nanoparticules ainsi obtenues sont des particules de magnetite (Fe_3O_4) cationiques de diamètre entre 3 et 20 nm, dispersées dans une solution aqueuse de HNO_3 . Les contre-ions sont donc à ce stade les ions nitrates. A la suite de cette acidification, on procède à une oxydation du matériau magnétique des particules (la magnetite est instable) pour obtenir de la maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), stable dans le temps.

La stabilité des solutions colloïdales de nanoparticules utilisées est assurée par les interactions électrostatiques au sein de la solution. Les particules en suspension sont polydisperses et la distribution en taille est décrite par une loi log-normale (Bacri et al., 1986):

⁵ UMR 7612, Université Pierre et Marie Curie

$$P(d) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma d}} \exp\left[-\frac{1}{2\sigma^2} \left(\ln \frac{d}{d_0}\right)^2\right] \quad \text{Eq1.2}$$

où d_0 est le diamètre caractéristique et σ est l'indice de polydispersité. Ces 2 paramètres sont obtenus en analysant la courbe d'aimantation, et en la superposant à une loi de Langevin classique (Bacri et al., 1987a) pour des particules de diamètres d , pondérée par la distribution $P(d)$.

1.4 Les particules utilisées

Deux types de nanoparticules anioniques ont été utilisés dans ce travail. Leur intérêt, comme nous le verrons dans le chapitre 2 et 3, est lié à leur forte interaction électrostatique avec les sites cationiques de la membrane cellulaire. Cette interaction permet l'internalisation de ces particules magnétiques au sein de la cellule, la « marquant » ainsi magnétiquement de façon efficace. Les étapes conduisant au marquage magnétique seront détaillées dans le chapitre 2 et leur intérêt par rapport aux autres types de particules utilisées pour ce type d'application sera décrit dans le chapitre 3.

Ces deux types de particules ne diffèrent que par la nature du ligand de surface qui porte les charges négatives : **les ions citrates pour les particules citratées** et la forme basique de **l'acide dimercaptosuccinique (ADMS) pour les particules dites « ADMS »**. Ces deux types de particules sont issus d'un même ferrofluide précurseur cationique, stable en milieu acide, synthétisé suivant la méthode décrite au paragraphe 1.3.3. Le comportement acido-basique des particules peut ensuite être modifié par modification de la surface. Le but est d'avoir des **particules biostables, c'est-à-dire dispersables dans des tampons biologiques** (en solution aqueuse à force ionique élevée et au pH autour de 7).

1.4.1 Les particules citratées⁶

A partir du ferrofluide précurseur, les particules sont chélatées par l'addition de citrate de sodium. L'adsorption des ions citrates à la surface des particules permet d'obtenir des particules chargées négativement dans une large gamme de pH (4 à 10). Le citrate de sodium possède en effet 3 fonctions carboxyles (pKa 2.8, 4.4 et 5.65) qui sont déprotonées à pH 7. Les charges négatives sont donc apportées par les groupements carboxylates (COO) non complexés des molécules de citrates adsorbées.

⁶ Les particules citratées ont été synthétisées au LI2C par Christine Ménager et Delphine Talbot

Les nanoparticules sont constituées d'un cœur monocristallin et monodomaine de maghémite d'aimantation à saturation $m_s=3.5 \times 10^5 \text{ A/m}$, de diamètre caractéristique $d_0=7 \text{ nm}$ et d'indice de polydispersité $\sigma=0.35$, donnant un diamètre magnétique moyen $d_m=8.4 \text{ nm}$ (12 000 atomes de fer environ).

1.4.2 Les particules ADMS⁷

Pour les particules ADMS, à partir du ferrofluide précurseur, les particules sont chélatées par l'acide dimercaptosuccinique ((HOOC-CH(SH))-CH(SH)-COOH), suivant le procédé décrit en détail dans (Fauconnier et al., 1997 ; Halbreich et al., 2000). Brièvement, après une première étape d'adsorption d'ADMS qui induit la floculation du ferrofluide précurseur, le ferrofluide est redispersé en milieu basique. L'ajout d'acide chlorhydrique permet ensuite de ramener le pH de la solution autour de 7. Les particules ainsi obtenues possèdent des complexes disulfures à leur surface, selon la forme 1 ou 2 (Figure 4).

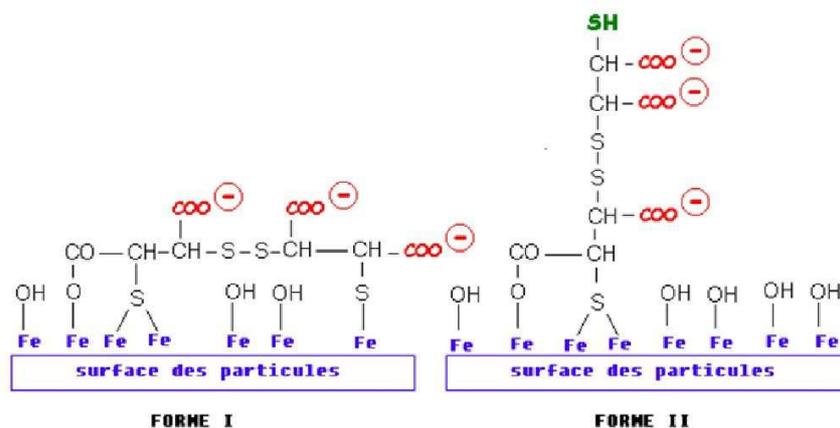


Figure 4

Modèles pour la formation des complexes disulfures à la surface des particules ADMS. D'après J. Roger.

Les mesures magnétiques de ces particules, donnent un diamètre caractéristique $d_0=6.7 \text{ nm}$ et un indice de polydispersité $\sigma=0.4$, donnant un diamètre magnétique moyen $d_m=8.8 \text{ nm}$ (13 700 atomes de fer environ).

La stabilité de la solution est là encore assurée par les groupements carboxylates à la surface des complexes ADMS-particules. La solution colloïdale ainsi obtenue est stable dans une large

⁷ Les particules ADMS ont été synthétisées au LI2C par M.-F. Salis et J. Roger

gamme de pH (de 4 à 10) et ce, à des forces ioniques compatibles avec de nombreux tampons biologiques (<0,35M).

Les particules ADMS utilisées dans ce travail ont été rédispersées dans l'HEPES 0,1 M à pH 7,4.

Le nombre de charge par particules ($[charges] / [Fe] = 6,9 \%$) est plus important que pour les particules citratées ($[charges] / [Fe] = 4,3 \%$), ces particules ont donc une affinité encore plus importante avec les sites cationiques de la membrane cellulaire. De plus, il existe des groupements SH libres à la surface des particules. Ces groupements peuvent être utilisés pour greffer de façon covalente un effecteur biologique sur la nanoparticule, en créant des ponts disulfures S-S ou soufre-carbone S-C. Ces groupements ont par exemple été utilisés pour fonctionnaliser ces particules avec l'annexine V (Geldwerth et al., 1999).

1.4.3 Sinerem[®] de la société Guerbet

De façon à comparer l'interaction nanoparticules anioniques/cellules avec des nanoparticules enrobées de dextran, nous avons utilisé des particules développées par la société Guerbet sous le nom de Sinerem[®]. Sinerem[®] est le nom commercial européen pour des nanoparticules superparamagnétiques d'oxyde de fer enrobées de dextran développées par Advanced Magnetics Inc. (Cambridge, MA.) sous le nom Ferumoxtran. Ces particules sont à un stade de développement pré-clinique pour une utilisation en tant qu'agent de contraste IRM, comme nous le verrons dans le chapitre 3.

Une caractérisation détaillée des particules a été faite par (Jung and Jacobs, 1995). Ces particules sont composées d'un cœur de magnétite monocristallin et monodomaine de 5 nm (composé de 2600 atomes de fer environ) et présentent des propriétés magnétiques similaires à celles des nanoparticules citratées et ADMS. Le cœur magnétique est enrobé d'un polymère : le dextran T-10 (longueur de chaîne moyenne 22 nm). La taille finale des particules est de l'ordre de 30 nm. Elles sont stabilisées par répulsions stériques.

1.4.4 Dynabeads de la société Dynal

Pour analyser l'effet d'une force magnétique sur la migration cellulaire (Chapitre 5), des particules commerciales de la société Dynal sous le nom commercial Dynabeads⁸ ont été utilisées. Ces particules de 2,8 μm de diamètre, principalement utilisées pour le tri cellulaire, sont constituées d'une matrice de polystyrène dans laquelle les particules de maghémite sont précipitées, enrobée

⁸ M-280 Tosylactivated

d'une couche de polyuréthane. La fraction volumique en maghémite est de 3,1%, avec une aimantation à saturation de l'ordre de $8,7 \times 10^3 \text{ A/m}$.

L'intérêt de ces particules pour notre étude était qu'elles pouvaient être facilement fonctionnalisées avec des protéines d'intérêt. **Ces particules présentent en effet des groupements amines à leur surface qui permet le couplage covalent avec un grand nombre d'anticorps et de protéines.**

Nous les avons ainsi **soit enrobées avec du sérum, soit couplées de façon covalente avec des immunoglobulines.** L'interaction de l'amibe *Entamoeba histolytica* (étudiée dans le chapitre 5) avec les particules enrobées de sérum et les particules couplées aux immunoglobulines n'est pas la même. Cela nous a permis de contrôler la localisation des particules au sein de l'amibe.

La force gravitationnelle n'est plus négligeable pour des particules de cette taille et la stabilité colloïdale est donc réduite à quelques heures seulement. Ces particules sont donc uniquement destinées à un usage *in vitro*.

Chapitre 2 :

Les nanoparticules comme outil diagnostique in vitro : suivi de l'interaction particules/cellules

| | | |
|-------|--|-----------|
| 2.1 | DIFFERENTES METHODES D'IMMUNODETECTION UTILISANT DES NANOPARTICULES MAGNETIQUES... | 35 |
| 2.2 | PRINCIPE DE LA TECHNIQUE MAGNETO-OPTIQUE..... | 37 |
| 2.2.1 | <i>Biréfringence des ferrofluides.....</i> | <i>37</i> |
| 2.2.2 | <i>Relaxation de Biréfringence des ferrofluides.....</i> | <i>38</i> |
| 2.2.3 | <i>Détermination de la relaxation de biréfringence.....</i> | <i>38</i> |
| 2.3 | INTERACTION DES PARTICULES ANIONIQUES AVEC LA MEMBRANE CELLULAIRE..... | 40 |
| 2.4 | SUIVI DE L'INTERACTION PARTICULES/CELLULES PAR METHODE MAGNETO-OPTIQUE | 42 |
| 2.4.1 | <i>Sur cellules entières.....</i> | <i>43</i> |
| 2.4.2 | <i>Sur objets biologiques isolés.....</i> | <i>44</i> |
| 2.5 | ANALYSE DYNAMIQUE ET STRUCTURALE DES PARTICULES AU COURS DES DIFFERENTES ETAPES DE L'INTERNALISATION | 48 |
| 2.5.1 | <i>Observation par microscopie électronique à transmission.....</i> | <i>48</i> |
| 2.5.2 | <i>Expériences de diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA).....</i> | <i>49</i> |
| 2.6 | CONCLUSION..... | 53 |

Chapitre 2

Les nanoparticules comme outil diagnostique in vitro

Les nanoparticules magnétiques qui sont magnétiquement monodomaines, ont également la propriété d'être optiquement uniaxes. **Si elles sont orientées par un champ magnétique, elles induisent une biréfringence optique de la solution où elles sont dispersées.** L'utilisation de ces propriétés magnéto-optiques des nanoparticules peut donner directement accès au volume hydrodynamique des complexes formés avec les nanoparticules. Des publications antérieures du groupe (Wilhelm et al., 2002b) ont montré par exemple que cette méthode permettait de **détecter le couplage d'immunoglobuline (IgG) sur les nanoparticules.** Nous avons ici utilisé cette technique **pour détecter une interaction entre les particules et les cellules.**

Le principe de biréfringence magnéto-optique peut en effet servir à **détecter et quantifier l'accrochage de nanoparticules sur la membrane cellulaire et son éventuelle internalisation.** Cette technique pourrait ainsi s'avérer un outil intéressant pour le diagnostic *in vitro* comme «screening cellulaire», et en particulier en utilisant ce système sur des **nanoparticules fonctionnalisées par un effecteur biologique.** Ceci pourrait alors permettre à terme de développer un test capable de détecter un **accrochage spécifique sur les sites de reconnaissances de la membrane cellulaire.** Nous pourrions ainsi détecter la présence d'un type cellulaire ou d'un récepteur cellulaire particulier.

Il existe à l'heure actuelle quelques techniques utilisant les propriétés magnétiques ou optiques des particules pour détecter la présence d'antigènes en solution dans des immunoessais, mais peu encore utilisent ces propriétés sur des cellules entières.

Nous commencerons dans le paragraphe 2.1, par décrire les méthodes utilisant également les propriétés magnétiques ou optiques de nanoparticules dans des tests diagnostiques avant de

présenter le principe de la mesure de biréfringence et les informations que cette technique peut donner sur le système étudié (paragraphe 2.2).

Pour première validation de la détection de l'accrochage de nanoparticules sur cellules, nous avons fait le choix de travailler sur des nanoparticules ayant une interaction non spécifique avec la membrane cellulaire : les particules magnétiques anioniques présentées dans le chapitre 1. Le processus d'internalisation des nanoparticules anioniques, largement décrit dans des travaux antérieurs du groupe (Wilhelm et al., 2003a; Wilhelm et al., 2002a), est résumé dans le paragraphe 2.3. Les différents résultats obtenus sur le système particules anioniques citratées/cellules Hela sont ensuite présentés dans le paragraphe 2.4. L'accrochage des particules sur la membrane et leur internalisation dans des endosomes s'accompagnent de modifications des interactions entre particules médiées par les propriétés du milieu extérieur (solvant aqueux, membranes, vésicules intracellulaires). Ce sont ces modifications qui nous permettent de détecter l'interaction particules/cellules. De façon à mieux définir l'organisation des particules au cours de ces étapes, une analyse structurale par diffusion de neutrons aux petits angles et par microscopie électronique à balayage a également été effectuée. Les résultats de cette étude sont présentés dans le paragraphe 2.5.

2.1 Différentes méthodes d'immunodétection utilisant des nanoparticules magnétiques

De nouvelles méthodes d'immunodétection utilisant les propriétés magnétiques des nanoparticules ont été développées pour quantifier ou détecter des molécules biologiques dans un liquide. Par exemple, il est possible d'utiliser la sensibilité du SQUID⁹ (Superconducting Quantum Interference Device) pour détecter des biomolécules adsorbées à la surface des nanoparticules à partir d'une mesure de relaxation de l'aimantation (MARIA : Magnetic relaxation immunoassay (Enpuku et al., 2001 ; Lange et al., 2002), seuil de détection de 10^6 molécules). Des développements parallèles ont même permis de descendre à des seuils de détection de 5×10^4 molécules grâce à un SQUID à haute température de transition (High-Tc SQUID)(Chemla et al., 1999; Chemla et al., 2000). Pour comparaison, le seuil de détection de L'ELISA¹⁰ est de 10^5 molécules.

⁹ Le SQUID (Superconducting Quantum interference Device) est une technique permettant de mesurer avec une grande sensibilité l'aimantation d'un matériau.

¹⁰ L'ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) est un des tests d'immunodétection les plus employés à l'heure actuelle. Il est basé, après plusieurs étapes d'amplification, sur un dosage colorimétrique d'anticorps couplés à un fluorochrome.

Récemment, il a été possible de détecter en solution la présence de bactéries (*listeria*) marquées magnétiquement grâce à de nanoparticules enrobées avec des anticorps spécifiques à la *listeria* (Grossman et al., 2004). D'autres travaux ont également montrés que ces méthodes étaient utilisables *in vivo* (Flynn and Bryant, 2005; Romanus et al., 2002b).

Les mesures par SQUID reposent sur la mesure de flux magnétique¹¹. Cette technique est très sensible mais ne permet cependant pas de détecter des temps de relaxation inférieurs à la milliseconde (temps de réponse de l'électronique du SQUID). Les particules utilisées ont donc généralement un volume et/ou une énergie d'anisotropie suffisamment élevés pour relaxer sur des temps de l'ordre de la ms. Par exemple, les particules utilisées par (Grossman et al., 2004), sont composés d'un agrégat de grosses nanoparticules de maghémite monodomaines, enrobés de dextran ($\phi_{\text{maghémite}}=55\text{-}59\% \text{ w/w}$). Lorsque les agrégats sont libres, le processus dominant de relaxation est la relaxation brownienne des objets ($50 \mu\text{s}$), trop rapide pour être détectée par le SQUID. En revanche, si ces agrégats se lient aux bactéries, la relaxation brownienne n'est plus possible et l'aimantation relaxe donc par relaxation de Néel. La relaxation de Néel des très gros agrégats, très lente (de l'ordre de quelques millisecondes), est alors détectable par le SQUID (Figure 5).

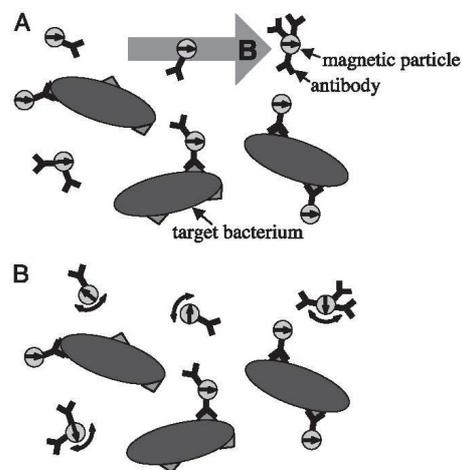


Figure 5

Principe de la détection de bactéries par SQUID (D'après (Grossman et al., 2004)). Une suspension de particules paramagnétiques, couplées à des anticorps, est ajoutée à une solution contenant des bactéries. (A) un champ magnétique est appliqué pour aligner les moments magnétiques des particules. (B) Une fois le champ magnétique coupé, les particules encore libres relaxent de façon brownienne au bout d'un temps inférieur au temps nécessaire à la mesure du SQUID. Les particules liées relaxent, elles, avec une dynamique beaucoup plus lente, par relaxation de Néel.

¹¹ Champ magnétique multiplié par la surface coupée d'une bobine détectrice.

La sensibilité actuelle de la méthode magnéto-optique que nous étudions ici reste bien inférieure à celle obtenue avec le SQUID¹², si l'on suppose qu'avec le SQUID, on détecte bien l'ensemble du signal de Néel de toutes les particules liées. La simplicité et le faible coût de la méthode magnéto-optique en font néanmoins un outil bien plus intégrable dans un laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire. Nous avons donc voulu tester s'il était possible de détecter la présence de particules accrochées sur la membrane plasmique ou internalisées au sein de la cellule, directement sur des cellules vivantes par cette méthode magnéto-optique.

2.2 Principe de la technique magnéto-optique

2.2.1 Biréfringence des ferrofluides

En dehors de tout champ magnétique, les grains, et donc aussi leurs moments magnétiques et leurs axes optiques, sont orientés aléatoirement sous l'effet de l'agitation thermique. Le ferrofluide est alors un milieu isotrope et ne présente ni aimantation ni biréfringence (Figure 6).

En présence d'un champ magnétique statique H , les moments magnétiques vont s'orienter dans la direction du champ. Le ferrofluide acquiert alors une aimantation non nulle. Les moments magnétiques entraînent avec eux l'axe optique des particules et la solution de ferrofluide devient un milieu optiquement anisotrope, avec un indice optique $n_{//}$ dans la direction du champ magnétique, et un indice n_{\perp} dans la direction perpendiculaire. Suivant la direction de propagation de l'onde lumineuse, il existe alors une différence d'indice optique : c'est la biréfringence $\Delta n = n_{//} - n_{\perp}$. L'origine physique de l'anisotropie optique est détaillée dans (Hasmonay et al., 1998).

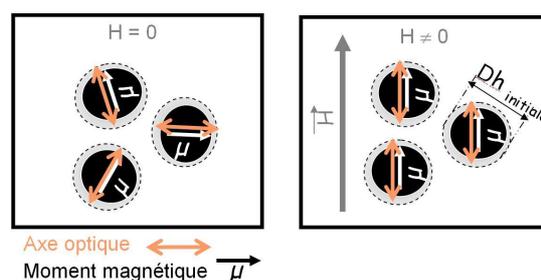


Figure 6

Nanoparticules magnétiques monodomaines en l'absence et en présence d'un champ magnétique. En l'absence de champ magnétique, les moments magnétiques des particules sont orientés de façon aléatoire et la solution dans laquelle sont contenues ces particules est globalement isotrope. En revanche, en présence d'un champ magnétique, les moments magnétiques s'orientent dans la direction du champ, entraînant avec eux l'axe optique de la particule. La solution devient alors anisotrope et une biréfringence induite magnétiquement apparaît.

¹² De l'ordre de 10^{11} particules, donc 10^{11} molécules si l'on suppose qu'une particule ne se lie qu'à une seule molécule.

2.2.2 Relaxation de Biréfringence des ferrofluides

Lorsque les particules sont dispersées dans un milieu liquide, quand le champ magnétique est coupé, les moments magnétiques relaxent vers des directions aléatoires, entraînant avec eux les axes optiques (qui sont couplés aux moments magnétiques via l'énergie d'anisotropie, qui est ici $\geq kT$). La biréfringence du ferrofluide diminue donc progressivement jusqu'à une valeur nulle, avec un temps caractéristique de rotation brownienne (Figure 7) :

$$\tau_B = \frac{3\eta V_H}{k_B T} \quad \text{Eq. 2.1}$$

où η est la viscosité du solvant à la température T et V_H est le volume hydrodynamique des particules. Il est donc possible grâce à cette méthode de mesurer le diamètre hydrodynamique des particules (Bacri et al., 1987b; Koetitz et al., 1999).

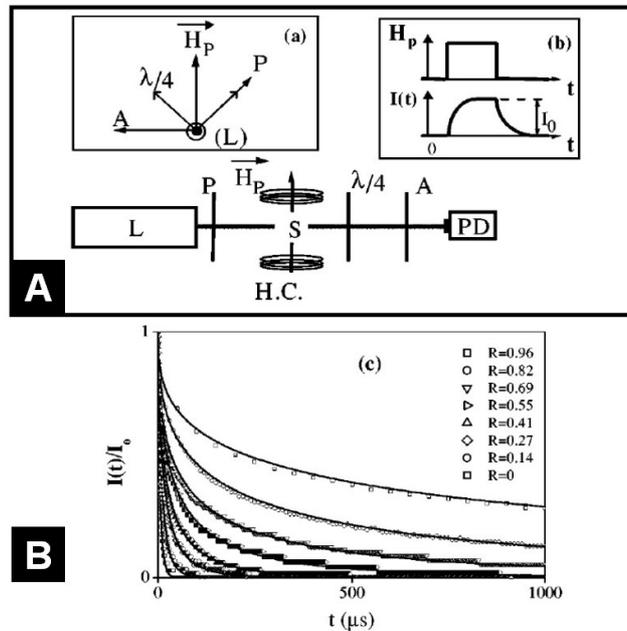


Figure 7

(A) Schéma du dispositif expérimental de la technique magnéto-optique (Voir texte). (B) Evolution du temps de relaxation des particules de maghémite ADMS en fonction des rapports d'anticorps $R = \text{Anticorps}/\text{particules}$ avec lesquels ces particules sont laissées incubées. L'augmentation du diamètre révèle une adsorption des anticorps à la surface des particules. D'après (Wilhelm et al., 2002b).

2.2.3 Détermination de la relaxation de biréfringence

La relaxation de la biréfringence est déterminée ici grâce au système optique représenté sur la Figure 7. C'est la polarisation de la lumière à la sortie de l'échantillon qui est analysée. Le faisceau laser Helium-Neon non polarisé (L, $\lambda = 632.8$ nm, $P=5$ mW) passe à travers un polariseur (P),

l'échantillon (E), une lame quart d'onde ($\lambda/4$), puis un analyseur (A) et son intensité est collectée par un photodétecteur (PD). L'orientation de chaque élément est indiquée sur la figure. L'échantillon de ferrofluide est introduit dans une cellule Hellma non biréfringente et est soumis à une impulsion de champ magnétique vertical ($H_p=12 \text{ kA.m}^{-1}$) produit par des bobines d'Helmholtz (HC sur la figure). Lors de l'application du champ magnétique, les particules s'alignent dans la direction du champ, induisant une biréfringence de la solution avec un déphasage φ entre les directions parallèles et perpendiculaires au champ. Ce déphasage est relié à la différence d'indice Δn par la relation :

$$\varphi = 2\pi e \frac{\Delta n}{\lambda_0} \quad \text{Eq. 2.2}$$

pour un échantillon d'épaisseur e , et un laser de longueur d'onde λ_0 .

L'intensité de la lumière transmise $I(t)$ détectée après l'analyseur par le photodétecteur augmente jusqu'à une valeur de saturation I_0 . Si $\varphi \ll 1$, l'intensité transmise est proportionnelle au déphasage φ ¹³ (Hasmonay et al., 1999).

Lorsque le champ est coupé, les axes d'anisotropie des particules relaxent de façon brownienne. La biréfringence magnétiquement induite du ferrofluide diminue donc progressivement et avec elle l'intensité collectée sur le photodétecteur. De façon à pouvoir observer cette relaxation brownienne rapide (de l'ordre de la μs pour les nanoparticules de maghémite dispersées dans l'eau), le champ est coupé très rapidement (temps inférieur à 200 ns).

Pour des particules polydisperses, il existe une distribution des temps de relaxation et la relaxation de l'intensité de biréfringence n'est pas une simple exponentielle, mais est mieux représentée par une exponentielle étirée de la forme suivante :

$$\frac{I}{I_0} = \exp \left[- \left(\frac{t}{\tau} \right)^\alpha \right] \quad \text{Eq. 2.3}$$

où τ , le temps caractéristique de la relaxation et α un exposant lié à la polydispersité des temps de relaxation ($\alpha = 1$ pour un échantillon monodisperse. Plus le α diminue, plus la distribution est large).

La biréfringence Δn de la solution, et donc l'intensité I sont proportionnelles à la fraction volumique en maghémite de la solution (ϕ).

¹³ En toute rigueur, l'intensité est proportionnelle au $\sin \varphi$. Nous faisons ici l'approximation aux petits angles : $\sin \varphi \sim \varphi$, ce qui est vérifié dans la gamme de concentration et d'épaisseur de cuve utilisées.

Il est important de rappeler que **seules les particules dont le moment magnétique est couplé à la structure de la particule présente une biréfringence induite magnétiquement**. Ceci est vrai pour des particules pour lesquelles l'énergie d'anisotropie $E_a \geq kT$. Dans le cas inverse, le moment magnétique de la particule s'oriente et relaxe indépendamment de la structure cristalline du grain et donc de son axe optique. Ainsi, les particules de maghémite participant au signal de biréfringence sont les plus grosses particules¹⁴ de la distribution. Ceci est très largement accentué par le fait que le champ H utilisé ici est très faible. Cette méthode n'est donc sensible qu'aux plus grosses particules et donc à la queue de la distribution.

2.3 Interaction des particules anioniques avec la membrane cellulaire

Dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisé des nanoparticules magnétiques anioniques, sans traitement de surface, interagissant de façon aspécifique avec les membranes cellulaires, comme modèle pour analyser la faisabilité d'une détection de l'interaction particules/cellules par une méthode magnéto-optique.

Des études antérieures ont montré que ces nanoparticules d'oxyde de fer chargées négativement pouvaient être internalisées dans la plupart des cellules eucaryotes par un processus spontané d'endocytose, conduisant à la formation dans le cytoplasme de **vésicules intracellulaires (ou endosomes) de 400 à 1000 nm de diamètre fortement chargées en nanoparticules magnétiques (Wilhelm et al., 2003a)** (Figure 8).

L'analyse quantitative et qualitative de la cinétique d'internalisation des particules (Wilhelm et al., 2002a) a mis en évidence les différentes étapes du processus d'internalisation, schématisées sur la Figure 8.A. Les nanoparticules anioniques sont d'abord adsorbées sur des sites cationiques de la membrane cellulaire, par simple interaction électrostatique. Ces nanoparticules, adsorbées sous forme de petits agrégats, se concentrent ensuite dans des invaginations membranaires puis sont endocytées dans de petites vésicules membranaires, et acheminées pour fusionner ensemble dans des endosomes tardifs, puis des lysosomes. Les particules suivent donc un processus d'endocytose¹⁵, qui se termine au sein des lysosomes¹⁶ où les particules sont lentement dégradées.

¹⁴ Les grosses particules sont celles qui ont l'énergie d'anisotropie la plus élevée, puisque celle-ci est proportionnelle à la surface pour les particules de maghémite utilisées (voir chapitre 1)

¹⁵ L'endocytose est un terme générique désignant les différents modes de capture et de pénétration dans une cellule des substances du milieu ambiant, s'accompagnant d'une modification morphologique temporaire de la membrane cytoplasmique.

Pendant ce processus, la membrane cellulaire est continuellement régénérée et permet une internalisation efficace des nanoparticules magnétiques.

Les différents stades du processus d'internalisation ont pu être mis en évidence par microscopie électronique. A 4°C, le processus d'internalisation est inhibé, et seul l'adsorption non spécifique des nanoparticules sur les sites cationiques de la membrane est possible (Figure 8-B). Si on chauffe ensuite l'échantillon cellulaire à 37°C, le processus d'internalisation est rétabli, et de nombreuses vésicules d'endocytose, fortement chargées en nanoparticules magnétiques, peuvent être observées après quelques dizaines de minutes (Figure 8-C).

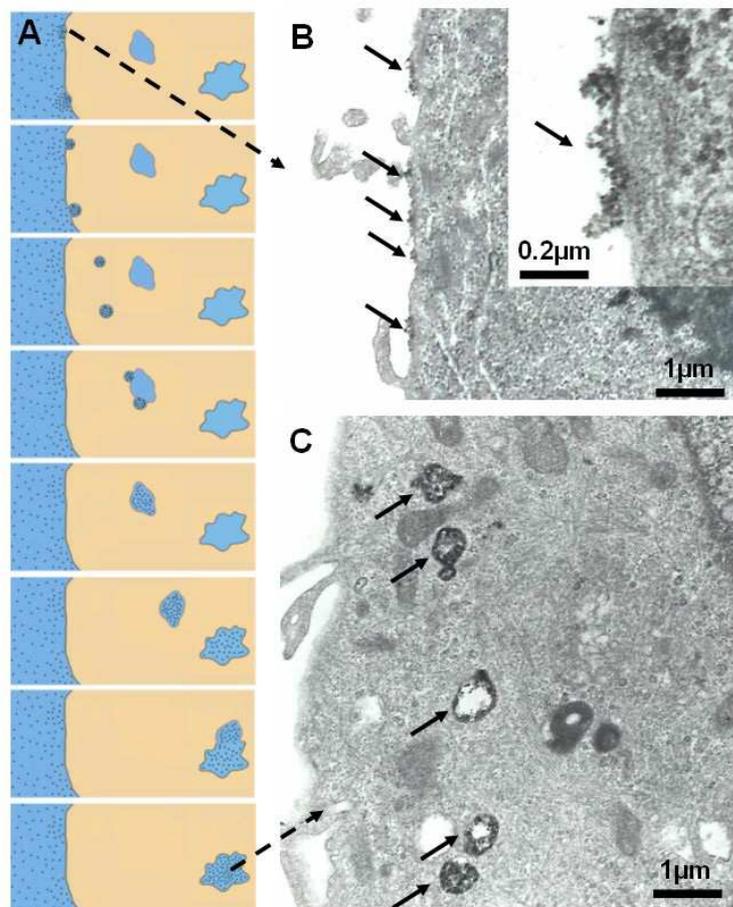


Figure 8

Le processus d'internalisation des particules magnétiques par voie d'endocytose est schématisé en (A). La première étape du processus consiste en une interaction électrostatique avec la membrane cellulaire, conduisant à une adsorption des particules magnétiques sous la forme de petits agrégats sur les sites cationiques de la membrane cellulaire (B). Les particules adsorbées sont ensuite internalisées dans des endosomes précoces, qui fusionnent ensuite avec les endosomes tardifs (C) puis avec les lysosomes.

¹⁶ Les lysosomes sont des vésicules d'endocytose servant de « voies de garage », dans lesquelles les composés exogènes (extérieurs à l'organisme) sont acheminés pour être soumis à des enzymes puissants permettant leur dégradation.

Les nanoparticules magnétiques se retrouvent ainsi confinées dans des vésicules intracellulaires, et ce quel que soit le type cellulaire (Figure 9). Nous les avons observées en microscopie électronique pour les cellules HeLa (utilisées comme cellules modèles dans le cadre de cette étude), mais également pour des cellules musculaires lisses et pour des cellules issus d'explants musculaires (utilisées dans le cadre du développement de thérapies cellulaires de façon à détecter et suivre par IRM les cellules d'intérêt marquées magnétiquement -chapitre 3-).

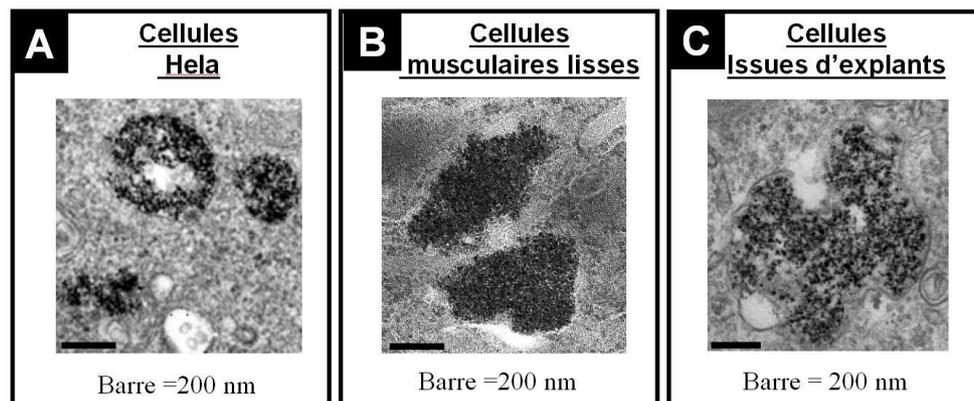


Figure 9

Vésicules d'endocytose observées par microscopie électronique pour différents types cellulaires. (A) cellules HeLa, (B) cellules musculaires lisses et (C) cellules issues d'explants.

2.4 Suivi de l'interaction particules/cellules par méthode magnéto-optique

L'accrochage sur la membrane plasmique et l'éventuelle internalisation au sein de la cellule laissent supposer des dynamiques de relaxation différentes pour les particules au cours de ces différents stades. En effet, les changements de pH et de forces ioniques, ainsi que la présence d'obstacles (membranes plasmiques ou membranes endosomales) modifient l'organisation des particules, comme on peut l'observer sur les clichés de microscopie électronique. On peut donc supposer que ces modifications entraîneront des modifications au niveau de la dynamique de relaxation de biréfringence magnétiquement induite et seront donc détectables par la méthode magnéto-optique décrite précédemment.

Cette étude a été faite avec des nanoparticules de maghémite citratées, décrites dans le chapitre 1, en présence de cellules HeLa, ce couple particules/cellules nous servant de modèle pour la faisabilité de la méthode.

2.4.1 Sur cellules entières

Après une heure d'adsorption à 4°C en présence de nanoparticules magnétiques à une concentration $[Fe]=20\text{mM}$, les cellules Hela sont grattées et centrifugées (1400 rpm, 5min, 4°C). Le culot cellulaire ainsi obtenu est déposé dans une cuve Hellma de 200 μm d'épaisseur et analysé immédiatement par biréfringence. La vitesse de relaxation initialement très rapide (temps de relaxation de l'ordre de 3.8 μs pour les particules utilisées en solution aqueuse) chute pour atteindre des temps de relaxation de l'ordre de 20 ms (Figure 10). Il apparaît donc possible de cette manière de détecter les particules dans le premier stade de l'interaction particules/cellules : l'adsorption sur la membrane plasmique. Néanmoins, le signal obtenu est très bruité et pour des problèmes de diffusion, disparaît totalement lorsque l'échantillon est chauffé à 37°C, c'est-à-dire lorsque l'on rétablit le processus d'internalisation par endocytose.

Tous nos essais pour remédier à ce problème ont pour l'instant été vains et il n'a donc pas été possible, de suivre sur cellules vivantes la cinétique d'internalisation des particules.

De façon à contourner les problèmes de diffusion, nous avons alors décidé d'effectuer cette détection sur des échantillons de membranes plasmiques sur lesquelles les particules se sont adsorbées d'une part et sur des échantillons d'endosomes magnétiques au sein desquels les particules ont été acheminées d'autre part, chaque objet (fragments de membranes plasmiques ou endosomes) ayant été isolés de leur environnement cellulaire.

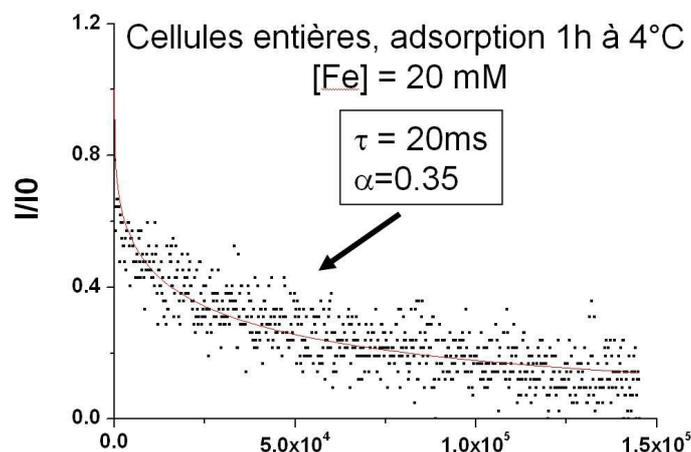


Figure 10

Détection de particules de maghémite citratées en interaction avec la membrane plasmique de cellules vivantes. Il est possible de détecter l'interaction seulement pendant la première étape du processus conduisant à l'internalisation des particules dans les cellules : l'adsorption sur la membrane plasmique. Dans ce cas, un ajustement de la courbe avec une exponentielle étirée donne un temps de relaxation de l'ordre de 20 ms ($\alpha = 0.35$). Lorsque les particules sont internalisées au sein des endosomes, il n'est plus possible de détecter un signal de biréfringence.

2.4.2 Sur objets biologiques isolés

Méthode pour isoler les objets biologiques : membranes et endosomes magnétiques

Les différentes étapes permettant d'isoler des fragments de membrane plasmique sur lesquelles sont adsorbées des particules magnétiques d'une part et les endosomes magnétiques d'autre part sont représentées sur la Figure 11.

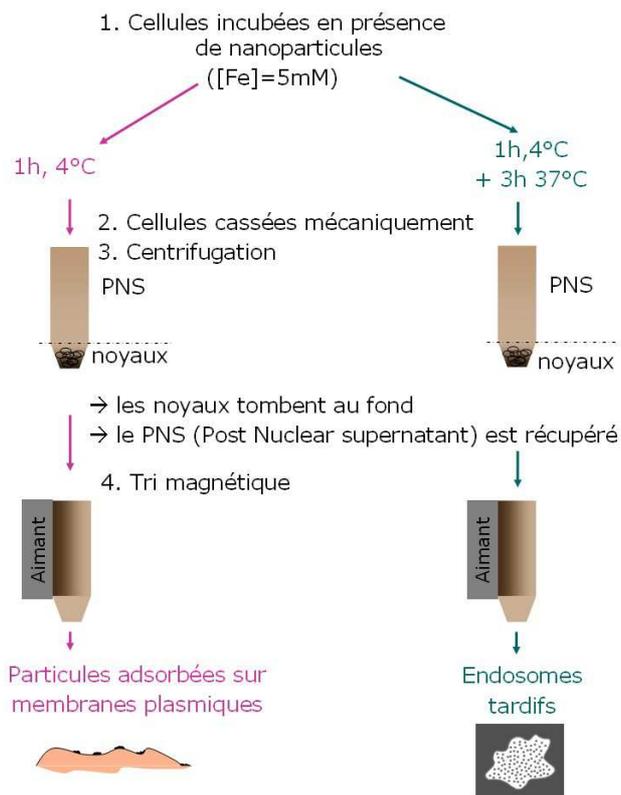


Figure 11

Schéma des étapes permettant d'isoler soit des fragments de membrane plasmique sur lesquelles des particules magnétiques se sont adsorbées (partie gauche), soit des endosomes contenant des particules magnétiques (partie droite).

Environ 3×10^8 cellules HeLa sont incubées en présence de nanoparticules citratées (décrites au chapitre 1, paragraphe 1.4.1) à une concentration en fer extracellulaire $[Fe]=5mM$ pendant 1 heure à 4°C.

Pour obtenir les membranes plasmiques ayant adsorbé les nanoparticules magnétiques, les cellules sont alors lavées et grattées rapidement après la fin de l'incubation.

Pour obtenir les endosomes magnétiques, les cellules sont d'abord lavées après la période d'incubation avec le ferrofluide, puis incubées dans leur milieu de culture pendant 3h à 37°C. Pendant cette période, les particules adsorbées sur la membrane cellulaire sont internalisées dans

des vésicules d'endocytose. Les cellules sont ensuite lavées et grattées de la même façon que pour les membranes.

Les culots cellulaires ainsi obtenus sont resuspendus dans un tampon de sucrose (250mM sucrose, 25mM Hepes, pH 7.4, $\eta=1.2$ cPoise) et les cellules sont cassées par de nombreux aller-retour sur une aiguille 25G¹⁷. Les cellules non cassées et les noyaux sont ensuite supprimés par centrifugation (2500 tour, 7 min) et le surnageant (appelé « post-nuclear supernatant » ou PNS) contenant toutes les organites intracellulaires et les fragments de membrane plasmique, dont les objets magnétiques d'intérêt, est récupéré pour être trié magnétiquement. Le tri magnétique se fait en plaçant ce PNS sur une colonne magnétique. Après une nuit d'incubation à 4°C, les objets magnétiques (membranes ou endosomes) s'accumulent le long de la colonne magnétique. La fraction non magnétique est alors éluée et la fraction magnétique resuspendue dans le tampon de sucrose.

Les particules magnétiques au sein de ces deux types d'objets magnétiques (fragments de membranes plasmiques versus endosomes) ont alors été analysées par le même type d'expériences magnéto-optiques que celles utilisées sur cellules vivantes.

Résultats pour les particules distribuées au sein des objets biologiques isolés

La dynamique de relaxation que nous obtenons est clairement différente de celles obtenues pour des particules dispersées en milieu liquide (Figure 12).

¹⁷ 25G réfère au diamètre de l'aiguille. A ce diamètre, les cellules sont cassées mécaniquement.

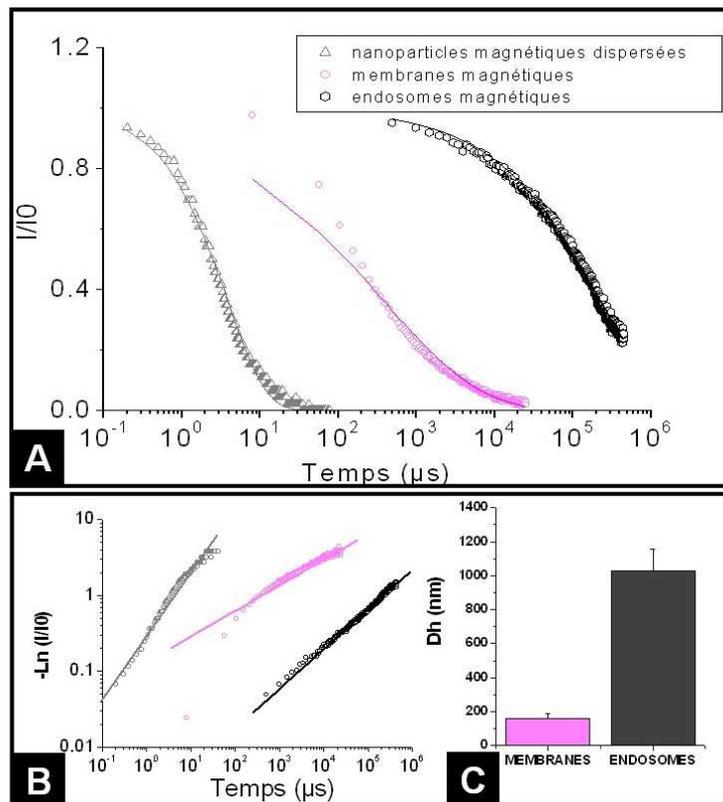


Figure 12

(A) Exemple de relaxation de biréfringence obtenues pour des particules isolées dispersées en solution aqueuse (triangles), adsorbées sur des fragments de membranes (ronds claires), et internalisées au sein d'endosomes (ronds foncés) en représentation I/I_0 (A) et $-\ln(I/I_0)$ (B). Le graphe (B) permet de vérifier l'ajustement avec des exponentielles étirées (pente $=\alpha$). Les ajustements par des exponentielles étirées sont représentés en trait plein sur chacun des graphes. (C) Histogramme montrant les diamètres moyens déduits des temps de relaxation, obtenus à partir de 3 préparations différentes de fragments de membranes magnétiques et 4 préparations différentes d'endosomes magnétiques.

Le tableau 1 présente les valeurs de τ et de α obtenues par un ajustement en exponentielle étirée, pour les particules libres, les membranes magnétiques et les endosomes.

| Particules de maghémite citratées : | τ (μ s) | α |
|---|------------------------------|-----------------|
| - dispersées en solution aqueuse | 3.8 ± 0.1 | 0.83 ± 0.08 |
| - adsorbées sur des fragments de membrane plasmique | $7 \pm 4 \times 10^{-2}$ | 0.35 ± 0.05 |
| - internalisées au sein des endosomes | $1.8 \pm 0.6 \times 10^{-5}$ | 0.4 ± 0.1 |

Tableau 1

Valeurs des temps de relaxation (τ , exprimé en μ s) et des indices de polydispersité α (plus α est proche de 1, moins l'échantillon est polydispersé) mesurés à partir des courbes de relaxation pour les particules dispersées en solution ($n=2$), les particules adsorbées sur des fragments de membrane plasmique ($n=3$) et internalisées au sein de endosomes ($n=4$). Toutes les courbes ont été ajustées par une exponentielle étirée du type de l'équation 2.3.

Par rapport aux particules libres, les temps de relaxation sont de 2 à 4 ordres de grandeur plus longs pour les membranes et les endosomes magnétiques respectivement. La polydispersité augmente également (α diminue). Elle est particulièrement importante pour les membranes magnétiques.

Les analyses par méthode magnéto-optique montrent donc une nette modification de la relaxation de biréfringence des nanoparticules au sein des différents objets magnétiques observés. Il apparaît donc aisé de discriminer par cette mesure magnéto-optique, dans quel stade de l'internalisation se trouvaient les particules au sein de la cellule.

La question se pose alors de savoir si l'augmentation du temps de relaxation est due à la relaxation de l'endosome dans son ensemble ou seulement à la relaxation d'agrégats ou de chaînes de particules à l'intérieur de l'endosome. Dans le premier cas, ce serait une anisotropie de forme de l'objet entier qui induirait la relaxation de biréfringence, alors que dans le second cas, ce serait plutôt une dynamique lente, interne à l'objet, qui serait observée.

Si nous supposons que ce sont les objets magnétiques dans leur ensemble qui s'alignent le long de la direction du champ magnétique et que ce sont ces objets qui relaxent de façon brownienne, alors le temps de relaxation peut être relié à un diamètre hydrodynamique équivalent. Nous trouvons dans ce cas, des diamètres hydrodynamiques respectivement de 1000 ± 100 nm pour les endosomes magnétiques et 160 ± 30 nm pour les membranes magnétiques.

Néanmoins, à ce stade, l'hypothèse d'un phénomène de déformation interne ne peut pas être totalement écarté. En effet, des temps de relaxation du même ordre de grandeur se retrouvent pour des particules dispersées de façon dense, dans des milieux liquides, à fortes fractions volumiques et en interaction répulsives (Meriguet et al., 2004).

Une troisième hypothèse peut être avancée : les particules ne seraient pas distribuées en volume, mais sur la surface de la membrane, la rotation de l'objet pourrait alors s'accompagner d'une déformation globale et lente.

Pour essayer de trancher entre ces différentes hypothèses, nous avons mené une analyse de l'organisation structurale du système par deux types d'expériences : (1) des observations par microscopie électronique et (2) des expériences de diffusions de neutrons aux petits angles.

2.5 Analyse de l'organisation structurale des particules au cours des différentes étapes de l'internalisation

2.5.1 Observation par microscopie électronique à transmission

De façon à savoir si le diamètre hydrodynamique évalué par biréfringence dans le paragraphe 2.4 correspond bien à la taille de nos objets, des observations en microscopie électronique de ces échantillons ont été menées.

Pour les observations en microscopie électronique, les fractions magnétiques sont lavées avec un tampon cacodylate (0.2M), puis fixées 1h à 4°C dans une solution de glutaraldehyde (2% dans un tampon cacodylate 0.1M). Les culots sont ensuite post-fixés dans 1% d'OsO₄ pendant 2h à 4°C, lavés à nouveau avec le tampon cacodylate, puis déshydratés dans une série de bain d'éthanol. Les culots déshydratés sont ensuite inclus dans une résine (EPON) et coupés. Les coupes ultrafines de 70 nm sont examinées par microscopie électronique à transmission¹⁸.

Les clichés de microscopie électronique obtenus (Figure 13) révèlent une structure différente entre les membranes magnétiques et les endosomes.

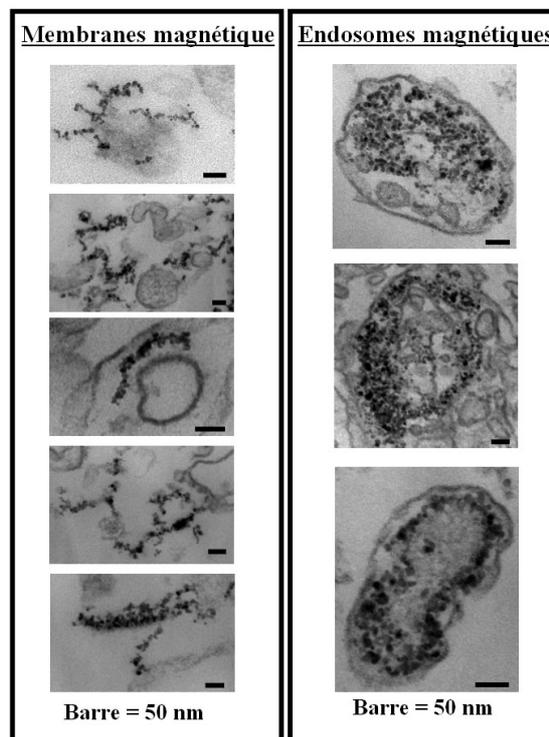


Figure 13. Clichés de microscopie électronique obtenus pour des particules magnétiques adsorbés sur des fragments de membranes plasmiques (membranes magnétiques) et internalisées au sein d'endosomes (endosomes magnétiques)

¹⁸ La post-fixation à l'OsO₄ ainsi que les coupes et les clichés ont été réalisés à la plateforme de microscopie électronique de l'INRA (Jouy-en-Josas) par Sophie Chat et Christine Longin.

Pour les membranes magnétiques, des structures en filaments décorés de nanoparticules magnétiques sont observées. L'examen de leur taille sur 7 clichés (n=159) nous donne une distribution gaussienne très large des longueurs de ces coupes de membranes magnétiques autour de $l_m^{MET} = 80 \pm 50$ nm (Figure 14).

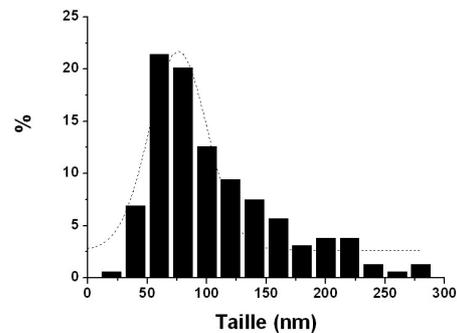


Figure 14

Distribution de taille des membranes magnétiques. Le résultat d'un ajustement gaussien est montré en pointillé.

Pour les endosomes, les particules se trouvent confinées au sein de vésicules de taille moyenne, estimée sur 7 clichés (n=11), $d_{\text{endo}}^{MET} = 330 \pm 130$ nm. Ces diamètres doivent toutefois être considérés avec précaution, car les objets ne sont pas observés dans leur ensemble : ce sont seulement des coupes de 70 nm d'épaisseur que nous visualisons. Si les vésicules ne sont pas observées dans leur section centrale, le diamètre observé sous-estime le diamètre réel des objets. Malgré cette limitation de la microscopie électronique, les diamètres mesurés restent du même ordre de grandeur que les diamètres calculés à partir des temps de relaxation de biréfringence. Cet argument est donc cohérent avec l'hypothèse que la relaxation observée est due à la relaxation de l'objet dans son ensemble.

2.5.2 Expériences de diffusion de neutrons aux petits angles¹⁹ (DNPA)

L'analyse de biréfringence présentée précédemment était d'ordre dynamique. Il est bon de la compléter par des mesures de diffusion de neutrons aux petits angles, qui devraient permettre de mieux comprendre la structure locale des particules au sein des endosomes.

Une autre motivation pour cette analyse structurale, est que les endosomes magnétiques ainsi obtenus, sont des objets biologiques aux propriétés physico-chimiques intéressantes tant pour la

¹⁹ Collaboration F. Cousin, LLB, CEA, Saclay

mécanique cellulaire qu'en imagerie médicale. D'une part, ces endosomes magnétiques apparaissent comme des sondes magnétiques intracellulaires qui peuvent être manipulées à l'intérieur de la cellule par des champs magnétiques externes. Ils ont par exemple été récemment utilisés comme sondes locales de la visco-élasticité intracellulaire (Wilhelm et al., 2003b) ou pour appliquer des forces intracellulaires locales pendant la migration cellulaire (chez un modèle d'amibe : *Dictyostelium discoideum*, présenté au chapitre 5). D'autre part, leur utilisation, en tant qu'agent de contraste intracellulaire en IRM (décrit dans le chapitre 3), représente une avancée considérable puisqu'elle permet pour la première fois d'atteindre une sensibilité suffisante pour détecter chez l'animal vivant des amas de quelques dizaines de cellules (Hoehn et al., 2002). Une meilleure compréhension des phénomènes physiques en jeu lors de l'interaction protons/nanoparticules magnétiques à l'origine du contraste en IRM est néanmoins nécessaire pour l'optimisation de séquences IRM et pour l'interprétation qualitative et quantitative des images obtenues. Comme détaillé dans le chapitre 3, il a en effet été montré que les relaxivités²⁰ des particules étaient considérablement modifiées lorsque les nanocristaux sont confinés dans ces endosomes intracellulaires par rapport à leur état dispersé et même par rapport à leur état agrégé par ajout de NaCl (Billotey et al., 2003). Il apparaît donc nécessaire de connaître de façon précise l'état d'organisation des particules à l'intérieur des endosomes magnétiques puisque l'interaction inter-particules au sein de cet objet biologique est modifiée (modification du pH et de la force ionique et également interaction avec la membrane endosomale). Dans cette perspective, il est donc important de comprendre la structure locale des endosomes magnétiques.

Le détail de la technique de diffusion de neutrons aux petits angles (DNPA) employée ici est développé dans l'annexe 1. Les expériences ont été réalisées sur le spectromètre PACE au laboratoire Léon Brillouin (CEA, Saclay) avec F. Cousin. Deux longueurs d'onde ont été utilisées : 6 Å, D = 4.5 m et 12 Å, D = 2m de façon à couvrir la gamme des vecteurs de diffusion q de 0.0035 \AA^{-1} à 0.17 \AA^{-1} respectivement. Le comptage a été fait sur les échantillons suivants : (1) Endosomes magnétiques, (2) Fragments de membrane plasmiques magnétiques, (3) Ferrofluide à une fraction volumique $\Phi = 1\%$, (4) Membranes cellulaires seules (sans nanoparticules magnétiques). Des mesures de standards (eau, cellule vide, bruit de fond électronique) ont été également faites, de façon à obtenir des intensités diffusées en valeur absolue (unité : cm^{-1}).

Des échantillons de fragments de membranes plasmiques non magnétiques, fragments de membranes plasmiques magnétiques et endosomes magnétiques ont été dilués dans une solution contenant en fraction volumique, 27% d'eau lourde (D_2O) et 73% d'une solution (H_2O) tampon de

²⁰ La relaxivité est un paramètre utilisé en IRM pour caractériser l'efficacité de l'agent de contraste (voir également le paragraphe 3.3.3 pour plus de précision)

sucrose. Ce rapport volumique a été déterminé par une série de mesures sur les échantillons de membranes non magnétiques à différentes fractions d'eau lourde. Il correspond à un minimum de contraste des membranes (voir annexe 1).

Les expériences de DNPA montrent des objets diffusants différents suivant que les particules sont libres en solutions colloïdales, adsorbées sur les membranes cellulaires, ou internalisées dans les endosomes.

Le facteur de forme des nanoparticules magnétiques individuelles (Figure 15) **présente un plateau de Guinier à petits vecteurs de diffusion (q), et à grands q un comportement en q^{-4} , caractéristique d'un objet dense 3D.** Un ajustement du facteur de forme donne une distribution log-normale, de rayon le plus probable 35 Å, avec un sigma de 0.35.

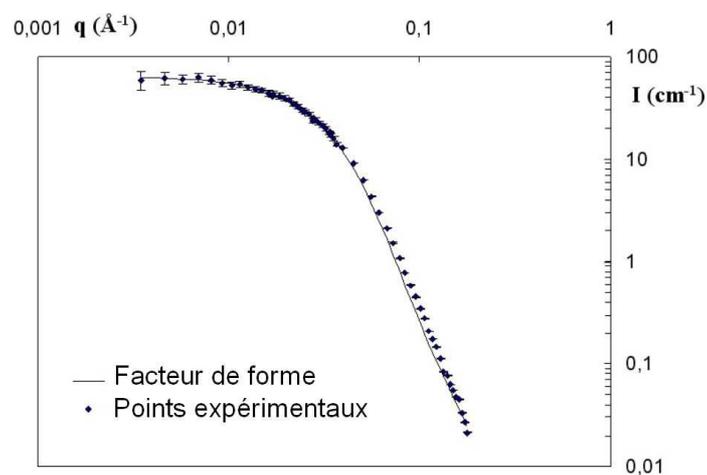


Figure 15

Facteur de forme des nanoparticules magnétiques individuelles dispersées en solution aqueuse, montrant un plateau à petits q , permettant de calculer la taille des particules, et une pente $I \propto q^{-4}$ à grands q , caractéristique d'objets denses 3D.

Les traitements pour arriver au facteur de structure $S(q)$ des nanoparticules adsorbées sur les membranes et contenues dans les endosomes (Figure 16), réalisés par Fabrice Cousin, sont détaillés dans l'annexe 1.

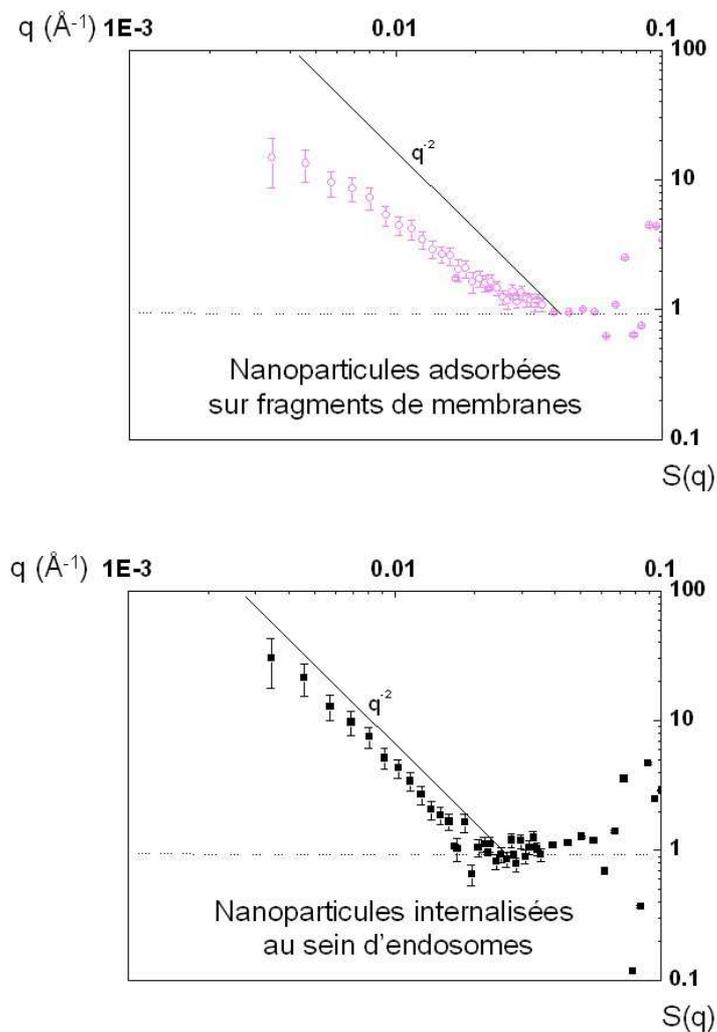


Figure 16.

Facteur de structure des particules magnétiques adsorbées sur les fragments de membranes plasmatiques (haut) et internalisées au sein d'endosomes (bas).

Notons qu'aux petits angles, le facteur de structure $S(q)$ des particules magnétiques peut être identifié au facteur de forme des objets diffusants (Despert and Oberdisse, 2003). Au sein des endosomes, on a $S(q) \propto q^{-2}$, valeur typiquement obtenue pour des particules en état d'agrégation limitée par la diffusion ($q^{-1.8}$ à 3D), limitée par la réaction ($q^{-2.1}$ à 3D), ou bien pour des membranes décorées (q^{-2} - objets 2D). Notons par contre que cette observation écarte clairement un remplissage dense des endosomes par les nanoparticules magnétiques. Il aurait conduit à $I \propto q^{-4}$, comme cela a été par exemple observé dans des micelles magnétiques à base de polymères diblocs (S. Lecommandoux, 2005). Par ailleurs, une agrégation 3D dominée par l'interaction dipolaire conduit de façon standard à $I \propto q^{-1.6}$.

La taille des endosomes, trop grande, est impossible à déterminer par DNPA, et le régime de Guinier n'est jamais atteint ici : leur taille est donc supérieure à 200 nm ($2\pi/q_{\min}$), en accord avec la microscopie électronique.

Les membranes magnétiques donnent un facteur de structure proche de celui des endosomes. Cependant, une inflexion à petits q montre que la taille des objets est plus faible que celle des endosomes, et compatible avec une taille de l'ordre d'une centaine de nanomètres, comme on l'observe aussi en microscopie électronique.

Pour trancher entre les deux structures possibles au sein des endosomes : agrégation volumique ou membranes décorées, retournons aux observations de microscopie électronique de ces objets : les différentes observations montrent la présence des particules nanométriques sous formes d'agrégats peu denses, généralement situés au niveau de la membrane endosomale plutôt qu'au centre des vésicules (Figure 8, Figure 9.A). Sur de nombreux clichés, on observe un trou central, suggérant une répartition surfacique des particules, ressemblant d'une certaine façon à des vésicules décorées synthétisées par voie chimique (S. Lecommandoux, 2005), ce qui serait alors compatible avec l'hypothèse des membranes décorées.

2.6 Conclusion

Les résultats présentés dans ce chapitre montrent qu'il est possible de détecter la présence de particules liées à la surface cellulaire par rapport à des particules libres par simple mesure des temps de relaxation donnés par la méthode magnéto-optique.

Le suivi de l'endocytose des nanoparticules avait été effectué jusqu'à présent uniquement par microscopie électronique sur cellules fixées. Grâce aux méthodes magnéto-optiques, nous avons ici pu suivre de façon indirecte les différents stades du processus conduisant à l'internalisation des particules puisque le temps de relaxation des particules adsorbées sur la membrane cellulaire (sous forme de petits agrégats), puis internalisées au sein des endosomes (sous formes ici de membranes décorées vraisemblablement) est bien plus long que le temps de relaxation des particules en solution. Il est donc possible de relier cette augmentation du temps de relaxation à l'étape du processus d'internalisation dans lequel les nanoparticules se trouvent.

Cette technique pourrait ainsi non seulement permettre de détecter et quantifier l'accrochage spécifique d'un effecteur biologique sur les nanoparticules elles-mêmes (principe démontré par (Glockl et al., 2005; Romanus et al., 2002a; Wilhelm et al., 2002b)), mais également l'interaction avec la membrane cellulaire. Cette méthode a l'avantage d'être relativement peu onéreuse et de

pouvoir être intégrée relativement facilement dans un dispositif complet de « laboratoire sur puce ».

Le développement de cette méthode pourrait ainsi servir de base pour détecter la présence d'effecteurs biologiques sur la membrane cellulaire. En utilisant, cette fois-ci, des particules ayant une interaction spécifique avec un effecteur cellulaire particulier, il est théoriquement possible d'analyser au cours du temps la quantité de particules adsorbées sur la membrane par rapport aux particules libres, en les discriminant par leur temps de relaxation.

Une immunodétection couplant une méthode magnéto-optique à des nanoparticules magnétiques fonctionnalisées aurait ainsi deux intérêts principaux : (1) le rapport surface/volume des particules peut permettre d'accrocher une quantité importante d'effecteurs d'intérêt ; (2) des étapes de rinçage, souvent fastidieuse dans les méthodes d'immunodétection classique (tel que la méthode ELISA -Enzyme Linked Immunosorbent Assay-), deviennent moins importantes (puisque les particules libres peuvent être discriminées, il n'est donc pas nécessaire de les éliminer).

Même si la faisabilité de la détection sur cellules vivantes a été démontrée, une détection fiable et sensible demande des aménagements spécifiques du montage expérimental, pour récolter suffisamment de signal sans être gêné par les problèmes de diffusion. De façon à avoir un maximum de cellules sur le trajet optique et donc un maximum de particules contribuant au signal de biréfringence, il est envisageable de travailler dans une structure 3D (non biréfringente) au sein de laquelle les cellules adhèrent. Il est également possible d'augmenter la sensibilité de la mesure en incorporant un système de détection synchrone²¹, qui devrait permettre d'atteindre une sensibilité de l'ordre de 10^6 particules en solution, mais qui limiterait la gamme des temps accessibles à $\tau \gg 1$ ms. Cette limitation serait dans notre cas plutôt un avantage, car le temps de relaxation obtenu sur cellules vivantes dans notre étude est de l'ordre de 20 ms, contre 3.8 μ s pour des nanoparticules libres en solution aqueuse. Le signal détecté ne serait alors dû qu'aux particules liées à la membrane cellulaire. On peut d'ailleurs noter que le temps de relaxation de 20 ms obtenu est un temps intermédiaire entre les particules adsorbées sur la membrane plasmique et les particules internalisées au sein des endosomes. Ce temps de relaxation ne correspond à priori pas cette fois-ci à la taille des objets (il est peu probable que les particules arrivent à entraîner la cellule entière dans leur rotation), mais plutôt à une déformation de la membrane

²¹ Une détection synchrone permet d'extraire du signal seulement la gamme de fréquence qui contient l'information. Cela permet donc de s'affranchir d'une partie du bruit (tel que du rayonnement 50Hz) et donc d'augmenter la sensibilité de la mesure.

cellulaire induite par les particules. Ceci justifierait une dynamique de relaxation beaucoup plus lente que pour les fragments de membranes.

La technique magnéto-optique pourrait donc à terme devenir un nouvel outil diagnostique pour une détection rapide de l'interaction des particules avec la membrane cellulaire.

Nous avons analysé ici un cas particulier d'interaction non spécifique nanoparticules magnétiques citratées/cellules Hela. Dans un premier temps les nanoparticules magnétiques s'adsorbent sur la surface de la cellule, puis sont internalisées au sein de vésicules d'endocytose, formant ainsi des endosomes magnétiques. Ces endosomes apparaissent comme des vésicules dont la membrane intérieure est décorée de nanoparticules, qui ne remplissent pas de façon dense l'espace intérieur 3D. Notons cependant que certains clichés de microscopie électronique (Figure 9.B) laissent supposer que la structure interne pourrait être plus dense pour d'autres couples nanoparticules/cellules, tel que le couple particules ADMS/cellules musculaires lisses. La structure en membranes décorées ne serait pas alors systématique.

Comme nous l'avons mentionné auparavant, le confinement des particules au sein des endosomes est responsable de propriétés de contraste intéressantes pour l'imagerie par résonance magnétique de cellules marquées par ce type de particules. Les champs locaux produits par les particules au sein des endosomes interagissent avec les protons avoisinants, et ce même à grande distance, permettant la visualisation de la zone où se trouvent les cellules marquées magnétiquement, comme nous allons le voir dans le chapitre suivant.

Chapitre 3 :

Un marquage cellulaire pour l'IRM

| | | |
|-------|---|-----|
| 3.1 | ENJEUX ET AVANCEES ACTUELS EN IMAGERIE CELLULAIRE | 60 |
| 3.1.1 | <i>La thérapie cellulaire</i> | 60 |
| 3.1.2 | <i>Imagerie cellulaire : étape de marquage cellulaire</i> | 63 |
| 3.1.3 | <i>Les différentes techniques d'imagerie cellulaire</i> | 64 |
| 3.2 | PRINCIPE DE BASE DE L'IRM | 69 |
| 3.2.1 | <i>Le phénomène de résonance magnétique nucléaire</i> | 69 |
| 3.2.2 | <i>Application d'une impulsion radiofréquence</i> | 71 |
| 3.2.3 | <i>Retour à la position d'équilibre : phénomène de relaxation</i> | 73 |
| 3.2.4 | <i>Détection du signal</i> | 76 |
| 3.2.5 | <i>Création de l'image</i> | 77 |
| 3.2.6 | <i>Séquences d'acquisition des images</i> | 77 |
| 3.3 | LES AGENTS DE CONTRASTE EN IRM..... | 81 |
| 3.3.1 | <i>Agent de contraste de type T1</i> | 82 |
| 3.3.2 | <i>Agent de contraste de type T2</i> | 82 |
| 3.3.3 | <i>Agents de contraste caractérisé par leur relaxivité</i> | 83 |
| 3.4 | LE MARQUAGE MAGNETIQUE | 85 |
| 3.5 | OPTIMISATION DE LA DETECTION DES CELLULES MARQUEES | 86 |
| 3.6 | IRON OXIDE NANOPARTICLE-LABELED RAT SMOOTH MUSCLE CELLS: CARDIAC MR IMAGING FOR CELL GRAFT MONITORING AND QUANTITATION..... | 89 |
| 3.7 | L'ANEVRISME ET LA THERAPIE PAR CELLULES MUSCULAIRES LISSES | 98 |
| 3.8 | MRI ASSESSMENT AND FOLLOW-UP OF IRON LABELED CELLS IN ENDOVASCULAR CELL THERAPY OF ABDOMINAL AORTIC ANEURYSM IN RAT | 101 |
| | <i>Abstract</i> | 101 |
| | <i>Introduction</i> | 102 |
| | <i>Materials and methods</i> | 102 |
| | <i>Results</i> | 104 |
| | <i>Discussion</i> | 107 |
| | <i>Limitations</i> | 108 |
| | <i>Conclusion</i> | 109 |
| 3.9 | MODELE D'INCONTINENCE URINAIRE | 110 |
| 3.9.1 | <i>Problématique</i> | 110 |
| 3.9.2 | <i>Démarche expérimentale</i> | 110 |
| 3.9.3 | <i>Résultats</i> | 112 |
| 3.10 | CONCLUSION ET PERSPECTIVES | 117 |

Chapitre 3

Détection et suivi de cellules en IRM

La possibilité de marquer magnétiquement des cellules fait des nanoparticules magnétiques de bons candidats comme agents de contraste pour l'imagerie cellulaire par la technique d'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM). Ce marquage confère en effet des propriétés magnétiques à la cellule entière, permettant leur détection en IRM. La détection et le suivi de cellules dans l'organisme vivant est particulièrement important pour la validation et le développement de nouvelles modalités thérapeutiques en plein essor actuellement : les thérapies cellulaires.

Après avoir présenté les enjeux et les dernières avancées de la thérapie et de l'imagerie cellulaire, je ferai une brève description du principe de l'IRM et des différentes façons de modifier le contraste des images. Les résultats obtenus sur deux modèles de thérapie cellulaire développés au cours de ma thèse, en collaboration avec plusieurs équipes, seront ensuite présentés sous forme de publications.

Le premier est un modèle de traitement de l'anévrisme par transplantation de cellules musculaires lisses. Il a été développé et validé chez le petit animal par l'équipe de recherche cardiovasculaire de l'Hôpital Henri-Mondor (Allaire et al., 2004b; Allaire et al., 2002). Cette validation n'avait néanmoins pu se faire que par analyse histologique du résultat de cette transplantation de cellules, sans savoir de façon précise quels avaient été le devenir et le rôle des cellules transplantées. Un projet ACI²² a donc été mis en place pour développer une méthode pour la détection et le suivi *in vivo* de ces cellules transplantées. Nous avons dans un premier temps mis au point *in vitro* le

²² Collaboration : INSERM U 698, Université Paris 7 & Paris 13, Hôpital X. Bichat, Paris

Service de Radiologie, Hôpital H. Mondor hospital, Créteil

CNRS UMR 7054, Université Paris 12, Hôpital H. Mondor hospital, Créteil

CNRS UMR 2438, Université Paris 7, Paris

CNRS UPR 2301, Gif sur Yvette

CNRS UMR 7612, Université Paris 6, Paris

Service de Radiologie, Hôpital Tenon, Paris

marquage magnétique des cellules musculaires lisses (CMLs) et analysé l'évolution des propriétés de marquage au cours des divisions cellulaires dans le but d'optimiser l'observation future de ces mêmes cellules, après injection *in vivo*. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans la revue *Radiology*, insérée dans le paragraphe 3.6. Une analyse biochimique de l'effet du marquage magnétique a également été menée. Dans un deuxième temps, le devenir à long terme a été analysé *in vivo* dans un modèle d'anévrisme chez le rat. Les résultats de cette étude, soumis pour publication au *FASEB journal* sont présentés dans le paragraphe 3.8. Grâce au marquage magnétique, nous avons été capable de détecter et localiser ces cellules sur une IRM clinique (1.5T), même un mois après transplantation. Ceci démontre bien l'intérêt d'un tel marquage pour le suivi à long terme d'une population cellulaire à finalité thérapeutique.

Le second modèle est un modèle d'incontinence urinaire chez le porc²³. La thérapie est basée sur l'implantation d'explants de muscle au niveau de la zone lésée, « réservoirs » de cellules à potentialité thérapeutique. Comme dans le modèle de l'anévrisme, cette équipe n'avait aucun moyen de connaître le devenir des explants et des cellules qui en sortent. Là encore, seule une analyse histologique *ex vivo* et un bilan urodynamique pouvaient permettre d'évaluer les résultats de cette thérapie sans aucune possibilité de suivi longitudinal chez le même animal. Nous avons donc mis au point une technique pour marquer magnétiquement ces explants avec deux objectifs principaux : (1) localiser par IRM à bas champ (0.3T) les explants implantés, et éventuellement (2) suivre la migration des cellules sortant de ces explants. Les principaux résultats de cette étude, seront présentés dans le paragraphe 3.9.

3.1 Enjeux et avancées actuels en imagerie cellulaire

3.1.1 La thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire est l'une des modalités thérapeutiques les plus prometteuses à l'heure actuelle. De nombreux chercheurs et médecins ont ainsi bon espoir de soigner de nombreuses pathologies jusque là incurables.

La thérapie cellulaire consiste soit à injecter chez le patient des cellules à forte potentialité thérapeutique, soit à activer et à recruter les propres cellules du patient grâce à des agents biochimiques. La deuxième solution est bien sûr la solution idéale, mais reste pour l'instant un but encore lointain. On commence par exemple tout juste à connaître l'existence de telles cellules adultes pour la régénération neuronale (Eriksson et al., 1998 ; Johansson et al., 1999; Momma et al., 2000; Zhao et al., 2003). Il reste donc tout d'abord un travail d'identification des facteurs clés

²³ collaboration avec le Centre de recherche chirurgicale de l'Hôpital Henri Mondor

pour l'activation et la migration de telles cellules (Hristov et al., 2003 ; Widera et al., 2004; Zhu et al., 2002). Cette thérapie cellulaire de seconde génération n'en est encore qu'au tout début.

En revanche, la transplantation dans l'organisme de cellules à finalité thérapeutique est maintenant arrivée à un stade de maturation. Ces cellules injectées peuvent être soit les propres cellules du patient que l'on aurait activées ou modifiées génétiquement *in vitro* afin de les rendre plus efficaces, soit des cellules souches²⁴ obtenues à partir de moelle osseuse ou d'embryon.

L'emploi de cette stratégie dans des processus immunitaires antitumoraux a été proposé dès les années 1990 (Kimoto, 1992). Le principe est d'injecter des cellules préalablement sensibilisées *in vitro* à des antigènes tumoraux. Les cellules dendritiques, spécialisées dans la présentation d'antigènes, sont en général les cellules de choix. Les cellules injectées sont alors capables d'avoir une réponse immune ciblée contre ces antigènes (Cochlovius et al., 1999), et d'améliorer ainsi l'action immunitaire contre la tumeur en question. Cette immunothérapie a été proposée pour le traitement de nombreux cancers tels que les cancers solides de l'ovaire (Cannon et al., 2004), du colon (Jalili et al., 2004) ou du foie (Ladhams et al., 2002), ou encore les myélomes (Titzer et al., 2000) ou les lymphomes (Flamand et al., 1993). L'emploi de telles cellules comme « vaccin cellulaire » s'avère très prometteur et de nombreux essais pré-cliniques et cliniques sont en cours (Mocellin et al., 2004).

Au niveau du cœur, le potentiel des cellules souches issues de moelle osseuse pour la régénération du myocarde a été récemment démontré (Orlic et al., 2001a ; Orlic et al., 2001b; Silva et al., 2005).

En dehors des cellules souches, de nombreux autres types cellulaires ont été reconnus comme ayant des capacités thérapeutiques. Ainsi, la transplantation de cellules musculaires lisses, apparaît comme une thérapie potentielle pour traiter l'anévrisme (Allaire et al., 2004a), l'ischémie du myocarde (Yoo et al., 2000) et pourrait être utilisée dans les greffes de cœur (Ozawa et al., 2002). Les cellules progénitrices endothéliales sont également une stratégie alternative pour la néovascularisation du cœur ischémié (Kawamoto et al., 2003). Ces études sont maintenant à des stades pré-cliniques et les résultats encourageants ont même conduit à des études cliniques de phase I sur un petit nombre de patients pour le traitement de l'ischémie cardiaque et de l'infarctus du myocarde (Perin et al., 2004; Stamm et al., 2003; Tse et al., 2003).

²⁴ Les cellules souches sont des cellules initialement indifférenciées, qui ont la capacité de se différencier en un lignage cellulaire voulu, sans rapport avec la lignée d'origine. La différenciation des cellules souches vers un type cellulaire donné est activée en fonction de l'environnement tissulaire. Ainsi, les cellules souches de moelle osseuse peuvent générer, après transplantation chez un autre animal, des cellules de type neuronal, myocardique ou hépatique par exemple.

Au niveau du cerveau, il a été montré que des cellules précurseurs endogènes²⁵ ou exogènes²⁶ étaient capables de migrer vers la zone lésée et de se différencier aussi bien en astrocytes, oligodendrocytes²⁷, qu'en neurones, suivant le microenvironnement dans lequel elles se trouvent (Aarum et al., 2003). Des études récentes suggèrent qu'une telle injection cellulaire peut ainsi restaurer des fonctions cérébrales telles que la remyélinisation²⁸ dans un modèle de sclérose en plaque (Ben-Hur et al., 2003; Pluchino and Martino, 2005 ; Pluchino et al., 2003) ou encore le système dopaminergique²⁹ dans la maladie de Parkinson (Isacson et al., 2003; Kim et al., 2002; Sonntag et al., 2005; Zhao et al., 2003).

Néanmoins, toutes ces études ne sont que préliminaires et l'on travaille encore beaucoup pour l'instant « en aveugle ». Les signaux induisant d'une part la migration des cellules vers la zone lésée et d'autre part leur différenciation et leur incorporation au sein des tissus ne sont encore que peu ou pas identifiés. De plus, dans le cas d'injection locale, beaucoup de cellules meurent ou se détachent après la transplantation, ce qui suggère la mise au point de stratégies plus efficaces pour arriver à un meilleur rendement. Ceci est encore plus vrai dans le cas d'injection systémique³⁰, où seul un très faible pourcentage des cellules injectées migrent réellement jusqu'à la zone lésée. Enfin, dans la plupart de ces études, seul le résultat de la thérapie cellulaire est visible, mais pas directement le devenir des cellules transplantées ou injectées. Les méthodes histologiques, nécessitant le sacrifice de l'animal, sont de plus limitées par la variation inter-animaux inhérente au vivant : la validation du résultat ne peut se faire qu'à partir d'une grande statistique.

De façon à suivre, au sein de l'organisme, de façon non-invasive et à long terme, la population cellulaire transplantée, il a donc été nécessaire de développer en parallèle des méthodes d'imagerie cellulaire. Ces méthodes, qui permettent de mieux comprendre et d'appréhender le devenir des cellules transplantées au sein du même organisme, sont primordiales dans l'optimisation des thérapies cellulaires. C'est ce qui fait l'objet de ce chapitre et dont la méthode générale sera décrite dans le paragraphe suivant.

²⁵ Cellules endogènes : qui proviennent de l'organisme

²⁶ Cellules exogènes : qui proviennent d'un autre organisme

²⁷ Les astrocytes et les oligodendrocytes sont des cellules gliales. Les oligodendrocytes sont à l'origine de la formation des gaines de myéline des axones dans le système nerveux central, tandis que les astrocytes, cellules souvent de forme étoilée, comportent des prolongements cytoplasmiques qui forment les pieds vasculaires et constituent la barrière hémato-cérébrale

²⁸ La myéline est une substance constituée de lipides et de protéines qui forme une gaine entourant certaines fibres nerveuses. La myéline agit à la fois comme isolant des fibres nerveuses et comme accélérateur de la transmission de l'influx nerveux.

²⁹ Le système dopaminergique est un système cérébral qui gère d'importantes fonctions stimulantes, motrices et cognitives. Ce système est en partie détruit dans la maladie de Parkinson.

³⁰ Injection systémique : injection au niveau de la circulation (par voie intraveineuse le plus souvent). Est opposé en général à l'injection locale.

3.1.2 Imagerie cellulaire : étape de marquage cellulaire

Pour détecter ces cellules, il est d'abord nécessaire de les marquer avec un traceur adapté à la méthode d'imagerie utilisée. Ce sera alors non pas les cellules qui seront détectées, mais les traceurs qui lui sont associés.

Suivant l'application, il existe deux grandes techniques de marquage : (1) soit les cellules sont marquées *in vitro*, avant d'être injectées dans l'organisme ; (2) soit c'est le traceur, spécifique à un type cellulaire particulier, qui est injecté dans l'organisme. Il est sensé alors se fixer uniquement sur les cellules d'intérêt.

La difficulté du deuxième type de marquage réside dans sa spécificité. Il pose des problèmes physicochimiques et biochimiques souvent difficiles à résoudre qui ne seront pas exposés dans le cadre de cette thèse. Ce type d'approche est possible pour l'imagerie des macrophages, en utilisant des particules préférentiellement internalisées par des cellules phagocytaires (Floris et al., 2004 ; Ye et al., 2002). De nombreuses recherches sont faites à l'heure actuelle pour trouver des produits physico-chimiques intelligents capables de cibler *in vivo* une population cellulaire potentiellement thérapeutique ou au contraire des cellules responsables de la pathologie. Ainsi, l'utilisation d'anticorps associés à des nanoparticules superparamagnétiques a permis d'imager le trafic des cellules immunitaires dans le système nerveux central (Pirko et al., 2004). Une voie également intéressante consiste non pas à injecter le traceur directement, mais un vecteur de gènes, qui, une fois en contact avec la population cellulaire cible, sera capable de lui faire exprimer ce traceur. Cette approche a été utilisée récemment pour induire la production par la cellule elle-même, d'agents de contraste IRM (Genove et al., 2005).

Néanmoins dans le cadre des thérapies cellulaires, la méthode la plus employée à l'heure actuelle reste le marquage *in vitro*, puisque la plupart des thérapies cellulaires nécessitent une phase de culture *in vitro* pour la prolifération, l'activation et/ou la différenciation des cellules. C'est cette technique qui a été employée dans le cadre de cette thèse et qui sera donc détaillée dans ce manuscrit.

Il est bien évident que le traceur ou « marqueur cellulaire » idéal doit remplir un certain nombre de conditions. Le premier point du cahier des charges d'un tel marqueur est sa **biocompatibilité**. Il ne doit ni affecter la prolifération et le phénotype cellulaire, ni altérer les fonctionnalités cellulaires, notamment celles qui en font des agents thérapeutiques. Les cellules souches doivent garder leur capacité de différenciation par exemple.

Le deuxième point que doit vérifier un marqueur cellulaire est **sa stabilité dans le temps**. Ce point est notamment crucial pour le suivi de populations à long terme. Pour être stable, il est préférable que **le marqueur soit internalisé par les cellules**. En effet, si le traceur est

simplement attaché sur la membrane cellulaire, il peut facilement interagir avec les autres cellules, et être transmis à des cellules voisines. Il est également important de savoir comment ce marquage cellulaire va être réparti lors des divisions cellulaires et de s'assurer qu'il perdure dans le temps.

Enfin, de façon à avoir la meilleure sensibilité possible et être capable de détecter *in vivo* le plus petit nombre possible de cellules, **les propriétés de contraste** du marqueur sont également importantes.

Toutes les techniques de marquage cellulaire s'emploient à l'heure actuelle à essayer de vérifier tous ces critères. Ces critères vont dépendre bien évidemment du traceur lui-même, mais également de la technique d'imagerie utilisée. C'est le couple traceur-imageur qu'il faut optimiser.

3.1.3 Les différentes techniques d'imagerie cellulaire

Le développement de nouvelles méthodes d'imagerie *in vivo* ont vu le jour en même temps que le développement des modèles animaux pour la mise au point des traitements de thérapie cellulaire ou moléculaire. Parmi celles-ci, les plus utilisées sont la scintigraphie, les méthodes optiques et l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

La scintigraphie

Les techniques de scintigraphie, par émission de positrons (TEP) ou rayonnement γ sont des techniques permettant une imagerie fonctionnelle avec une très bonne sensibilité. Ces techniques sont d'ores et déjà utilisées en clinique chez l'homme. Pour l'imagerie cellulaire, différents radiotraceurs peuvent être utilisés. Par exemple le cuivre-64-pyruvaldehyde-bis(N4-methylthiosemicarbazone) (^{64}Cu -PTSM) peut permettre de suivre le trafic cellulaire *in vivo* par TEP (Adonai et al., 2002). De même, l'utilisation de l'hexaméthylpropylèneamine oxime (HMPAO) marqué au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ peut permettre de visualiser les cellules marquées à l'aide d'un émetteur γ (Roddie et al., 1988). La scintigraphie a l'avantage de délivrer des informations quantitatives.

Le principal inconvénient de ce type d'imagerie est la rapide disparition du radiotraceur (au bout de quelques heures à 1 ou 2 jours au maximum). En effet, l'utilisation de traceurs à période longue est impossible chez l'homme pour des problèmes de radioprotection ou de radiotoxicité. Ce type d'imagerie ne permet donc qu'une analyse des événements précoces de la thérapie cellulaire.

Le deuxième désavantage est l'absence complète d'informations anatomiques et la très faible résolution spatiale de l'image obtenue. Ceci limite la précision de la localisation de la population cellulaire ciblée à l'échelle de l'organe.

Méthodes optiques

La source de contraste des méthodes optiques repose soit sur la bioluminescence, soit sur la fluorescence, soit sur l'absorption. Associées à ces différents marqueurs, des techniques de microscopie de fluorescence non-invasives se sont développées : tomographie optique de diffusion (Ntziachristos et al., 2000), imagerie proche infra-rouge (Mahmood and Weissleder, 2003), imagerie confocale (Gonzalez and Tannous, 2002; Seylaz et al., 1999), imagerie multiphotons (Buehler et al., 1999 ; Coudrier et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005; Ohki et al., 2005) ou encore microscopie intravitale (Laemmel et al., 2004; Mempel et al., 2004).

Même si les tissus sont des matériaux relativement opaques, il existe néanmoins une fenêtre dans le proche infra-rouge qui permet de recueillir des photons émis par des sources situées en profondeur dans les tissus *in vivo*. En effet, les longueurs d'ondes dans le rouge et l'infra-rouge (entre 600 et 900 nm) sont relativement peu absorbées par les tissus (Contag and Ross, 2002) (l'absorption dû à l'hémoglobine est alors minimale). Les sources de contrastes émettant dans cette gamme sont donc des marqueurs privilégiés pour imager en profondeur *in vivo*.

Les méthodes optiques ont ainsi permis d'avoir une meilleure connaissance sur les processus mis en jeu aussi bien au niveau moléculaire et cellulaire qu'au niveau de l'organe et du tissu. Un des intérêts de ces méthodes est leur relative simplicité de mise en place et d'utilisation et la rapidité à laquelle il est possible d'acquérir des images. La détection optique permet ainsi une réelle imagerie dynamique. Aujourd'hui, grâce aux progrès dans les méthodes d'excitation et de détections, telles que les diodes lasers et les caméras CCDs, il est possible d'analyser des dynamiques de l'ordre de la seconde (Hardy et al., 2001), voire en temps réel (1/30s)(Yang et al., 2000).

La détection optique de cellules marquées est particulièrement intéressante pour l'étude sur petits animaux telle que la souris, où les moyens modernes de détection permettent de s'affranchir des problèmes de profondeur de pénétration. En revanche, ceci est à nouveau un obstacle pour les modèles sur plus gros animaux, et bien évidemment pour l'utilisation chez l'homme. La profondeur de pénétration au sein de l'organisme à imager reste le principal désavantage: elle varie suivant les méthodes d'excitation et de détection utilisées pour donner le contraste à l'image, mais ne dépasse pas les quelques centimètres (Licha and Olbrich, 2005). De plus, même si la sensibilité des marqueurs est très bonne, la diffraction de la lumière limite la résolution spatiale des imageurs « animal entier ». La bioluminescence par exemple, ne permet qu'une localisation

des cellules dans l'organe où elles se trouvent. Tout comme la scintigraphie, la détermination de leur position exacte au sein de l'organe n'est pas possible.

En fait, la plupart des méthodes optiques doivent faire un compromis entre la profondeur de pénétration et la résolution spatiale. Une bonne résolution spatiale n'est possible que sur des systèmes permettant une imagerie pour des profondeurs relativement faibles. C'est le cas de la microscopie intravitale tel que le tout récemment développé Cell-vizio™ (Laemmel et al., 2004)³¹, un microscope fluorescent confocal à fibre optique, qui permet d'imager au sein de l'organisme jusqu'à une profondeur de pénétration de 80 à 100 µm, avec une résolution latérale de 2.5 µm.

Dans le cadre de l'étude sur le guidage magnétique (chapitre 4), une microscopie confocale 2D, permettant une imagerie en temps réel (50 images/s) au sein du cerveau de la souris sur une profondeur de 200 µm a été utilisée. La visualisation directe de la microcirculation intracérébrale est réalisée grâce à la combinaison d'un microscope 2D et d'une technique neurochirurgicale permettant la mise en place de manière chronique d'une fenêtre intracrânienne³² (Seylaz et al., 1999). Cette technique originale est donc particulièrement intéressante pour l'étude des pathologies cérébrovasculaires *in vivo*. Elle nous a permis ici de suivre la dynamique d'accumulation de magnétoliposomes au sein de la microcirculation cérébrale.

Le récent développement de la microscopie multiphoton ouvre également de nouvelles possibilités : en combinant la microscopie confocale à l'excitation multiphoton, il est en effet possible, tout en limitant la phototoxicité de créer des images de tissus *in vivo* 3D avec une très bonne résolution (résolution cellulaire) et ceci, à des profondeurs deux à trois fois supérieures à la microscopie confocale (de l'ordre de 300 µm) (Williams et al., 2001).

Les marqueurs exogènes

Les marqueurs fluorescents les plus simples sont des fluorochromes organiques qui vont soit s'insérer dans la membrane plasmique, soit être internalisés par la voie d'endocytose. L'imagerie simultanée de fluorochromes indépendants est cependant difficile car les spectres d'excitation et d'émission se chevauchent souvent. De plus, ces fluorochromes peuvent facilement être dégradés par voie métabolique, ce qui réduit leur utilisation *in vivo* à long terme. Dans l'étude présentée au paragraphe 3.8, nous avons fait le choix du PKH26 comme marqueur fluorescent, un fluorochrome qui s'incorpore dans les régions lipidiques de la membrane cellulaire, grâce à une longue chaîne aliphatique. L'intérêt de ce marqueur est sa relative longévité (15 jours dans notre étude *in vivo*), sans transfert du marquage d'une cellule à l'autre (Ford et al., 1996).

³¹ Le Cell-vizio™ est commercialisé par la société Mauna Kea Technologies

³² Voir la figure 1 de l'article présenté dans le paragraphe 4.3 du chapitre 4 pour plus de détail.

De nouveaux marqueurs sont en plein essor actuellement: les quantum dots, des nanocristaux semiconducteurs dont les longueurs d'onde d'absorption et d'émission peuvent être facilement contrôlées, puisqu'elles dépendent de la taille des nanocristaux. Il est ainsi possible de couvrir tout le spectre visible et proche infra-rouge (Jaiswal et al., 2003). Ce type de marqueur a récemment montré son utilité pour l'imagerie cellulaire (Jaiswal et al., 2003; Stroh et al., 2005; Voura et al., 2004).

Même si certains marqueurs comme le PKH26 ont prouvé leur capacité dans le suivi cellulaire *in vivo* jusqu'à 15 jours, le principal inconvénient des marqueurs exogènes est la perte du marquage au cours du temps : la division cellulaire dilue le marquage et limite l'utilisation de ce type de marqueurs à très long terme.

Les marqueurs endogènes

Certains de ces obstacles ont été surmontés par l'utilisation de gènes rapporteurs, utilisant comme promoteur un gène codant pour une molécule servant de marqueur. Les plus utilisés sont le système de bioluminescence faisant intervenir la luciférase/luciférase (Edinger et al., 2003; Wu et al., 2001) et la « green fluorescent protein » (GFP) (Wang et al., 2002b). Néanmoins, ces techniques nécessitent un transfert de gène, ce qui pose des problèmes éthiques pour leur utilisation chez l'homme.

L'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)

Le principe de l'IRM et les différents types de marqueurs qui lui sont associés seront détaillés dans le paragraphe suivant.

Parmi les différentes techniques d'imagerie, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) a deux avantages principaux : (1) il est possible d'imager le corps entier, et (2) la résolution spatiale peut atteindre le niveau cellulaire (25-50 μm). Il est en effet possible d'imager des régions anatomiques sans limitation en profondeur. Sa sensibilité aux produits de contraste IRM, bien qu'inférieure à la médecine nucléaire, reste bonne grâce à l'utilisation de particules superparamagnétiques à fort effet T_2 et T_2^* , comme nous le verrons par la suite. Ainsi, l'IRM en association avec des marqueurs cellulaires, grâce à sa résolution élevée et aux repères anatomiques et fonctionnelles qu'elle peut offrir, est une technique de choix pour l'imagerie cellulaire.

Complémentarité des techniques

Toutes ces méthodes sont bien entendu complémentaires : la tomographie par émission de positrons et les méthodes optiques sont des techniques très sensibles pour l'imagerie moléculaire, alors que l'IRM permet d'imager avec une très bonne résolution spatiale la structure ainsi que les fonctions impliquées.

De nombreuses approches combinant plusieurs de ces imageries ont récemment vu le jour. Ainsi, pour palier aux problèmes de pénétration rencontrés en imagerie optique, l'équipe de Weissleder, (Ntziachristos et al., 2002; Ntziachristos and Weissleder, 2002) a développé un système d'imagerie tomographique, appelée « fluorescence-mediated tomography (FMT) », qui permet de produire des images 3D et, en la fusionnant aux images IRM, une quantification absolue du signal de fluorescence (Figure 17).

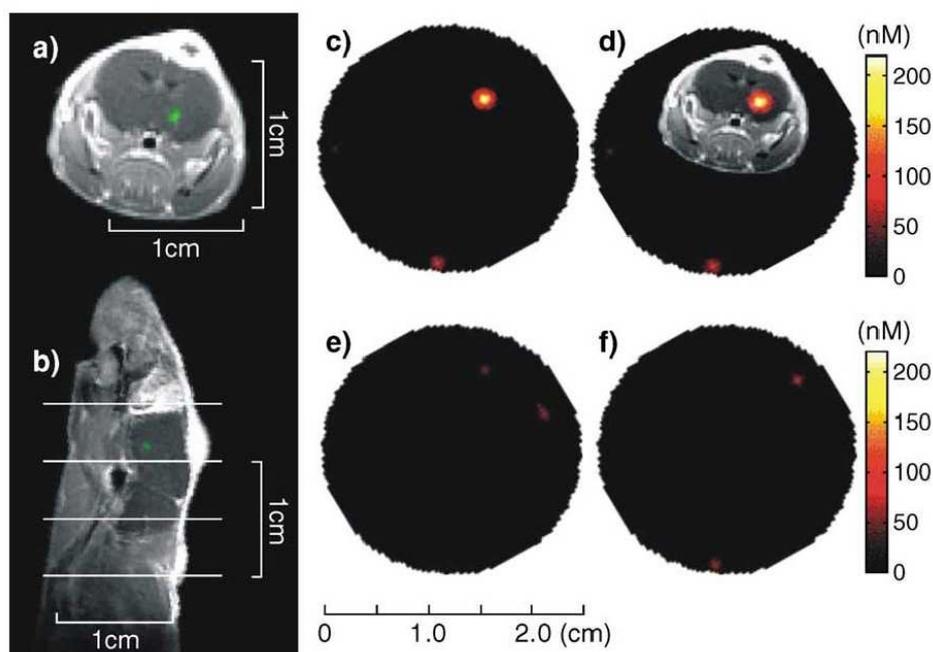


Figure 17.

Image IRM et de tomographie méditée par la fluorescence (FMT) d'une souris avec un gliosarcome (tumeur maligne du cerveau) après injection d'un marqueur d'expression d'une enzyme impliquée dans l'invasion tumorale. Cette imagerie permet d'imager l'activité de l'enzyme. (a) et (b) coupe axiale (a) et sagittale (b) obtenue par IRM sur un animal possédant une tumeur (en vert sur l'image, après ajout d'un agent de contraste IRM : le gadolinium). (c) à (f) coupes obtenues par FM de haut en bas à partir du volume d'intérêt indiqué sur l'image IRM (b, traits blancs). (d) Superposition de la coupe axiale obtenue par IRM (a) et de l'image FMT correspondante (c), en redimensionnant l'image d'IRM par rapport à l'image FMT. D'après (Ntziachristos and Weissleder, 2002)

D'autres exemples combinent l'imagerie TEP et la « Computed Tomography » CT (Schoder et al., 2003).

Pour l'imagerie cellulaire, des agents de contrastes multifonctionnels, notamment pour les essais chez le petit animal offrent donc de nombreux avantages et sont actuellement en plein développement. En couplant à un agent de contraste IRM, un traceur fluorescent, ces agents multifonctionnels peuvent par exemple permettre une imagerie non-invasive des cellules ainsi marquées par IRM et une confirmation histologique grâce aux marqueurs fluorescents (Modo et al., 2004). C'est la démarche que nous avons adoptée dans le modèle de thérapie cellulaire des anévrisme (article présenté au paragraphe 3.8)

3.2 Principe de base de l'IRM³³

L'IRM est une imagerie de la résonance magnétique des protons des molécules d'eau présentes dans l'organisme, ou plutôt une imagerie de leur densité et de leurs temps de relaxation. Ces temps de relaxation vont dépendre de leur environnement et le contraste généré différera en fonction des degrés de liberté des molécules d'eau. Ce sont les différences au niveau de l'environnement de l'eau au sein des différents tissus que l'IRM détecte et qui permet de générer des images anatomiques. Ceci permet donc de distinguer non seulement le muscle des os, mais également de repérer des modifications dans l'agencement cellulaire au niveau tissulaire. Une zone cancéreuse par exemple, n'aura pas le même contraste qu'une zone saine. Le contraste sur les images IRM provient ainsi à la fois des propriétés chimiques, physiques et biologiques du tissu. Des changements subtils dans les tissus (densité de protéines, oedème, etc...) affecteront les interactions magnétiques entre protons. Ce sont ces interactions qui créent principalement le contraste IRM, et qui donc permet la différenciation entre les tissus.

3.2.1 Le phénomène de résonance magnétique nucléaire

Moment magnétique et aimantation des protons

L'imagerie par résonance magnétique est basée sur le même principe que la résonance magnétique nucléaire (RMN) avec en plus un module de traitement du signal permettant la formation des images. L'IRM utilise principalement les propriétés magnétiques de l'hydrogène et son interaction avec le champ magnétique.

L'hydrogène ne possède qu'un seul proton, et donc un seul spin nucléaire (voir chapitre 1 pour la définition). Cette rotation provoque l'apparition d'un moment magnétique nucléaire (Figure 18).

³³ Cette partie a été rédigée à partir de :

Faulkner, W. (1996). Basic principle of MRI: copyright OutSource, Inc., publié en ligne (http://www.e-radiography.net/mrict/Basic_MR.pdf).

Puddephat, M. (2003). Principle of Magnetic Resonance Imaging: copyright easymeasure Ltd.

Alaux, A. (1992). L'image par résonance magnétique: Sauramps Medical.

Bittoun, J. (2004). L'imagerie par résonance magnétique, cours donné au PCEM2 de l'UFR médicale de kremlin Bicêtre: publié en ligne (<http://www.kb.u-psud.fr/kb/niveau2/enseignements/niveau3/etudmed/cours-irm/accueil.htm>).

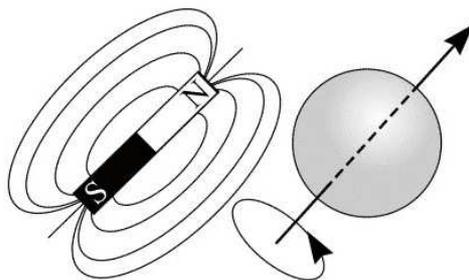


Figure 18

Un noyau en rotation acquiert un moment cinétique ou spin. La charge positive du noyau d'hydrogène en rotation fait alors apparaître un moment magnétique. D'après (Puddephat, 2003).

C'est ce moment magnétique que l'on étudiera en IRM. Le cœur de l'IRM est donc cette rotation du noyau.

En IRM, au lieu de parler de moment magnétique, on emploie souvent la notion d'aimantation. Au sens strict, l'aimantation représente le moment magnétique par unité de volume. En IRM, la confusion est légitime car la mesure se fait par unité de volume.

En l'absence d'un champ magnétique, les moments magnétiques protoniques sont orientés de façon aléatoire. **En présence d'un champ magnétique B_0** , les moments magnétiques vont s'aligner avec le champ magnétique et **il en résulte une aimantation nucléaire macroscopique globale M_0** . **L'aimantation est directement proportionnelle à la densité locale de protons** : plus il y a de protons par unité de volume, plus le signal est important.

La théorie de la RMN fait appel à la mécanique quantique. Il est néanmoins possible de comprendre les phénomènes principaux impliqués dans la formation des images RMN en utilisant un formalisme de mécanique classique. Cette approximation se justifie à l'échelle macroscopique par le très grand nombre de spins contenus dans chaque élément de volume servant à faire l'image RMN. Le principe de l'IRM sera donc exposé dans la suite de ce chapitre principalement par un formalisme de mécanique classique.

Fréquence de résonance de l'aimantation nucléaire

Chaque spin va tourner (ou précesser) autour d'un champ statique B_0 à une fréquence qui lui est propre, appelée **fréquence de résonance** (Figure 19).

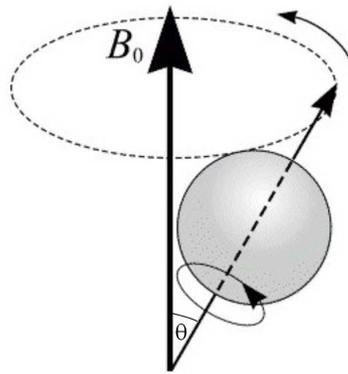


Figure 19

Les moments magnétiques ne sont pas strictement parallèles au champ magnétique B_0 , mais forment un angle (θ) constant avec la direction du champ. Ils précessent autour de B_0 à la fréquence $\omega_0 = \gamma B_0$. C'est la précession de Larmor. D'après (Puddephat, 2003).

La fréquence de résonance ν du proton est donnée par l'équation de Larmor :

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 \quad \text{Eq.3.1}$$

avec ν le plus souvent exprimé en Mégahertz (MHz) et B exprimé en Tesla (T). Au lieu de ν , on utilise également la fréquence angulaire ω_0 (Eq. 3.2).

$$\omega_0 = 2\pi\nu = \gamma B_0 \quad \text{Eq.3.2}$$

Cette fréquence est donc proportionnelle à l'intensité B_0 du champ magnétique environnant. La constante γ est appelée rapport gyromagnétique du proton. Pour le noyau d'hydrogène :

$$\frac{\gamma}{2\pi} = 42.6 \text{ MHz / T} \quad \text{Eq.3.3}$$

Cela signifie que pour basculer l'aimantation d'une population de noyaux d'hydrogènes dans un champ magnétique de 1.5T, il faut une énergie de 63.87 MHz. Il s'agit d'ondes dans le domaine radiofréquence.

3.2.2 Application d'une impulsion radiofréquence

En présence du champ magnétique principal B_0 (orienté selon z sur la Figure 20), tous les spins sont donc orientés dans le champ magnétique principal parallèlement au champ B_0 et précessent à leur fréquence propre, la fréquence de Larmor. Il en résulte une aimantation globale M_0 , dirigée selon O_z . Appliquons maintenant, pendant quelques millisecondes, une impulsion radiofréquence. Une onde radiofréquence est une onde électromagnétique, et transporte donc un champ électrique et un champ magnétique. Seul le champ magnétique B_1 nous intéresse en IRM. Le champ magnétique B_1 , perpendiculaire à B_0 , a une intensité bien inférieure à B_0 , mais, si ce

champ oscille à la même fréquence que la rotation de chacun des spins (leur fréquence de résonance ω_0), alors, il peut modifier leur état. C'est ce qui se passe avec l'onde radiofréquence utilisée de fréquence $\omega_0 = \gamma B_0$. Dans le référentiel tournant autour de B_0 à la fréquence de Larmor $\omega_0 = \gamma B_0$, l'aimantation macroscopique M_0 précesse autour de B_1 , à la fréquence $\omega_1 = \gamma B_1$. Pendant l'impulsion, B_1 peut alors faire basculer l'aimantation par rapport à sa position initiale et l'écartier de la direction Oz (Figure 20.B).

L'angle θ (ou angle de bascule) entre Oz et M_0 peut ainsi être calculé par la relation :

$$\theta = \omega_1 t = \gamma B_1 t \quad \text{Eq.3.4}$$

dans laquelle B_1 est l'amplitude du champ magnétique radiofréquence et t sa durée d'application. C'est donc la durée de l'impulsion t qui déterminera la position finale de l'aimantation.

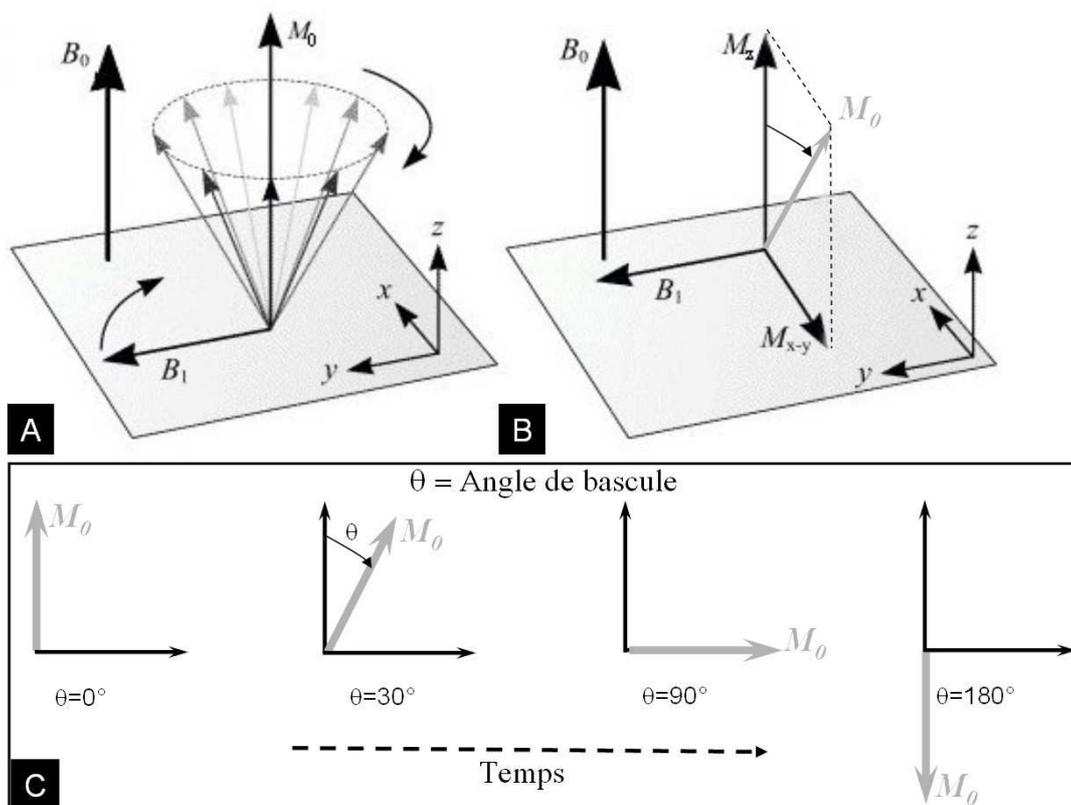


Figure 20

Une onde radiofréquence introduit un second champ magnétique B_1 dans le plan perpendiculaire à B_0 (x-y). (B) Ce champ magnétique fait basculer M_0 de sa position initiale (orientation longitudinale selon B_0) d'un certain angle θ . M_0 peut alors être décomposée en une composante parallèle M_z et une composante perpendiculaire au champ M_{x-y} . (C) les angles θ ou angles de bascule les plus couramment utilisés sont les angles $\theta = 0, 30, 90$ et 180° . D'après (Puddephat, 2003).

On caractérise cette impulsion par l'angle θ dont elle fait basculer l'aimantation. En IRM, au lieu de parler d'impulsion radiofréquence, on parle d'ailleurs souvent d'impulsion d'excitation. Ainsi,

on parle d'impulsion de 30° , 90° ou 180° , selon qu'à la fin de l'impulsion, l'aimantation a été basculée de 30° , 90° ou 180° (Figure 20.C).

M_0 peut alors être décomposé en deux composantes :

- une composante selon M_z , dite **composante longitudinale**
- une composante dans le plan xy, M_{xy} , dite **composante transversale**, perpendiculaire à B_0 .

Une impulsion de 90° bascule M_0 dans le plan transverse xy et on a $M_z=0$ et $M_{xy}=M_0$, alors qu'une aimantation de 180° inverse la direction de l'aimantation M_0 et on a $M_z = -M_0$ et $M_{xy}=0$.

3.2.3 Retour à la position d'équilibre : phénomène de relaxation

A la fin de l'impulsion radiofréquence, les spins vont retourner vers leur position d'équilibre et l'aimantation globale retrouvera son orientation de départ : parallèle à B_0 . Il y a donc simultanément diminution rapide de la composante transversale M_{xy} et récupération progressive de la composante longitudinale M_z . Ce retour à l'équilibre est connu sous le nom de précession libre, ou « Free Induction Decay » (FID, Figure 21).

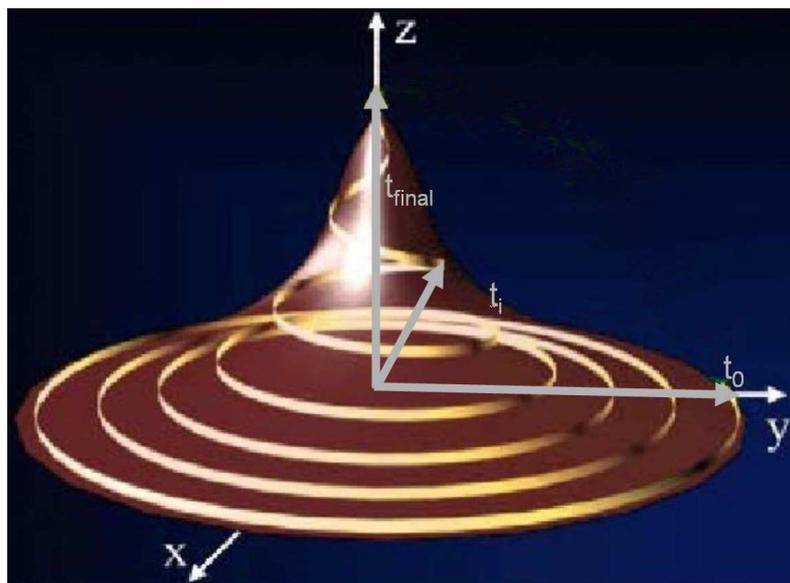


Figure 21

Retour à l'équilibre de l'aimantation nucléaire (ou Free Induction Decay –FID–). En général, on décompose cette précession en 2 composantes M_z et M_{xy} . Le temps de relaxation T_1 caractérise la récupération de la composante longitudinale M_z . Le temps de relaxation T_2 caractérise la diminution de la composante transversale M_{xy} . A la fin de l'impulsion radiofréquence, pour une impulsion de 90° , l'aimantation est dans le plan x-y (t_0). Cette composante diminue petit à petit pendant que la composante longitudinale est récupérée (t_i), jusqu'au retour à l'équilibre où la composante transversale a totalement disparue et la composante longitudinale est totalement récupérée (t_{final}). T_1 est généralement supérieur à T_2 . D'après (Bittoun, 2004)

Pour décrire cette relaxation, on considère séparément les composantes transversales et longitudinales. Ces relaxations ont d'ailleurs des origines différentes : la relaxation longitudinale

est due à un transfert d'énergie (retour à un niveau d'énergie plus bas), alors que la relaxation transversale est due au déphasage des spins entre eux.

Trois facteurs principaux influencent la relaxation de l'aimantation : (1) les inhomogénéités de champ, (2) la relaxation longitudinale T_1 et (3) la relaxation transversale T_2 .

Relaxation longitudinale (T_1) ou relaxation spin-réseau

Pour retourner à l'équilibre, les noyaux vont dissiper leur excès d'énergie en chaleur à l'environnement (ou réseau). Les noyaux vont se réaligner avec le champ B_0 , et l'aimantation longitudinale va donc progressivement retourner à sa valeur de départ. Le temps qu'il faut aux noyaux pour retourner à leur position d'équilibre dépend du taux de dissipation de l'énergie en excès par le réseau. On peut démontrer que ce processus de retour à l'équilibre va ainsi suivre une loi exponentielle de la forme :

$$M_z = M_0(1 - e^{-\frac{t}{T_1}}) \quad \text{Eq.3.5}$$

Le temps T_1 , désigne le temps de relaxation longitudinale. A la fin de la durée T_1 , l'aimantation longitudinale a récupéré environ 63% de sa valeur d'équilibre (Figure 22).

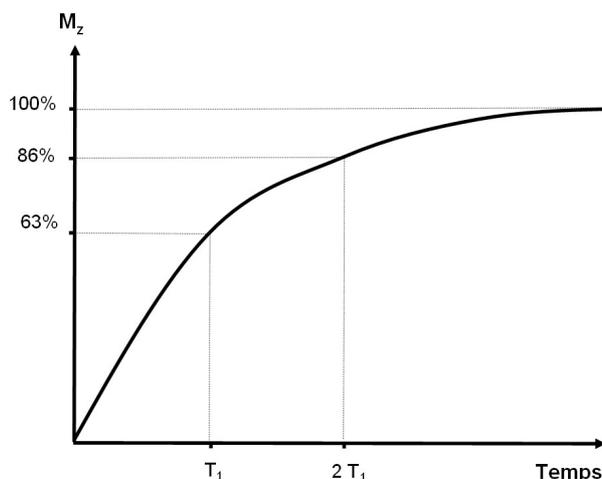


Figure 22

Évolution de la composante longitudinale de l'aimantation après la fin de l'impulsion radiofréquence de 90° .

Cette relaxation ne peut se faire que grâce au mouvement des molécules environnantes. En effet, le champ tournant B_1 n'est plus disponible pour fournir l'énergie aux spins pour changer d'état. Ce temps de relaxation T_1 variera donc en fonction des molécules du tissu biologique dans lequel les protons sont présents. Par exemple, les protons dans un environnement lipidique ont un temps T_1 plus court que ces mêmes protons dans un environnement aqueux.

A 1.5 T, l'ordre de grandeur pour le T_1 des tissus biologiques est de 300 ms à 1000 ms.

Relaxation transverse (T_2) ou relaxation spin-spin

La composante transversale va disparaître petit à petit lors du retour à l'équilibre. La diminution de la composante transversale de l'aimantation suit également une loi exponentielle, de la forme :

$$M_{xy} = M_0 e^{-\frac{t}{T_2}} \quad \text{Eq.3.6}$$

Le temps T_2 désigne le temps de relaxation transversale. Pendant une durée T_2 , l'aimantation transversale perd environ 63% de sa valeur initiale (Figure 23).

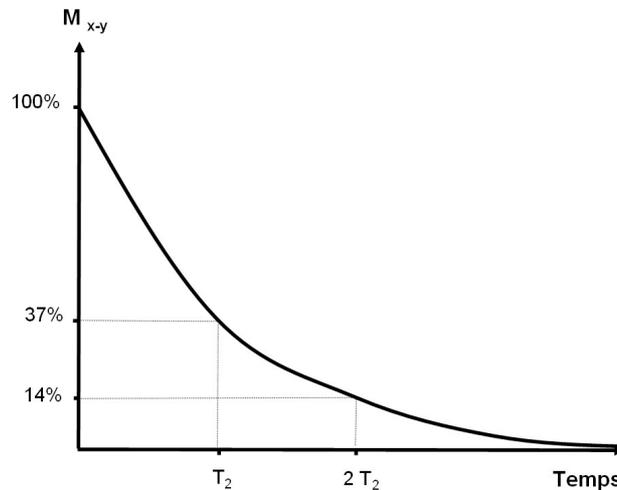


Figure 23.

Évolution de la composante transversale de l'aimantation après la fin de l'impulsion radiofréquence de 90° .

La relaxation transversale est due à l'interaction des spins entre eux, le paramètre T_2 est d'ailleurs aussi appelé temps de relaxation spin-spin. L'interaction spin-spin va engendrer un déphasage entre les spins. En effet, un déphasage se produit entre les spins s'ils diffèrent par leur vitesse de précession, c'est-à-dire, d'après la relation de Larmor, par l'intensité du champ magnétique local.

Chaque noyau est ainsi soumis au champ B_0 , légèrement modifié par les propriétés magnétiques des spins environnants. Les structures moléculaires de chaque tissu dans lequel l'hydrogène existe déterminent donc la vitesse à laquelle cette relaxation spin-spin se fait. Ce temps T_2 est d'autant plus long que l'échantillon est fluide. Les champs locaux sont alors moyennés par le mouvement brownien (agitation thermique), et il y a donc peu ou pas de champs locaux pour favoriser le déphasage des protons. Le temps de relaxation T_2 est donc long.

Par exemple, le liquide céphalo-rachidien (composé en grande partie d'eau) a un temps de relaxation relativement long alors que la graisse a un temps de relaxation beaucoup plus rapide. L'ordre de grandeur pour le T_2 des tissus biologiques est d'environ 50 ms à 100 ms. (Il est donc environ 10 fois plus court que le T_1 , tableau 2).

| Tissus Humains | Temps de relaxation | |
|----------------------------------|---------------------|---------|
| | T1 (ms) | T2 (ms) |
| Liquide Céphalo-rachidien | 2500 | 2000 |
| Substance Grise | 900 | 90 |
| Substance Blanche | 750 | 80 |
| Graisse | 300 | 40 |

Tableau 2

Valeurs des temps de relaxation longitudinale (T_1) et transversale (T_2) de certains tissus humains à 1.5 T. Ces valeurs varient en fonction du champ B_0 et ne sont donc pas des valeurs absolues. En revanche, la hiérarchie des valeurs est généralement respectée. Sauf pour les liquides, le T_1 est généralement dix fois plus faibles que le T_2 . D'après (Bittoun, 2004).

Relaxation transverse (T_2^*)

Dans le temps de relaxation T_2 , seul intervient le déphasage dû aux caractéristiques physico-chimiques de l'échantillon. Ceci est vrai pour un élément de volume élémentaire, mais ce n'est plus le cas lorsque le volume étudié atteint les dimensions d'un élément de volume macroscopique. En réalité, on ne peut pas négliger les non-uniformités du champ magnétique dans le volume exploré. Le déphasage est alors également dû aux inhomogénéités du champ magnétique, faisant intervenir un autre temps de relaxation : T_2' . Le temps de relaxation transverse réel n'est donc pas T_2 , mais T_2^* qui prend en compte ces inhomogénéités :

$$\frac{1}{T_2^*} = \frac{1}{T_2} + \frac{1}{T_2'} \quad \text{Eq.3.7}$$

Cette relaxation est donc plus rapide que celle qui ne prendrait en compte que le T_2 .

3.2.4 Détection du signal

En résumé, après avoir placé l'échantillon à étudier dans un champ magnétique intense, une impulsion de radiofréquence permet d'incliner l'aimantation nucléaire par rapport à sa position d'équilibre. **Cette aimantation est ensuite mesurée lors de son retour à l'équilibre.** Le système de détection est constitué de bobines ou antennes de réception (Figure 24). Ces bobines, placées au voisinage de l'échantillon, perpendiculairement au champ B_0 seront parcourues par un courant, induit par le retour à l'équilibre de l'aimantation nucléaire. C'est ce courant induit qui est

mesuré après amplification. Le courant dépendra donc du signal de précession libre de retour à l'équilibre des protons. C'est le principe du signal de détection de l'IRM.

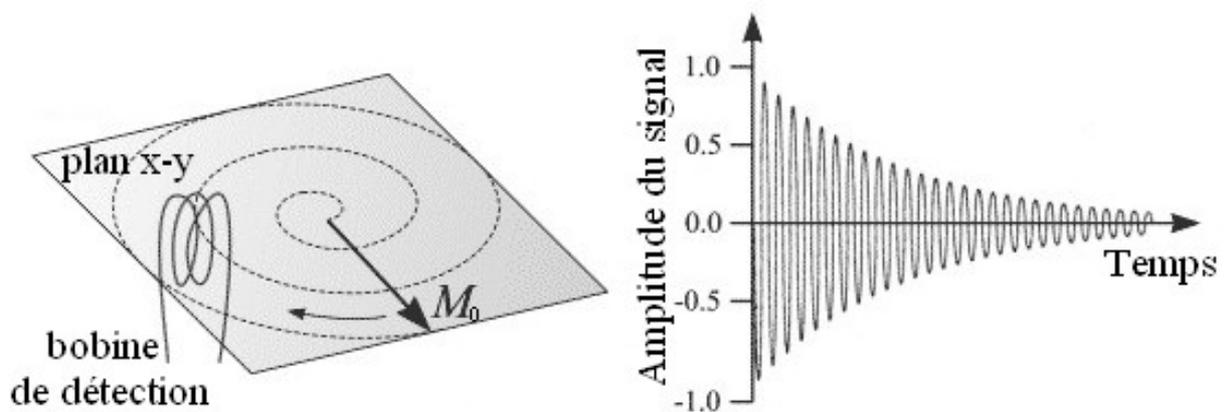


Figure 24

Après une impulsion radiofréquence de 90° , l'aimantation M_0 est dans le plan transverse x-y et tourne autour de l'axe z. La composante M_{xy} de M_0 dans la plan x-y diminue au cours du temps, induisant un courant alternatif dans la bobine de détection. (B) Signal détecté par la bobine. D'après (Puddephat, 2003).

3.2.5 Création de l'image

Afin de permettre la localisation spatiale du signal et reconstituer une image pixel par pixel, il s'ensuit tout un processus de traitement du signal pour coder le signal en fréquence (par transformée de Fourier) et en phase, qui ne sera pas détaillé ici. En IRM, l'image est ainsi constituée par la juxtaposition de surfaces élémentaires appelées pixels. Le niveau de gris de chaque pixel est représentatif du signal émis par l'aimantation du volume élémentaire correspondant, appelé voxel, de la coupe anatomique étudiée. Pixel et voxel sont respectivement les contractions de la terminologie anglo-saxonne « picture element » et « volume element ». Le signal élémentaire perçu émane de la population des noyaux d'intérêt, mobiles, contenus dans le voxel.

3.2.6 Séquences d'acquisition des images

Une des caractéristiques de l'IRM est que l'opérateur peut contrôler le contraste de l'image. Il est ainsi possible d'acquérir des images dépendant du temps de relaxation T_1 , T_2 ou de la densité de protons. En réalité, il n'est pas possible d'acquérir des images dont le contraste est seulement dû au T_1 , au T_2 ou à la densité de protons. On acquiert en fait soit des images dites « pondérées T_1 », « pondérées T_2 », ou « pondérées en densité de protons ». Le contrôle de l'image se fait par l'intermédiaire de séquences d'impulsions radiofréquences, contrôlées temporellement et spatialement. On peut alors sélectionner le moment d'acquisition des images en fonction de l'excitation des spins.

Les séquences IRM consistent ainsi à l'ajustement d'un certain nombre de paramètres, parmi ceux-ci, les plus importants sont le temps de répétition (T_R), le temps d'écho (T_E), et le nombre d'excitation (NEX).

La détection d'un écho de spin

Le contraste en T_2 : importance du T_E

Pour observer la relaxation T_2 , sans la relaxation T_2^* (c'est-à-dire réduire le signal dû aux inhomogénéités du champ), la séquence dite « d'écho de spin » a été créée. Après l'impulsion initiale de radiofréquences de 90° , une impulsion de 180° est appliquée. Un « écho » est ainsi généré (Figure 25.A). A la fin de l'impulsion de 90° , les spins commencent à nouveau à se déphaser, par effet T_2 et T_2' . Au bout d'un temps $T_E/2$, la deuxième impulsion de 180° inverse les phases des spins : ceux en avance (les plus « rapides ») se retrouvent derrière ceux en retard (les plus « lents »). Ainsi, après un nouveau délai $T_E/2$, les spins sont à nouveau en phase (Figure 25.B) et le signal passe par un maximum que l'on appelle « écho ». Le temps T_E est caractéristique de la séquence et est appelé Temps d'écho (T_E). **En inversant les phases des spins, l'impulsion à 180° permet de s'affranchir des déphasages dus aux inhomogénéités de champ statique responsables du T_2' .** La décroissance d'amplitude est donc maintenant fonction du T_2 du tissu, plutôt que du T_2^* (Figure 25.C). Il faut bien évidemment effectuer plusieurs échos de spins pour acquérir avec une bonne précision le T_2 . Ainsi, plus le temps d'écho est long, plus la décroissance en T_2 sera importante. Plus le T_E est court et moins on laisse le temps pour la relaxation T_2 . Comme chaque tissu possède un T_2 différent, le T_E peut ainsi servir de paramètre de contrôle pour moduler le contraste des images IRM.

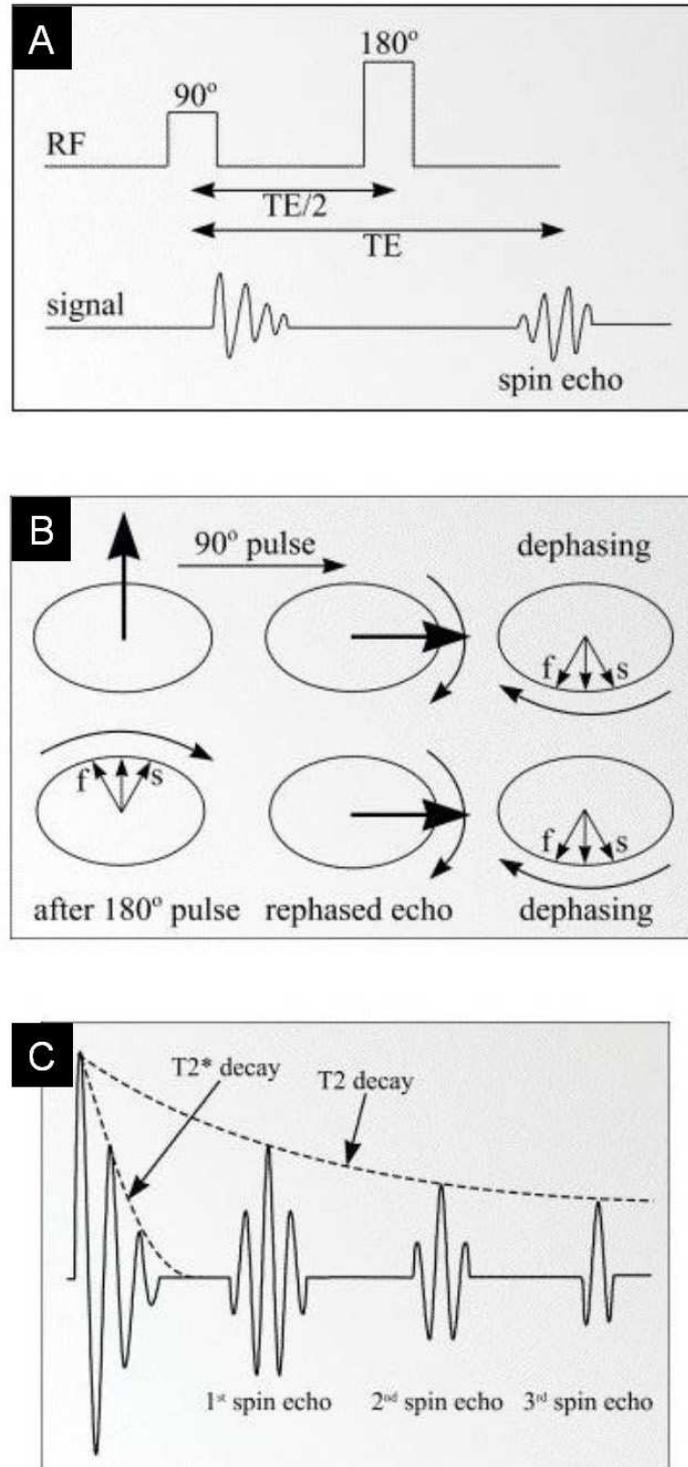


Figure 25

Principe d'une séquence spin-écho. (A) Après une impulsion de 90° , une impulsion de 180° est appliquée à $T_{E/2}$. Un écho est ainsi généré à T_E . (B) Après l'impulsion de 90° , les spins commencent à se déphaser car ils ne précessent pas tous à la même vitesse. Lorsque l'on applique l'impulsion de 180° , les phases des spins s'inversent : ceux en avance se retrouvent derrière ceux en retard. Après un nouveau délai $T_{E/2}$ les spins sont à nouveau en phase et le signal passe par un maximum : l'écho. Seul le déphasage en T_2 n'est pas rephasé par l'impulsion de 180° . (C) Pour plusieurs échos de spins, on peut ainsi s'affranchir de la décroissance en T_2^* et mesurer la décroissance en T_2 . D'après (Puddephat, 2003).

Le contraste en T_1 : importance du T_R

A la fin de chaque impulsion de 90° , l'aimantation longitudinale annulée est récupérée avec un temps de relaxation T_1 . Pour une seule impulsion radiofréquence, l'intensité du signal sera fonction de la densité de protons du tissu imagé. Maintenant, si on répète la série d'impulsion de 90° à des intervalles égaux ou inférieurs au T_1 du tissu, c'est-à-dire avant que l'échantillon revienne à l'équilibre, la 2^{ème} excitation aura une proportion moins importante de l'aimantation à faire basculer dans le plan transverse. Cette aimantation résiduelle dépendra du T_1 du tissu et l'aimantation longitudinale sera d'autant plus importante qu'elle est récupérée rapidement.

L'intensité du signal RMN sera alors fonction du T_R et du T_1 du tissu. Pour des T_R trop longs, la différence entre les T_1 s'annule et il n'est pas possible de voir la différence au niveau de l'image. Pour des T_R relativement courts en revanche, on peut facilement discriminer le T_1 des tissus : les images sont pondérées T_1 (Figure 26).

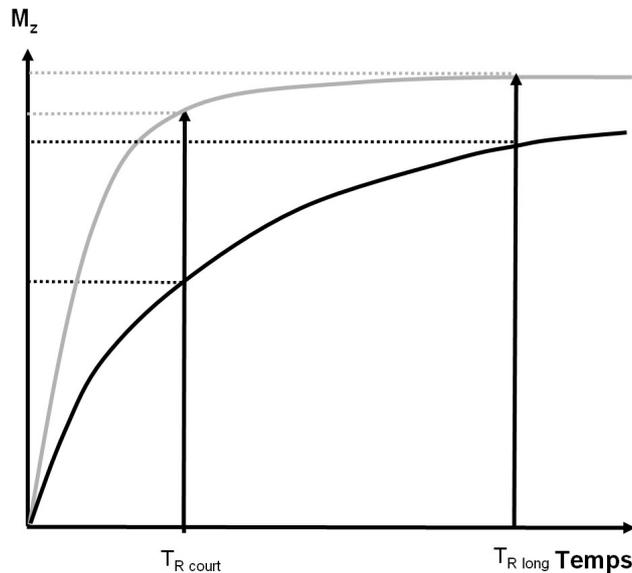


Figure 26

Evolution de la composante longitudinale de l'aimantation pour deux tissus différents. Le premier (en gris) recouvre plus rapidement l'aimantation longitudinale que le second (en noir). Si l'on effectue une séquence avec un temps de répétition court, la différence entre ces deux tissus sera nettement visible. En revanche si le temps de répétition est trop long, la différence entre les deux tissus diminue.

En jouant ainsi sur le T_R et le T_E , on peut mettre en valeur sur l'image des zones d'intérêts différentes. Le tableau 3 résume le type de pondération en fonction de ces paramètres.

De façon schématique, en séquence spin écho, le signal est donné par l'équation :

$$S_{se} = \rho \left(1 - e^{-\frac{T_R}{T_1}}\right) e^{-\frac{T_E}{T_2}} \quad \text{Eq.3.8}$$

Dans laquelle S_{se} est le signal en spin écho et ρ la densité de protons.

On voit donc qu'en jouant sur le T_R et le T_E , il est possible d'obtenir des séquences pondérées T_1 (pour $T_R \ll T_1$ et $T_E \ll T_2$), pondérées T_2 (pour $T_E \gg T_2$ et $T_R \gg T_1$), ou pondérées en densité de protons (pour $T_R \gg T_1$ et $T_E \ll T_2$).

| | $T_E \ll T_2$ | $T_E \gg T_2$ |
|---------------|--------------------|---------------|
| $T_R \ll T_1$ | Pondéré T1 | Image bruitée |
| $T_R \gg T_1$ | Densité de protons | Pondéré T2 |

Tableau 3

Tableau résumant le type de séquence en fonction du temps de répétition (T_R) et du temps d'écho (T_E).

La détection d'un écho de gradient

La séquence écho de gradient ne sera pas détaillée ici. Dans ce type de séquence, l'impulsion de 180° est supprimée. On mesure alors l'écho (qu'on appellera écho de gradient) du signal RMN à distance de l'impulsion d'excitation. Puisque les spins n'ont pas été rephasés, l'amplitude de ce signal suit la décroissance en T_2^* de l'aimantation transversale. On ne s'affranchit plus ici des effets de l'inhomogénéité du champ principal sur la mesure du signal RMN. Sur les images pondérées en T_2 , on n'aura donc plus un contraste en T_2 , mais un contraste en T_2^* .

L'intérêt de ces séquences est de pouvoir utiliser pour l'excitation, des impulsions dont l'angle est largement inférieur à 90° . Une impulsion de 30° par exemple suffit pour créer une composante transversale significative. De plus, l'aimantation longitudinale n'est pas annulée, ce qui nous autorise à travailler avec des temps d'écho beaucoup plus courts, tout en gardant un rapport signal/bruit suffisant. Ce mode d'imagerie est donc beaucoup plus rapide.

3.3 Les agents de contraste en IRM

Même si l'IRM donne déjà des contrastes différents en fonction de l'environnement biologique et physico-chimique des protons, il est possible d'utiliser des agents de contraste de façon à améliorer la sensibilité de la technique. Ceci devient primordial pour l'imagerie cellulaire. En effet, les cellules transplantées ne modifient pas suffisamment leur environnement pour induire un contraste naturel en IRM. Il est donc alors nécessaire d'introduire, au sein des cellules, un agent aux propriétés magnétiques. Il existe deux classes majeures d'agents de contraste en IRM, suivant les modifications sur les temps de relaxation qu'ils génèrent : les agents de type T_1 et les agents de type T_2 .

3.3.1 Agents de contraste de type T_1

Ce type d'agents de contraste est formé de molécules paramagnétiques. Les plus répandus sont les complexes de Gadolinium (Gd(III)) qui possèdent 7 électrons libres. **Les molécules paramagnétiques accélèrent les vitesses de relaxation protonique longitudinales ($1/T_1$) et transversales ($1/T_2$), en créant en leur voisinage un important champ magnétique local.** Ces complexes, relativement petits diffusent rapidement et vont donc relaxer rapidement dans la direction du champ principal après la fin de l'impulsion radiofréquence, modifiant ainsi la relaxation des molécules d'eau avoisinantes. Cette modification de la relaxation va dépendre des interactions entre le complexe et les molécules d'eau (temps de résidence de l'eau liée), du temps de corrélation de diffusion des molécules d'eau autour du complexe magnétique, ainsi que du temps de rotation de diffusion du complexe. C'est le mécanisme le plus rapide qui sera responsable de l'augmentation de la vitesse de relaxation de l'aimantation des protons. Les protons des molécules d'eau comprises dans la sphère d'interaction de chaque complexe vont donc avoir une vitesse de relaxation longitudinale ($1/T_1$) plus rapide et donc un T_1 plus court. La modification du T_2 est du même ordre de grandeur que la modification du T_1 , mais comme les vitesses de relaxation longitudinales $1/T_1$ des tissus sont 10 fois plus faibles que les vitesses de relaxation transversales $1/T_2$ des tissus, **l'effet est plus prononcé sur le T_1 que sur le T_2 . C'est pour cette raison qu'on les appelle agents de contraste de type T_1 .** Ils sont repérables sur les images comme des zones en hypersignal (zones blanches) pour des séquences pondérées en T_1 . Ce type de contraste est en général préféré des radiologues car il est plus facilement détectable sans ambiguïté. Peu de groupes utilisent ce type d'agents de contraste pour l'imagerie cellulaire car ses relaxivités sont faibles et diminuent d'autant plus lorsque le gadolinium est internalisé (Bulte and Kraitchman, 2004). Une concentration plus importante d'agents de contraste est donc nécessaire. De plus, le gadolinium, s'il n'est pas chélaté, n'est pas biocompatible et l'éventuelle toxicité du gadolinium-chélaté après métabolisme cellulaire n'a pas encore été bien évaluée. Néanmoins, l'utilisation de particules gadolinium-rhodamine-dextran (GRID) a permis par exemple de suivre la migration de cellules souches dans le cerveau après un accident vasculaire (Modo et al., 2004).

3.3.2 Agents de contraste de type T_2

La deuxième classe d'agents de contraste est basée sur l'utilisation de particules d'oxyde de fer superparamagnétiques (SPIO –superparamagnetic iron oxide- et USPIO –ultrasmall SPIO, de diamètres inférieurs à 50 nm-, termes anglais très employés dans le domaine médical). **Ce type de particules crée des inhomogénéités de champ importantes en déphasant les protons**

environnants. Ceci a pour principal effet de diminuer les temps de relaxation T_2 , d'où leur nom d'agents de contraste T_2^{34} . Les particules superparamagnétiques, jouent le rôle de petits aimants locaux 1000 à 10 000 fois plus magnétiques qu'une molécule paramagnétique. Ils ont donc une action sur des distances bien plus importantes que les molécules paramagnétiques (type T_1), qui n'ont d'effet que sur les molécules d'eau avec lesquelles elles sont en interaction directe. La présence de ces particules se repère sur les images comme des zones hypointenses (zones noires) pour des séquences spin-echo classiques pondérées en T_2 . Ce phénomène est accentué lorsque les particules sont agrégées dans les vésicules intracellulaires (Billotey et al., 2003 ; Bulte et al., 2001). D'où l'intérêt des nanoparticules que nous utilisons, dont l'état d'agrégation au sein des endosomes, (décrit dans le chapitre 2) favorise le contraste IRM. Les séquences d'échos de gradient, où le temps de relaxation T_2^* , dû aux inhomogénéités de champ, domine, sont encore plus sensibles à la présence de ces particules. Comme ces particules sont composées de milliers d'atome de fer, ce type d'agents de contraste améliore nettement la sensibilité de l'IRM. De plus, ces agents sont composés de fer biodégradable, qui peut en théorie être recyclé par l'organisme. Un organisme adulte possède d'ailleurs en moyenne 4 grammes de fer. La présence de ces particules est également facilement détectable sur les coupes histologiques grâce à son interaction avec le colorant bleu de Prusse. Les nanoparticules magnétiques que nous avons utilisées dans ce travail font partie de cette classe d'agents de contraste. Leur internalisation et leur état d'agrégation au sein des cellules leur donne en effet toutes les caractéristiques nécessaires pour avoir une sensibilité maximale. C'est donc un agent de contraste à fort potentiel pour l'imagerie cellulaire.

3.3.3 Agents de contraste caractérisé par leur relaxivité

Les agents de contraste diminuent les temps de relaxation des tissus T_1 et/ou T_2 , autrement dit ils accélèrent les vitesses de relaxation tissulaires $R_1=1/T_1$ et/ou $R_2=1/T_2$. Les vitesses de relaxation observées sont alors les vitesses intrinsèques des tissus, auxquels on ajoute l'effet du produit de contraste :

$$\frac{1}{T_{\text{observé}}} = \frac{1}{T_{\text{intrinsèque}}} + \frac{1}{T_{\text{agent de contraste}}} \quad \text{Eq.3.9}$$

L'efficacité de ces produits sur les vitesses de relaxation est proportionnelle à leur concentration. Cette relation permet de déterminer, pour un champ et une température donnée, **leurs relaxivités r_1 et r_2** (en $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ le plus souvent), définies par les pentes des droites des vitesses de

³⁴ En fait, les agents superparamagnétiques diminuent à la fois le T_1 et le T_2 . Ces effets sont antagonistes et sont donc en compétition. Néanmoins, sauf dans des gammes de concentration très faible, c'est l'effet T_2 qui l'emporte.

relaxation R_1 et R_2 en fonction de la concentration (Figure 27). Ces relaxivités permettent donc de caractériser d'une part la classe à laquelle appartient l'agent de contraste, et d'autre part leur sensibilité (voir le tableau 4 pour une comparaison des différents agents de contraste les plus couramment utilisés).

C'est grâce à ces courbes que des études antérieures du groupes ont pu quantifier l'effet sur le contraste en IRM de l'agrégation intracellulaire des nanoparticules que nous utilisons (Billotey et al., 2003) (Figure 27).

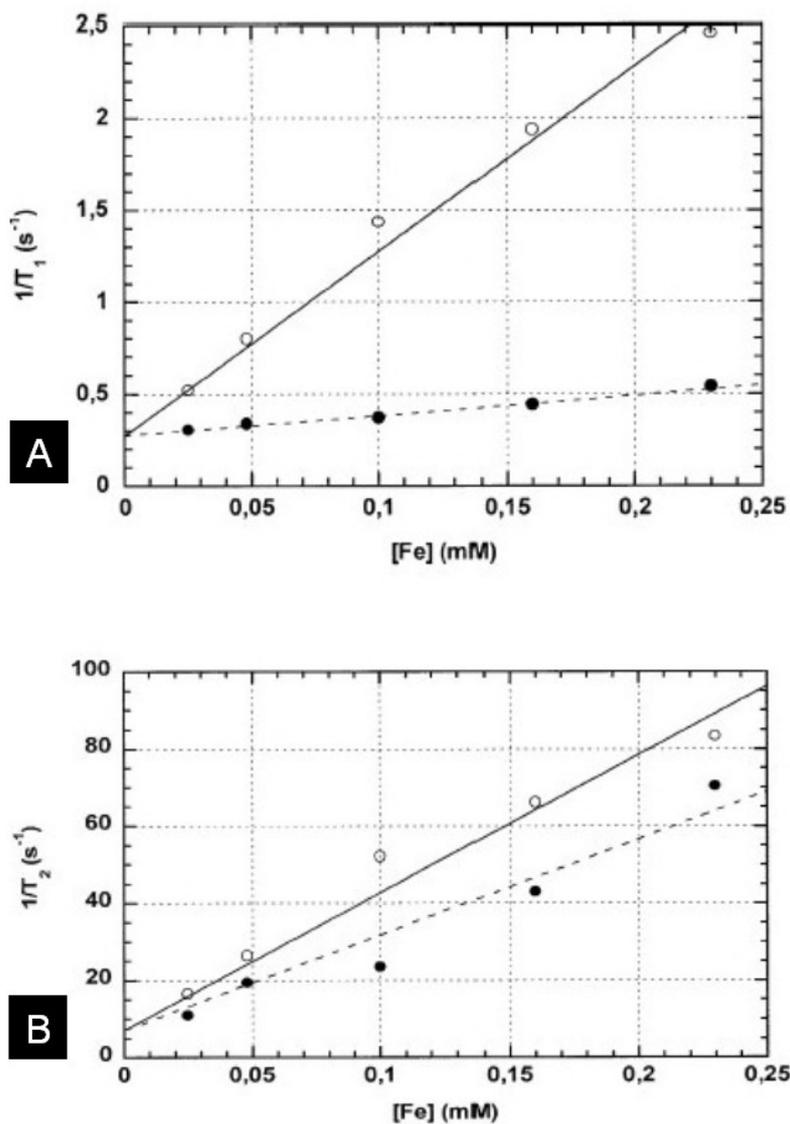


Figure 27

Comparaison des vitesses de relaxation transversales $1/T_2$ et longitudinales $1/T_1$ pour des particules isolées (cercles vides) et des particules internalisées au sein des cellules (cercles pleins) en fonction de la concentration globale en fer dans 1mL de gel d'agarose. Les relaxivités sont les pentes déduites des régressions linéaires et sont respectivement : $r_{1}^{\text{dispersées}} = 10.3 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$, $r_{2}^{\text{dispersées}} = 357\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ et $r_{1}^{\text{confinées}} = 1.1 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$, $r_{2}^{\text{confinées}} = 248\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$. D'après (Billotey et al., 2003).

| Agents | | Diamètre hydrodynamique ou Poids moléculaire | r_1 (mMol.s) ⁻¹ | r_2 (mMol.s) ⁻¹ | $\frac{r_2}{r_1}$ | ref |
|--|--|---|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| - paramagnétiques (T1) | | | | | | |
| Gd-DTPA | Chélate de Gadolinium | 0.6 kDa | 4.5 | 5.9 | 1.3 | (Schouman-claeyes 2004) |
| Gd-DOTA | | | 3.8 | 5.8 | 1.6 | |
| - de susceptibilité magnétique (T2) | | | | | | |
| AMI25 ^a | Nanoparticules de maghémite enrobé de dextran (SPIO) <i>^a Endorem® de Guerbet en France ou Feridex d'Advanced Magnetics aux Etats-Unis</i> | 58 nm | 24 | 107 | 4.4 0.47 T, 37°C | (Mornet et al., 2004) |
| MION-46L ^b | Nanoparticules de maghémite enrobé de dextran (USPIO) <i>^b équipe de Bulte, Massachusetts Hospital, Boston, USA</i> | 18-24nm | 16 | 35 | 5.8 0.47 T, 37°C | (Mornet et al., 2004) |
| MION-46L ^b | Nanoparticules au sein de magnétoliposomes non pegylées | Vésicules de 40nm (1-6 particules/vésicules) particules de 18 nm | 3 | 216 | 72 1.5 T, 37°C | (Bulte et al., 1999) |
| MION-46L ^b | Nanoparticules au sein de magnétoliposomes pegylées | | 3 | 240 | 80 1.5 T, 37°C | (Bulte et al., 1999) |
| AMI-227 ^c | Nanoparticules de maghémite enrobé de dextran (USPIO) <i>^c Sinerem® de Guerbet en France ou Combidex d'Advanced Magnetics aux Etats-Unis</i> | 17-20nm taille cristaux : 5 nm | 20 | 60 | 3 1.5 T, 37°C | (Bulte et al., 1999) |
| MD-100 | Magnétodendrimères | 7-8 nm | 7 | 406 | 58 1.5 T, 37°C | (Bulte et al., 2001) |
| MD-100 | Magnétodendrimères clusterisés au sein des cellules | 7-8 nm | 2.62 | 77.8 | 30 0.1 T, 37°C | (Bulte et al., 2001) |
| Nanoparticules de maghémities nues | Nanoparticules magnétiques anioniques | 8.7 nm | 11.6 | 363.2 | 31.3 1.5 T, 25°C | (Billotey et al., 2003) |
| Nanoparticules de maghémities nues agrégées par NaCl | Nanoparticules magnétiques anioniques | 8.7 nm | 1.4 | 74.3 | 53.1 1.5 T, 25°C | (Billotey et al., 2003) |
| Nanoparticules de maghémities clusterisées au sein des cellules | Nanoparticules magnétiques anioniques | 8.7 nm | 1.1 | 248 | 225.5 1.5 T, 25°C | (Billotey et al., 2003) |
| Nanoparticules au sein de magnétoliposomes pegylées | Nanoparticules magnétiques anioniques | Vésicules de 200 nm (60 à 500 particules/vésicules) particules de 8.7 nm | 19 | 116 | 12 0.47 T, 37°C | (Martina et al., 2005) |

Tableau 4. Comparaison des différents agents de contraste les plus couramment utilisés.

3.4 Le marquage magnétique

Comme mentionné précédemment, les particules les plus utilisées pour le marquage cellulaire sont les particules superparamagnétiques. La plupart sont des particules enrobées de dextran, qui sont très peu internalisées par les cellules (entre 0.011 pg/cell pour les cellules tumorales et 0.95pg/cell pour les macrophages (Moore et al., 2000; Schulze et al., 1995)) et qui nécessitent l'utilisation d'agents de transfection et de temps d'incubation relativement longs pour arriver à un taux d'internalisation suffisant (Frank et al., 2003). De nombreuses stratégies ont donc été développées pour optimiser la capture cellulaire et la stabilité du marquage. Une des stratégies les plus intéressantes a été de fonctionnaliser la surface de particules commerciales (MION-46L) avec un Tat-peptide du virus HIV. Ce peptide est capable de transporter des particules exogènes à l'intérieur de la cellule (Zhao et al., 2002; Zhao and Weissleder, 2004). Ce système a ainsi permis

d'améliorer d'un facteur 100 la quantité de particules internalisées (Allport and Weissleder, 2001 ; Josephson et al., 1999). L'habilité de l'IRM à détecter des cellules individuelles a ainsi été améliorée. Ceci a également rendu possible le tri magnétique des cellules marquées pour des analyses histologiques poussées (Lewin et al., 2000). D'autres équipes ont utilisées des magnétodendrimères comme agent de transfection (Bulte et al., 2001). Les dendrimères sont des polymères chargés qui s'adsorbent de façon non-spécifique sur la membrane cellulaire (Zhang and Smith, 2000). En associant ces dendrimères aux particules enrobées de dextran, il est alors possible d'arriver à un taux d'internalisation cellulaire relativement fort, tout en diminuant la concentration en particules dans le milieu d'incubation.

La stratégie utilisée au laboratoire utilise des particules nues de 10 nm de diamètre, non-enrobées de dextran, mais présentant des charges négatives en surface, comme décrit dans le chapitre 1. Les charges négatives sont dues soit à l'adsorption de contre-ions citrates (particules citratées), soit à la thiolation d'acide dimercaptosuccinique (particules ADMS). Pour les modèles développés dans le cadre de cette thèse, ce sont les particules ADMS qui ont été utilisées. Le principal avantage de ce type de particules pour le marquage cellulaire *in vitro* est sa non-spécificité. L'internalisation n'est médiée que par les interactions électrostatiques avec les sites cationiques de la membrane cellulaire. Le taux d'internalisation, à concentration et temps d'incubation égaux, va surtout dépendre de la surface disponible pour l'adsorption des particules, c'est-à-dire de la taille des cellules (Wilhelm et al., 2002a). La charge en fer par cellule ainsi obtenue est comparable avec celle obtenue avec les magnétodendrimères (Bulte et al., 2001), pour des temps d'incubation beaucoup plus courts (~ 1h). Ils rivalisent en fait avec les particules Tat-peptides (Lewin et al., 2000)(charge en fer similaire pour des temps d'incubation similaires), mais leur simplicité de fabrication et d'utilisation en fait des marqueurs cellulaires à fort potentiel pour l'imagerie cellulaire par IRM. L'article présenté dans le paragraphe 3.6 montrera une analyse plus détaillée de l'évolution de ce marquage en fonction du temps.

3.5 Optimisation de la détection des cellules marquées

Le seuil de détection des cellules marquées dépend de plusieurs paramètres : (1) le type de marquage, (2) la quantité de marqueurs par cellules, (3) le type de séquence utilisée, (4) l'intensité du champ magnétique de l'IRM utilisée, (5) la sensibilité de l'antenne de détection et également (5) des gradients de champ magnétique utilisés.

Même si la résolution et la sensibilité peuvent être améliorées en utilisant des IRM d'intensité de champ magnétique importante (IRM haut champ, au-delà de 4.7 T), nous nous sommes concentrés ici sur des IRMs à plus bas champ : 1.5 T (modèle d'anévrisme d'aorte abdominal), et

même 0.3 T (modèle d'incontinence urinaire). Dans les deux modèles présentés, le but n'était pas d'atteindre une résolution cellulaire pour suivre de façon individuelle le devenir des cellules marquées, mais plutôt d'analyser les possibilités qu'offre l'IRM, pour suivre à long terme, sur des IRMs cliniques, le devenir global des cellules marquées magnétiquement et transplantées.

En effet, même si les IRM haut champ chez l'homme commencent à se développer (Uematsu et al., 2004), les IRMs cliniques les plus couramment utilisées sont des IRM 1.5T. Quant à l'IRM 0.3T utilisée, c'est la première IRM implantée pour une utilisation en clinique vétérinaire. Son intérêt est indiscutablement son coût, qui reste abordable pour de nombreux centres hospitaliers.

Avant les deux études *in vivo*, une étude *in vitro* a d'abord été menée pour analyser l'évolution du signal en fonction de la quantité de marqueur et de la prolifération cellulaire, et ce en fonction du type de séquence utilisée. Cette étude a donné lieu à un article publié dans Radiology et présenté au paragraphe suivant (3.6). Étant donné que les nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer ont un effet prédominant sur la relaxation transverse de l'aimantation des protons (agents de contraste type T_2), une attention particulière a été portée sur l'évolution des vitesses de relaxation transverse $1/T_2$ et $1/T_2^*$. Le but était d'analyser les possibilités offertes par un marquage cellulaire avec ces nanoparticules magnétiques pour une détection à long terme, sur des IRMs cliniques.

L'importance du contraste T_2^* pour des particules d'oxyde de fer a auparavant été démontrée par (Daldrup-Link et al., 2003), qui a entre autre mené une étude comparative sur différents marqueurs cellulaires à effet T_1 et T_2 en fonction de la séquence utilisée (Figure 28). Cette équipe a mis en évidence une variation du contraste en fonction de la taille des particules, de la concentration en fer et de la séquence utilisée. On voit très nettement sur cette figure la sensibilité des séquences pondérées en T_2^* . Rappelons que ce type de séquence est particulièrement sensible aux inhomogénéités de champ : ces images montrent ainsi que les modifications du champ magnétique créées par les nanoparticules d'oxyde de fer déphasent les protons sur des distances relativement importantes : le signal des cellules marquées « bave » au delà de leur taille réelle. Ce type de séquence est donc particulièrement favorable pour des études à long terme, puisqu'une très faible concentration en oxyde de fer suffit à donner un signal important.

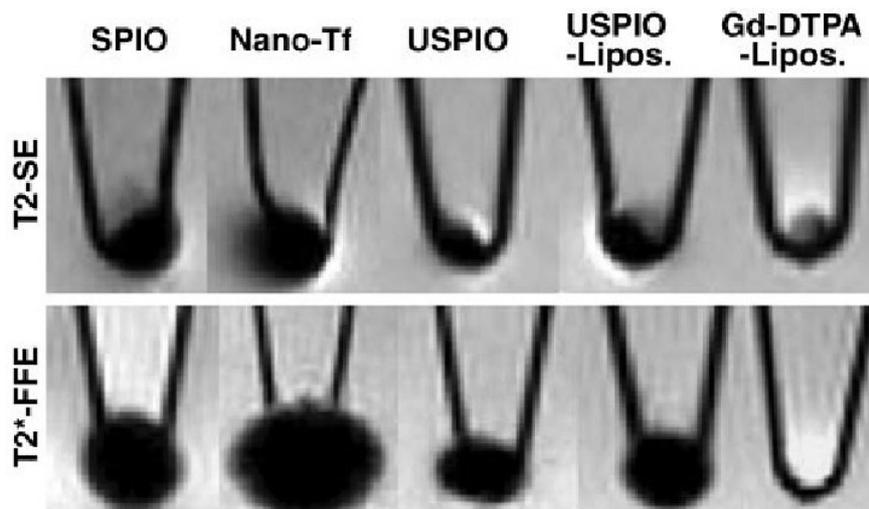


Figure 28

Contraste obtenu sur des culots cellulaires (10^6 cellules) marqués magnétiquement par différents agents de contraste : SPIO = ferumoxides (nanoparticules enrobées de dextran, diamètre 120-180 nm), Nano-Tf = nanoparticules magnétiques couplées à la transferrin (diamètre 50 nm), USPIO = ferumoxtran (nanoparticules enrobées de dextran, diamètre 20-50 nm), USPIO-lipos. = liposomes au sein desquels sont encapsulés des nanoparticules similaires au ferumoxtran et Gd-DTPA-lipo = liposomes au sein desquels sont encapsulés des complexes de Gadolinium ; et différentes séquences IRM : T2-SE = spin echo pondéré T2 (TR=2500, TE=90ms) et T2*-FFE : fast field echo pondéré T2* (TR=25, TE=12ms, angle de bascule de 20°). D'après (Daldrup-Link et al., 2003).

L'article présenté au paragraphe suivant présentera plus précisément l'évolution du T_2 et du T_2^* pendant les 14 premiers jours après marquage magnétique avec les particules ADMS présentées dans le chapitre 1, démontrant des propriétés de contraste à long terme d'un tel marquage. Là encore, des séquences pondérées en T_2^* offre une meilleure sensibilité et paraissent donc les plus adaptées pour un suivi semi-quantitatif des cellules marquées à long terme. Néanmoins, cette évolution est non-linéaire et une réelle quantification du nombre de cellules à partir du signal devient plus délicate que sur des séquences pondérées T_2 .

3.6 Iron Oxide Nanoparticle-labeled Rat Smooth Muscle Cells: Cardiac MR Imaging for Cell Graft Monitoring and Quantitation

3.7 L'anévrisme et la thérapie par cellules musculaires lisses

L'anévrisme d'aorte abdominale (AAA) est une pathologie provoquant l'élargissement de la paroi aortique. Cet élargissement modifie les propriétés d'élasticité de la paroi, qui peut alors éventuellement rompre (rupture d'anévrisme). Le taux de mortalité en cas de rupture atteint les 50%. Il est donc primordial de soigner cet anévrisme de façon à stabiliser voire réduire l'élargissement pour diminuer ainsi le risque de rupture. A l'heure actuelle, les traitements principaux sont la mise en place d'une endoprothèse aortique, aussi appelé stent (Figure 29).

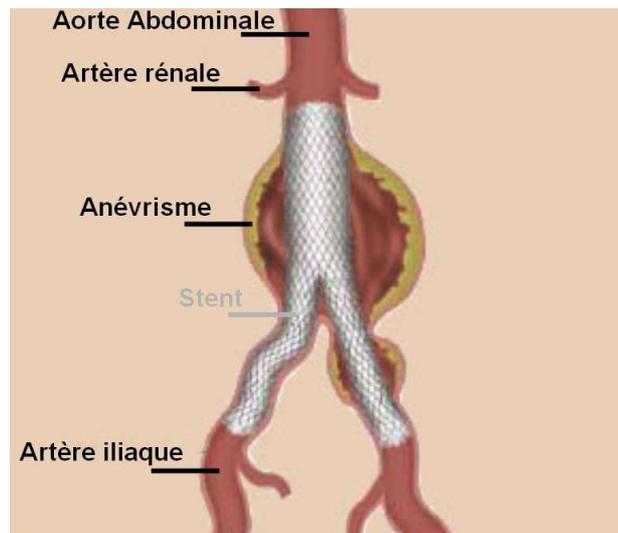


Figure 29

Schéma d'un stent sur une paroi d'aorte abdominale pour soigner un anévrisme. D'après <http://www.massgeneral.org/vascularsurgery/patients/index.asp?id=endovascular>

Néanmoins les problèmes de fuites limitent leur efficacité. Des travaux récents ont suggéré que la délivrance locale de cellules musculaires pouvait stopper l'expansion de l'anévrisme chez des modèles animaux (Allaire et al., 2004a; Allaire et al., 2002).

Le modèle consiste à greffer chez le rat une aorte de cobaye décellularisée (Figure 30.A), qui provoque la formation d'un anévrisme d'aorte abdominale au bout d'une quinzaine de jours (AAA, Figure 30.B). Des cellules musculaires sont alorsensemencées directement au niveau de la paroi (Figure 30.C) et le résultat de cette ensemencement est étudié par histologie.

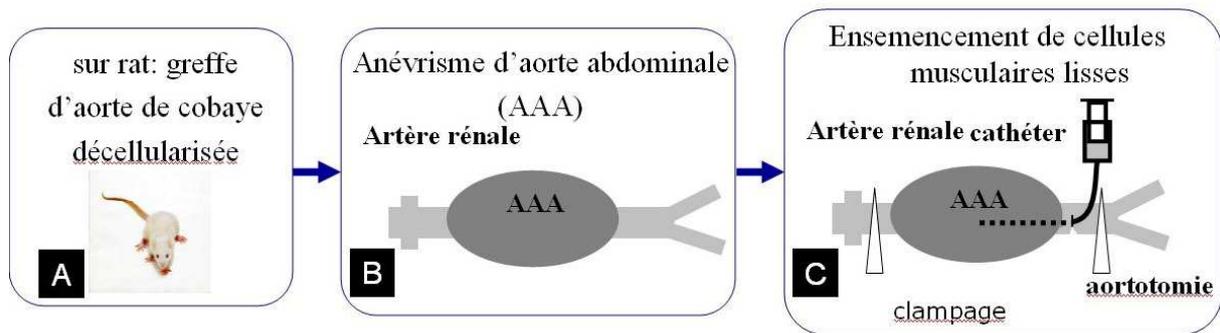


Figure 30

Schéma du modèle de thérapie cellulaire d'anévrisme d'aorte abdominale (AAA). une greffe d'aorte de cobaye décellularisée chez le rat (A) provoque la formation d'un Anévrisme d'Aorte Abdominale (AAA) en 14 jours (B). Des cellules musculaires lisses sont alors directement ensemencées au niveau de la paroi par injection locale après clamage. Afin d'assurer une répartition homogène des cellules et de permettre aux cellules d'adhérer, l'ensemencement se fait par quatre rotations de 5 minutes chacune. D'après (Losy et al., 2003).

Ces analyses, bien que précieuses pour valider la réussite d'une telle thérapie ne permettent l'évaluation que post-mortem. De plus, seul le résultat de la thérapie est directement analysable, mais non le devenir des cellules transplantées elles-mêmes.

Pour **suivre *in vivo* l'anévrisme et connaître de façon plus précise le devenir des cellules ensemencées**, nous avons donc mené un protocole d'analyse IRM (1.5T) sur différents groupes d'animaux de façon à suivre les cellules transplantées sur les mêmes animaux avant et après transplantation, de 0 à 28 jours après. De manière à confirmer la présence des cellules injectées au sein de la paroi, les cellules ont également été marquées au PKH26, un marqueur membranaire fluorescent détectable même 15 jours après transplantation (décrit au paragraphe 3.1.3).

Après leur suivi *in vivo* en IRM, les rats ont ensuite été sacrifiés, et l'anévrisme prélevé et fixé pour (1) imager en IRM à haut champ l'anévrisme ex-vivo ; (2) faire des études histologiques grâce à un marquage au Perls, qui colore en bleu les cellules contenant du fer ; (3) confirmer l'intégration des cellules par des analyses histologiques en fluorescence.

Comme détaillé dans l'article qui suit, toutes ces données confirment bien l'intégration progressive des cellules musculaires lisses au sein de la paroi de l'anévrisme d'aorte, permettant le développement de l'intima et la stabilisation de la lésion anévrismale.

Pour bien comprendre l'article qui suit, il est nécessaire d'introduire ici quelques termes techniques définissant les différentes couches de la paroi artérielle (Figure 31).

La paroi artérielle est constituée de 3 tuniques superposées :

- la tunique interne est **l'intima**, composée d'une couche unique de cellules endothéliales.
- la tunique intermédiaire est **la média**, constituée de cellules musculaires lisses bien organisées.
- la tunique externe, **l'adventice**, est l'enveloppe conjonctive qui entoure l'ensemble.

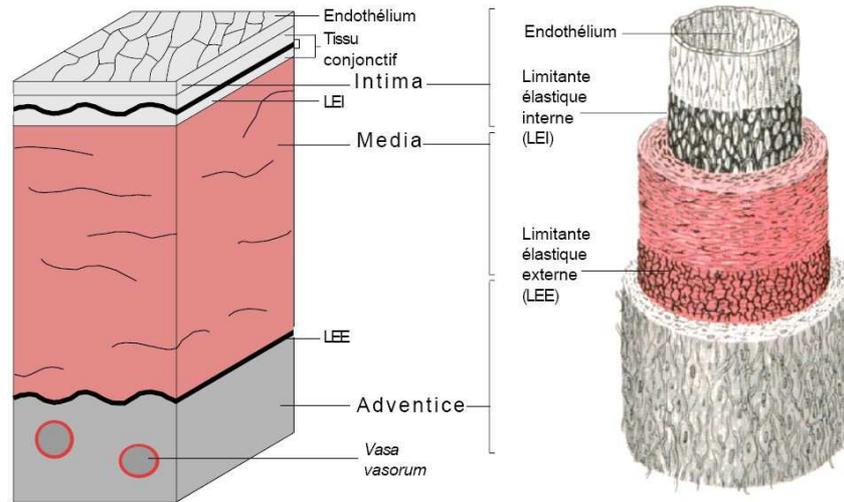


Figure 31

Les différentes couches de la paroi artérielle. Il existe trois couches principales superposées : (1) une couche interne, l'intima; (2) une couche intermédiaire, la média; et (3) une couche externe, l'adventice. L'intima et la média sont séparées par la limite élastique interne (LEI) et la média et l'adventice sont séparées par la limite élastique externe (LEE). D'après LÉONI, J., Université de Franche-Comté - UFR de Pharmacie - Besançon - France.

Ces trois tuniques ou couches sont nettement identifiables sur les coupes histologiques (Figure 32). Elles permettent ici de confirmer la formation de la couche intima, après ensemencement des cellules musculaires lisses.

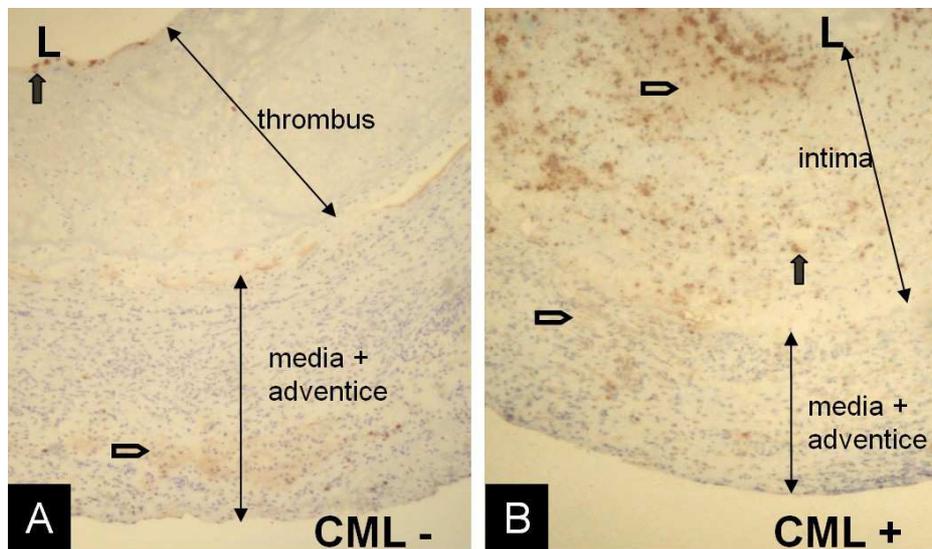


Figure 32

Coupes histologiques d'anévrisme d'aorte abdominale (AAA) sans ensemencement de cellules musculaires lisses (CML-) et avec ensemencement de cellules musculaires lisses (CML+). Sans ensemencement de CMLs, la formation du thrombus est nettement visible. (B) En revanche, après ensemencement de cellules musculaires lisses, une diminution de l'épaisseur des couches média et adventice et la formation de la couche intima sont observées. D'après (Losy et al., 2003).

3.8 MRI assessment and follow-up of iron labeled cells in endovascular cell therapy of abdominal aortic aneurysm in rat

(A soumettre pour publication au FASEB journal)

J.F. Deux^{a,b,*}, J. Dai^c, C. Rivière^{d,f}, F. Gazeau^d, P. Méric^e, J. Roger^f, J.N. Pons^f, F. Boudghène^g, E. Allaire^c, D. Letourneur^a

^aINSERM U698, Bio-engineering Department, University Paris 7 - University Paris 13, X. Bichat Hospital, Paris

^bRadiology Department, H. Mondor Hospital, Créteil

^cCNRS UMR 7054, Centre de Recherches Chirurgicales, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, University Paris 12, H. Mondor Hospital, Créteil

^dPôle Matière et Systèmes Complexes, UMR CNRS 7057, University Paris 7, Paris

^eLaboratoire de RMN Biologique, ICSN-CNRS, Gif sur Yvette

^fLaboratoire des Liquides Ioniques et Interfaces Chargées, UMR CNRS 7612, University Paris 6, Paris

^gRadiology Department, Tenon Hospital, Paris, France

Abstract

Abdominal aortic aneurysm (AAA) is a pathological enlargement of aortic wall, ending dramatically in case of rupture. Recent works have demonstrated that local delivery of vascular smooth muscle cells (VSMC) in aortic lumina induces the development of a neointima layer, which stabilizes aneurysm. However, cells fate after local delivery has never been investigated. In this work, we used magnetic resonance imaging (MRI) to non-invasively follow such cell therapy of AAA in rats. Cells were first magnetically labeled by means of iron oxide nanoparticles, and then injected locally in aortic lumen. MRI imaging performed immediately after delivery showed hyposignal area in all rats, detected up to one month. After sacrifice, histological perls staining evidenced iron containing cells within aortic wall. High resolution 9.4 T MRI performed *ex vivo* at Day 28 revealed a good correlation between MRI hyposignal areas and iron loaded cells on perls staining. In this study, we demonstrate for the first time that iron loaded VSMCs can be visualized and follow *in vivo* after local delivery in aortic lumen. All data confirmed the integration of implanted cells within aneurysm aortic wall, allowing intima formation and aneurysm stabilization.

* to whom correspondence should be addressed

Introduction

Abdominal aortic aneurysm (AAA) is associated to atherosclerosis. It is defined as an aortic diameter larger than 30 mm and is not rare in older men (6% at 80 years old). Natural history is characterized by a progressive increase of vessel diameter leading to spontaneous rupture (Sakalihan et al., 2005). Loss of vascular smooth muscle cells (VSMCs), inflammation and elastinolysis are classically observed in the media layer of AAA (Michel, 2001).

Surgical and endovascular prosthetic repair (Boudghene et al., 1998; Lee et al., 2004; Parodi et al., 1991), are the main treatments to prevent rupture (Dubost et al., 1952) but these techniques are associated with initial high rates of mortality and late complications with endoleaks, respectively (Rutherford and Krupski, 2004). Recent works have suggested that local delivery of vascular smooth muscle cells (VSMCs) restores the healing capability of proteolytically injured extracellular matrix (Allaire et al., 2002; Losy et al., 2003) and stop expansion of already formed aneurysms in a rat model (Allaire et al., 2004b). This technique of cell therapy offers a promising therapeutic approach for the endovascular treatment of AAAs. The beneficial effect is attributed to inhibition of wall destruction by matrix metalloproteinase (MMP) and initiation of vessels repair by a of paracrine secretion of TGF- β 1 by the VSMCs accumulated after seeding (Allaire et al., 2004b; Losy et al., 2003). Success of the procedure was evaluated on AAA diameter measurements at autopsy and by histology on harvested treated lesions after animal sacrifice. However, even if *in vivo* visualization of VSMCs would document efficiency of cell delivery, repartition and fate of VSMCs after delivery within the same animal has never been assessed.

Using magnetic resonance imaging (MRI) cell tracking appears as a powerful tool to track labeled cells and to validate cell transfer after systemic or local injection (Kircher et al., 2003; Kraitchman et al., 2003; Lewin et al., 2000; Smirnov et al., 2004). In the present work, we used MRI and ultrasmall anionic iron particles (USPIO) in order to (1) validate the cell delivery to the lesion and to (2) follow cell therapy of AAA *in vivo* in rats after local cell therapy.

Materials and methods

Anionic magnetic nanoparticles: synthesis and characterization

Stable colloidal suspensions of negatively charged maghemite nanoparticles were used (Wilhelm et al., 2003a). The precursor ionic ferrofluid was synthesized according to Massart's method (Massart, 1981) by

alkalizing an aqueous mixture of iron (II) chloride and iron (III) chloride. The resulting magnetite (Fe_3O_4) particles were then acidified, oxidized in maghemite ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$), and dispersed into water. This resulted in an acid ferrofluid composed of magnetic particles positively charged with nitrate counterions. Particles were then chelated with meso-2,3-dimercaptosuccinic acid ($\text{HOOC-CH(SH)-CH(SH)-COOH}$) (Fauconnier et al., 1997). An aqueous solution of thiolated maghemite nanoparticles bearing net negative surface charges was obtained, mainly due to the unbound carboxylate groups (COO^-). This colloidal solution is stable over large pH range (from 3 to 11), in suitable ionic strength (0 to 0.35 mol/L) and in various buffers. For this study, nanoparticles were resuspended in 0.1M HEPES buffer through a series of ultracentrifugation steps. Nanoparticles are made of monocrystalline ferrimagnetic monodomains of maghemite with a crystallite diameter of typically 9 nm, a magnetic core of 8.7 nm and a hydrodynamic diameter of 35 nm. Longitudinal and transverse relaxivities (1.5T, 25°C) of anionic nanoparticles dispersed in water are respectively: $r_1 = 10.2 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ and $r_2 = 357 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ (Billotey et al., 2003).

Vascular smooth muscle cell (VSMC) culture

VSMCs from male Fisher rat thoracic aorta were isolated as reported previously (Battle et al., 1994) grown in RPMI 1640 and M199 supplemented with 10% fetal calf serum, with 50 U/mL penicillin, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin, and 0.3 mg/mL L-glutamine. The phenotype of VSMCs was confirmed by their appearance at confluency (focal overgrowth) and by positive anti-alpha-actin immunostaining.

Magnetic cell labeling

Eighty percent confluent VSMCs (passage 5 to 8) were incubated for 2 hours with a filter-sterilized (0.1 μm) suspension of nanoparticles (1.0 mmol/L iron) in 0.1M HEPES at 37°C. During this step, anionic nanoparticles adsorb to cell membrane surface through electrostatic interactions, and are internalized through an endocytotic pathway (Wilhelm et al., 2002a). These culture cell conditions were optimized to allow cell labeling at low concentration as described earlier (Riviere et al., 2005). Cells were then washed and incubated for 1 hour in serum free medium for chase. After labeling, 10^6 cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS, pH = 7.4), trypsinized and resuspended in culture medium before delivery to AAAs.

Fluorescent cell labeling

PKH26 (Sigma, UK) an aliphatic reporter molecule that integrates into the cell membrane (Gomes et al., 2001) was used to fluorescently label VSMCs after magnetic

labeling (n=4) or in non-iron labeled control VSMCs (n=1). The cells (10⁶) were labeled by incubation for 4 min with PKH26 at 37°C, and washed as indicated in the manufacturer instructions.

Quantification of cell magnetic labeling

Iron content in cells was quantified by two methods: Magnetophoresis (MP) and Electron Spin Resonance (ESR) (Wilhelm et al., 2003a). MP consists of measuring the velocity of labeled cells attracted towards a permanent magnet of known magnetic field cartography. Since the balance of magnetic and viscous forces was known, we calculated the iron content of each visualized cell. This measurement was repeated for 100 different cells to achieve reliable results. In ESR, the resonance spectrum of a known number of labeled cells (in the range of 10⁵) is recorded. Since spectrum area is proportional to total iron mass, the mean iron content per cell can be calculated. The measurements by magnetophoresis and electron spin resonance provide complementary results. Magnetophoresis provides the whole distribution of individual cell iron load, while electron spin resonance provides average iron load determined from the cell population.

Analysis of matrix metalloproteinase mRNA

In order to check that magnetic labeling will not modify the MMP and the TIMP activation we measured gene expression of these molecules.

Six and 24 hours after magnetic labeling VSMCs were lysed in a culture dish by adding 1 mL of Trizol Reagent per 5.10⁶ cells. RNA phase separation was obtained by adding 0.2 mL of chloroform. RNA precipitation was obtained by mixing with isopropyl alcohol. Total RNA from VSMCs was extracted with Trizol TM (Life Technologies, Rockville, USA) and treated with grade I DNase (Roche Molecular Biomedicals). Reverse transcription was done with 1 µg of total RNA, with 60 ng of random primers, 200 U Superscript II (Life Technologies), 0.2 mM dNTP, in 10 mM dithiothreitol and 20 U ribonuclease inhibitor (Roche Molecular Biochemicals). PCR was performed in a PCR Express thermo cycler (Hybaid, UK), in the same tube for both the gene of interest and the domestic gene 18S (QuantumRNATM 18s Internal Standards kit, Ambion, Montrouge, France). Final PCR conditions were chosen to avoid interference between the two sets of primers. Primers for genes of interest (Genset Oligos SA, France) were: MMP-2: 5'-CTATTCCTGTCAGCACTTTGG-3'/5'-CAGACTTTGGTTCTCCAACCTT-3'; MMP-9: 5'-CTGCGTATTTCCATTCATCTT-3'/5'-ATGCCTTTTATGTCGTCTTCA-3'; TIMP-1: 5'-CCCAGAAATCAACGAGACCA-3'/5'-ACACCCACAGCCAGCACTAT-3'; TIMP-3: 5'-GTGGTGGGAAAGAAGCTGCTGAA-3'/5'-

CCTCGGTACCAGCTGCAGTAGC-3' (Allaire et al., 2002). The mix contained 2.5 U of Taq Polymerase (EurobioTaq, Eurobio, Les Ulis, France) in PCR buffer, dNTP and magnesium chloride. Negative controls were carried out with the same protocol, but without Superscript II. Ten microliters of the PCR products were run in a 2% agarose gel with 5 µg/mL ethidium bromide, and visualized under UV light and photographed with a video camera. Bands of amplified sequences of the gene of interest and of 18S were quantified with Gel Analyst™ (Iconix, France). Results in two sets of experiments were expressed as a ratio between signals corresponding to the gene of interest and 18S.

Animals and surgery

The *in vivo* study was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Faculté Créteil, France.

Animals housed and cared for according to European Union Standards received analgesia and were anesthetized with 5mg/ 100 g body weight of pentobarbital administered intraperitoneally. Hartley guinea pig (Iffa Credo, Lyon, France) abdominal aortas were decellularized with sodium dodecylsulfate, as described (Allaire et al., 1994). The tube of arterial extracellular matrix obtained with this method was grafted orthotopically into 19 male Fischer rats (Iffa Credo) during a first surgical procedure.

A second surgical procedure was performed 14 days later, at which time the xenograft diameter had increased more than 50% to comply with aneurysm definition (Allaire et al., 2004b). The aneurysm xenograft was isolated from blood flow with clamps after gentle dissection. Its lumen was gently rinsed with culture medium through a PE10 catheter introduced at aortotomy performed downstream in the native aorta.

Magnetically labeled VSMCs (1×10⁶ cells/AAA) suspended in culture medium with 5% FCS were injected into the lumen of experimental AAAs through the PE10 catheter (n=13). VSMCs were allowed to attach by sedimentation during four 90-degree animal rotations (sedimentation time: 2 minutes for each position) for 8 minutes in all but one rat who was not turned during VSMCs delivery. Three rats received 10⁶ unlabeled VSMCs following the classical procedure (4 rotations during delivery). Three additional rats received free iron particles in solution without cells (iron nanoparticles, 1.0 mmol/L iron).

Among the 16 animal experiments with cell delivery, three animals received cells co-labeled with fluorescent marker PKH26 and iron nanoparticles, and one animal received cells only labeled with PKH26.

In vivo MR imaging protocol

In vivo MR imaging protocol was conducted on a clinical 1.5 T MR magnet (Signa 1.5T; General Electric, Milwaukee, USA), using a cylindrical home made coil with a diameter of 120 mm. MR sequences included: axial T₂-weighted gradient-echo and axial T₂-weighted spin echo sequences. Imaging parameters were: (1) gradient echo sequence: field of view 80 mm; T_R: 16 ms; T_E: 2.8 ms; flip angle: 30 degrees; matrix 256 x 256; slice thickness 2 mm (2) spin echo sequence: field of view 60 mm; T_R: 2000 ms; T_E: 56 ms; matrix 256 x 256; slice thickness 2 mm.

All 19 rats had MRI before and within 30 minutes after delivery. Nine rats (3 with iron labeled cells, 3 with unlabeled iron cells and 3 with iron free particles) were sacrificed after delivery by lethal injection of pentobarbital. The 10 remaining rats, who received iron labeled VSMCs, were followed up: 3 rats had a second MRI at Day 7, 3 rats had a second MRI at Day 14 and 3 rats had a second MRI at Day 28. All rats were sacrificed after MRI by lethal injection of pentobarbital. One rat was imaged twice at Day 21 and Day 28, and sacrificed.

Ex vivo high field MR image acquisition

Ex vivo MR high resolution imaging of aortic abdominal aneurysm of 2 sacrificed rats at Day 28 were conducted on a 9.4 T MR magnet (Varian, Inova).

Ex vivo MR experiments were conducted with 2 experimental AAAs explanted 28 days after in vivo endovascular magnetically labeled VSMCs delivery.

Imaging parameters were: field of view 30 mm; T_R: 100 ms; T_E: 3 ms; flip angle: 25 degrees; matrix 256 x 256; slice thickness 80 μm.

Image analysis by MRI

For each animal, maximal aneurysm diameter and wall thickness were calculated by MRI.

On this slice, boundaries of aortic wall were defined by a consensus of 2 authors. Signal intensity was measured by contouring of aortic wall on T₂-weighted gradient-echo images at Day 0, Day 7, Day 14 and Day 28 using the software available on the MR unit (citer le software). Percentage change in the signal intensity was normalized to the signal intensity of aortic wall before delivery. Visual analysis included heterogeneity/homogeneity and signal loss.

Histology and immunohistochemistry

After sacrifice, aortas were gently rinsed, excised, fixed in 70° ethanol and embedded in paraffin. Three sections of 5 μm were obtained at the level of maximum dilatation. Sections were stained with eosin and Perls staining. Maximal diameter and maximal aortic wall thickness were

measured with a grid in the microscope eyepiece. Visual iron quantification was performed using Perls staining.

Immunohistochemistry was performed with primary monoclonal mouse anti-rat antibodies: ED1 for monocytes and macrophage and for α-actin (Dakopatt). The secondary antibody was a biotinylated anti-mouse IgG raised in horse (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA). The tissue sections were then incubated with avidin-biotin peroxidase complexes with Vector Red as a substrate according to the manufacturer's recommendations. Negative controls were generated by primary antibody omission.

Statistical analysis

Quantitative results in groups (from three to fifteen data samples, unless otherwise stated) were expressed as mean +/- standard deviation. The significance of the differences between groups was analyzed by one-way ANOVA-test. When ANOVA test was found significant (P<0.05), a paired student t-test between every groups was performed (Origin 6.0, Originlab Corporation, Northampton, MA, USA). Values of P<0.05 were considered significant.

Results

VSMC labeling in culture with iron nanoparticles

ESR measurement of intracellular mean iron load was 1.7 ± 0.6 pg per cell (n=4). As found by magnetophoresis measurements (n=4), the distribution of iron load per cell was rather broad with a mean iron load per cell shifted towards higher value (3.9 ± 0.9 pg per cell). Those values are similar to our previous in vitro study (Riviere et al., 2005).

MMP/TIMP balance expression by VSMCs after magnetic labeling

Since AAA stabilization after VSMC endovascular seeding is attributed in part to the down-regulation of MMP activity (Allaire et al., 2004b), mRNA levels contention in VSMCs after iron labeling were assessed for MMP-2, MMP-9, and for their physiological inhibitors TIMP-1 and TIMP-3.

MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-3 mRNA contents increased slightly from 6 to 24 hours in parallel to cell proliferation that was not affected by cell labeling (data not shown). There were no significant differences in mRNA levels of MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-3 between iron labeled VSMCs and control VSMCs at 6 hours and 24 hours after labeling (Figure 1).

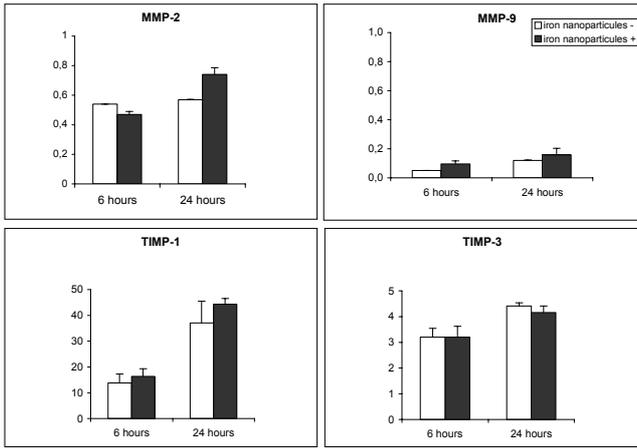


Figure 1. mRNA levels of metalloproteinase MMP2, MMP9 and their physiological inhibitor TIMP-1 and TIMP-3 for cell loaded with iron nanoparticles (black bars) and for control cells (white bars) 6 and 24 hours after magnetic labeling procedure.

Aortic diameter and wall thickness / Magnetically labeled VSMCs retain AAA stabilizing properties

Magnetically labeled VSMCs were injected endoluminally into experimental AAA as done previously (Allaire et al., 2004b). After cell delivery, measurements of maximal aneurysm diameter on paraffin embedded aortas were similar at Day 0, Day 7, Day 14 and Day 28 (Table 1). Measurements performed on MRI were well correlated with histological measurements and also showed a stabilization of AAAs (Table 1).

Maximal thickness of aortic wall, measured either in vivo by MRI or after excision by visual examination under the microscope, increased from Day 0 (0.6 ± 0.1 mm) to Day 28 (0.9 ± 0.05 mm) (difference statistically significant at the level of 0.05 - $p= 0.035$ -) (Table 1). None animal underwent aneurysm rupture after iron-labeled cell therapy.

| MRI / Histology | Day 0 | Day 7 | Day 14 | Day 28 |
|-------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| Aneurysm diameter (mm) | 3.1 ± 0.1 / 2.90 ± 0.04 | 3.05 ± 0.2 / 3.10 ± 0.1 | 2.6 ± 0.1 / 2.60 ± 0.03 | 2.7 ± 0.1 / 2.5 ± 0.04 |
| Wall thickness | 0.6 ± 0.1 / 0.7 ± 0.05 | 0.75 ± 0.05 / 0.8 ± 0.06 | 0.8 ± 0.1 / 0.88 ± 0.06 | 0.9 ± 0.05 / 0.97 ± 0.02 |
| Signal loss (%) | -84 ± 8 | -56 ± 17 | -35 ± 12 | -46 ± 11 |

Table 1. Comparisons between aneurysm diameter and wall thickness measured at Day 0, Day 7, Day 14 and Day 28 on MRI and histology. Signal loss measured on MRI at Day 0, Day 7, Day 14 and Day 28.

In vivo MRI of cell engraftment: Day 0

Aortic aneurysms wall appeared as a ring of intermediate homogeneous signal with high signal of blood flow on T2* gradient echo weighted images before iron loaded VSMCs injection (Fig. 2, A1-4). Immediately after iron labeled VSMCs delivery (Day 0), T2* weighted gradient echo images showed circumferential heterogeneous low signal intensities areas within the wall of AAA in all rats who underwent four 90-degree rotations during cell delivery (Fig. 2, B1). On the contrary, local delivery of the non-iron labeled VSMCs (Fig. 3, B3) or free iron particles without cells (Fig. 2, B4) did not induced signal changes on T2* weighted gradient echo images. Efficient delivery of cells was also confirmed with VSMCs co-labeled with fluorescent dye and iron nanoparticles (Fig. 2, B2) or with VSMCs only labeled with the fluorescent dye (Fig. 2, B3). Analysis at Day 0 after cell delivery revealed fluorescent cells localized along the aortic wall both with iron labeled VSMCs and non iron-labeled VSMCs (Fig. 2, B2-3 insets). Finally, in one animal where iron-labeled cells have been seeded without rotations, low signal area was localized within the posterior declivus part of the aorta (Fig. 2, B4).

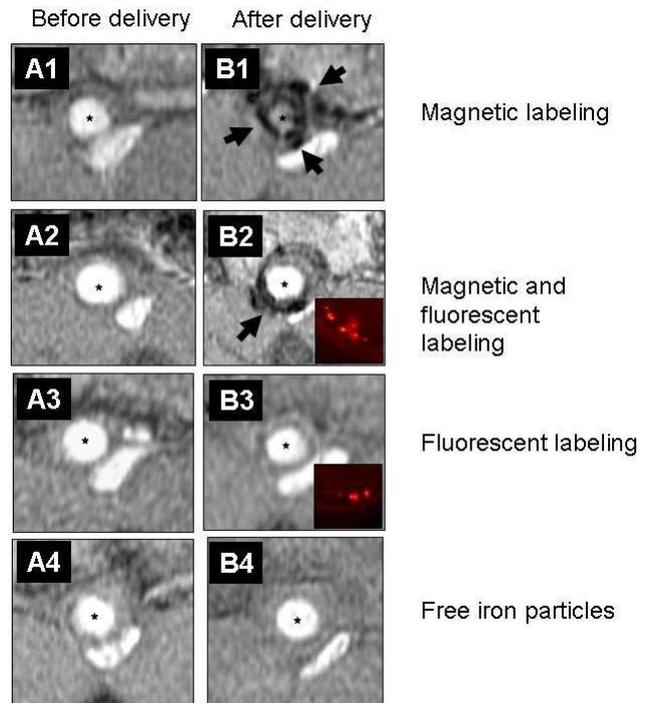


Figure 2. In vivo 1.5T MR imaging of aortic aneurysm before (first column) and after local delivery of iron labeled cells (B1), fluorescent and iron labeled cells (B2), fluorescent labeled cells (B3) and iron free particles (B4). In cases 1 (A1, B1) and 3 (A3, B3) rats were rotated 4 times (2 minutes for each position) during cells delivery. In case 2 (A2, B2) the rat was not turned during procedure. T2*-weighted gradient echo images (field of view 60 mm; TR: 16 ms; TE: 2.8 ms; flip angle: 30 degrees; matrix 256 x 256; slice thickness 2 mm) evidenced intermediate signal of aortic aneurysm wall before injection of VSMCs (first column). Vessel luminal appeared as a bright area (star). Gradient echo T2* weighted-images evidenced hyposignal area (arrow) localized next to

the wall of aortic aneurysm after local delivery of iron labeled VSMCs with four degree rotations performed during delivery (B1). Hyposignal area was detected only on the half of the aorta wall when no rotations were performed (B2). No modification of signal was detected after local delivery of unlabeled VSMCs (B3) or iron free particles (B4). Fluorescent study evidenced fluorescent cells next to the aortic wall after delivery of iron labeled (B2 insert) or unlabeled (B3 insert) cells.

In all animals, no modification of signal intensity was observed by MRI on T2 weighted spin echo images after delivery of VSMCs (data not shown).

For gradient echo sequence, measurements of signal intensity on hyposignal areas performed at Day 0 showed a strong negative enhancement after iron loaded cell delivery compared to baseline MRI before iron labeled cell injection ($-84 \pm 8 \%$, $n=19$).

In vivo MRI monitoring of cell therapy : from day 0 to day 28

Low signal areas detected by MRI at Day 0 after iron VSMCs injection were systemically identified later-on on T2* gradient echo images performed at Day 7 ($n=3$), Day 14 ($n=3$), Day 21 ($n=1$), or Day 28 ($n=3$). No modification of signal was detected on T2 spin echo images (data not shown). For gradient echo sequence, signal intensity measurements showed that signal loss decreased progressively from Day 0 ($-84 \pm 8\%$) to Day 28 ($-46 \pm 11 \%$) in the 10 followed-up rats (difference statistically significant at the level of 0.05 - $p=0.034$). In 7 of these 10 rats, visual analysis showed that initially circumferential low signal area became focal (Fig. 3). In the remaining 3 rats, visual analysis showed no change. Pathological analysis confirmed these data.

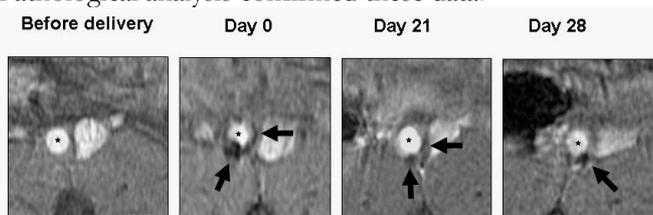


Figure 3. T₂*-weighted gradient echo images of aortic aneurysm before and after local delivery of 10⁶ iron loaded VSMCs at Day 0, Day 21 and Day 28 (same animal). Gradient echo images evidenced hyposignal areas on the aortic wall immediately after delivery and until Day 28. Hyposignal area was circular at Day 0 and more focal next to the posterior part of the aortic wall at Day 28.

High field MR ex vivo imaging with pathological correlation

Two rats were sacrificed at Day 28, and 9.4 T MRI of their AAAs was performed ex vivo. MR ex vivo imaging was able to demonstrate low signal areas within the aortic

wall (Fig. 4, A). Perls staining at the same level evidenced iron labeled cells in the deep part of the neointima and in the adventitia. Their localization at histological examination was well correlated with hyposignal areas detected on 9.4 T MRI (Fig. 4, B).

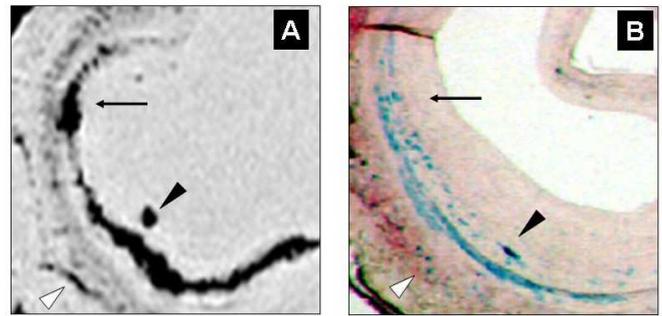


Figure 4. (A) 9.4T MR T₂*-weighted gradient echo images 28 days after local delivery of iron loaded VSMCs. Imaging Parameters: field of view 30 mm; T_R: 100 ms; T_E: 3 ms; flip angle: 25 degrees; matrix 256 x 256; slice thickness 80 μm. (B) Perls staining at the same level. High field MRI evidenced a crescent shape like hyposignal area in the deep portion of the aortic wall (arrow) adjacent to a more focal one (A, black arrowhead). Focal nodular hyposignal areas were also detected in the external part of the aortic wall (A, white arrowheads). Histologic examination with Perls staining at the same level (B) evidenced iron loaded cells in the deep part of the neointima (B, black arrowhead) and in the adventice (B, white arrowhead). Their localisation was relatively well correlated with hyposignal areas evidenced on T₂* weighted images. B: magnification ×40.

Iron labeled cells in aortic wall: location and distribution

Early-D0 histological analysis

Histological analysis on AAAs showed an enlargement of the aortic diameter, a destruction of the intimal layer and, in one rat, a limited thrombus next to the aortic wall. Sections from AAAs seeded with iron labeled VSMCs evidenced blue iron containing cells next to aortic wall ($n=2$) or within the thrombus ($n=1$) at Day 0 (Fig 5, A1). Immunohistological study showed that these cells were positive for alpha-actin immunostaining (non differentiating SMC phenotype marker) and negative for macrophage immunostaining (Fig. 5, B1-C1).

Perls was negative in both AAAs seeded with non-iron labeled VSMCs ($n=3$) or injected with free iron nanoparticles without cells ($n=3$).

Long term histological analysis ($n=10$)

At Day 7, Day 14 and Day 28, histological analysis revealed that the media was progressively recovered by a neointima formation in all animals receiving cell therapy and confirmed previous analysis (Allaire et al., 2004b). Perls staining detected iron loaded cells in the aortic wall at Day 7, Day 14 and Day 28. These cells were usually localized in one or two sites around the circumference of the aortic wall, mainly in the media and to a less extent in

the adventitia. At Day 28, iron-labeled cells were mainly localized in the deep portion of the neointima.

Immunohistological study (Fig. 5, second and third columns) showed that some iron labeled cells in the media were positive for alpha-actin immunostaining (non differentiating SMC phenotype marker) and negative for macrophage immunostaining at Day 7, Day 14 and Day 28. We also identified in the media iron labeled cells negative for both alpha-actin and macrophage immunostaining (Fig. 5, arrowheads). Several macrophages containing iron vesicles were also detected in the adventitia at the latter time point (Day 28) (Fig. 5, third column).

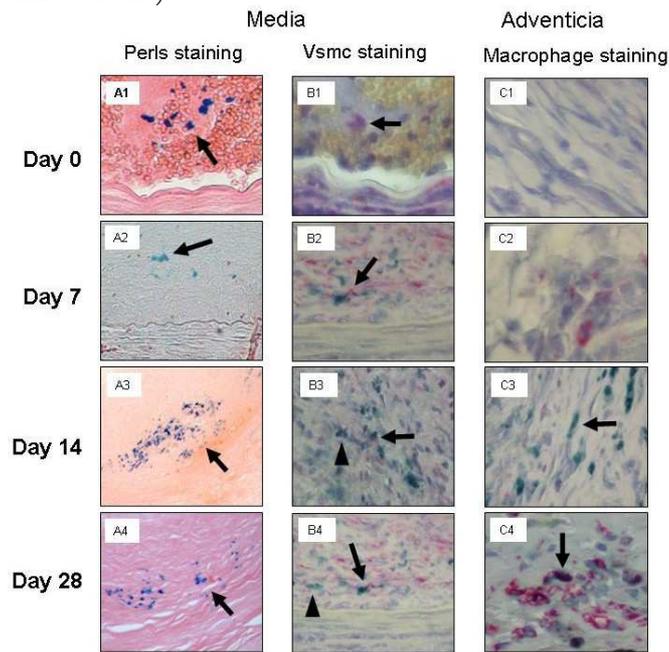


Figure 5. Perls staining (first column) revealed iron loaded cells (arrows) next to the aortic wall at Day 0 and in the neointima at Day 7, Day 14 and Day 28. Co-labeling for alpha actin and Perls staining in the media (second column) revealed that some of iron containing cells were positive for alpha actin (arrows). In contrast some Perls positive cells were negative for alpha actin staining (arrowheads) and macrophage staining (data not shown). Co-labeling of macrophage and Perls staining (third column) revealed iron loading cells in the adventicia at Day 14 and Day 28 (arrows). Some of these cells were identified as macrophages on immunostaining at Day 28 (C4, arrow).

Discussion

In this work, we assess feasibility of *in vivo* MRI tracking of magnetically labeled VSMCs seeded into AAA in rats. We demonstrated that: (1) *in vitro* cell labeling did not affect cell MMP/TIMP balance expression in cultured VSMCs and did not alter stabilizing properties of VSMCs on AAA diameter after seeding, (2) immediate delivery of iron labeled VSMCs can be assessed *in vivo* by MRI in AAA, (3) prolonged detection of hyposignal area is possible at least up to one month after delivery and (4)

iron loaded cells are recovered mainly in the neointima on histological analysis 28 days after delivery. We have also observed a good correlation of MRI diameter measurements with direct measurements of AAAs. To our knowledge, it is the first time that endovascular cell therapy for AAA is evaluated *in vivo* in terms of success of the procedure and efficiency on wall remodeling.

Cell therapy is a promising approach for the treatment of various pathologies such as myocardium infarction (Orlic et al., 2001a), lower limb ischemia (Tateishi-Yuyama et al., 2002) or brain tumor (Nakamizo et al., 2005). Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease of the vascular tree leading to different vascular responses such as stenosis, acute plaque rupture or aneurysm formation (Chan et al., 2005). Physiopathology of atherosclerosis is complex and implicates dysfunction of the endothelium, VSMCs, lipid-laden macrophages and T lymphocytes (Napoli et al., 1997). In AAAs, VSMC loss, inflammation and elastinolysis are observed in the media layer (Michel, 2001). Recent animal data suggest that endovascular local delivery of VSMCs in already formed AAAs restores healing of proteolytically injured vessels and stops aneurysm expansion (Allaire et al., 2004b). However, technical success of cell injection can not be evaluated after seeding within the same living animal, and the fate of injected cells remains non investigated.

MRI cell tracking is a powerful tool to evaluate and to follow cell therapy (Allport and Weissleder, 2001; Bulte et al., 2001; Hoehn et al., 2002; Magnitsky et al., 2005). Using magnetically labeled cells with anionic nanoparticles, we recently documented that focal intramyocardial injection sites of iron labeled SMCs can be detected *ex vivo* with a clinical 1.5 T MR imager (Riviere et al., 2005). Anionic magnetic nanoparticles used as cell labeling agents, have the advantage to be rapidly internalized in many cell types without toxicity (Billotey et al., 2003; Wilhelm et al., 2003a; Wilhelm et al., 2002a). Here, we report that a previous cell labeling in culture with ultrasmall iron oxide particles did not significantly modify MMP 9 and TIMP 1,3 mRNA expression. TIMPs expressed by seeded cells seem to have a great influence on efficiency of cell therapy in AAAs in rats (Allaire et al., 2002). These genes were chosen because of their mediate important behaviors of VSMCs such as migration, proliferation and survival and because they are critical for aneurysm progression (Allaire et al., 1998; Shah, 1997).

Estimated iron load per cell (1.7 ± 0.6 pg/cell obtained by ESR and 3.9 ± 0.9 pg/cell obtained by MP) was in agreement with previous works performed on vascular cells (Riviere et al., 2005). This cell labeling was demonstrated to be sufficient to allow *in vitro* cell visualization at least 14 days after labeling procedure and *ex vivo* cell detection after local heart injection in ischemic rats (Riviere et al., 2005) using clinical 1.5 T MRI.

In the present study, local delivery of iron loaded VSMCs was documented *in vivo* by MRI, and evidenced as

hyposignal areas within the aortic wall in all animals receiving iron-labeled VSMC therapy. Signal on T2* gradient echo sequences at Day 0 was significantly reduced immediately after seeding of labeled cells, even if most of the VSMCs were probably washed away after blood flow restauration in the graft lumen and did not attach to the aortic wall. Probably less than 10% of injected cells (10^5 cells) remained attach to the aortic wall, but this number is sufficient to allow in vivo 1.5T MRI detection. Using the same experimental set-up (same receiver coil and imaging sequence) *in vitro* in a previous report (Riviere et al., 2005), as small as 1000 labeled cells (1.7 pg/cells) could be easily detected in gradient echo sequence and threshold detection should be lower than 1000 cells.

Animals were subjected to 4 rotations during a total of 8 minutes during cell delivery in order to obtain an homogenous repartition of cells on the thrombus surface of the AAA. Circular heterogenous low signal areas were detected within aortic wall by MRI at Day 0 in all animals who were injected using this procedure, documenting actual circular cells delivery on aneurysmal thrombus. In one experiment, the animal did not undergo rotation during cell injection procedure and MRI confirmed cell deposition on the half of the vessel (Fig. 2). This animal demonstrated that MRI achieves topological assessment of cell delivery. Therefore, MRI combined with magnetic cell labeling seems to be efficient to assess in vivo cell delivery and to document topography of cell attachment, immediately after cell seeding.

In vivo MRI was also shown to enable aortic diameter measurement after iron-labeled cell delivery, assessing therapeutic effect of VSMCs in AAA. In addition, thickening of aortic wall aneurysm from Day 0 to Day 28 was also detected by in vivo MRI, related to the intimal hyperplasia evidenced on histological analysis after cell therapy. This new layer induced by cell therapy is believed to stabilize aneurysm expansion (Allaire et al., 2002; Losy et al., 2003). MRI appears therefore as a useful tool to document correction of aneurysm wall atrophy by cell therapy.

Prolonged detection of hyposignal in AAA was possible in vivo with a clinical 1.5T MRI up to one month. Histologic cross sections showed that VSMCs were mainly localized in the neointimal layer with few cells in the adventitia. Immunohistological staining revealed that some iron-labeled cells in the intima were VSMCs and thus probably corresponding to the initial injected labeled VSMCs. Other iron-labeled cells present in the neointima were negative both for alpha actin and macrophage staining, which could be attributed to de-differentiation of seeded VSMCs in the remodeling tissue, with a progressive loss of SMC markers inside the remodeling AAA. Cells found positive for both macrophage and perls immunostaining are likely reflecting phagocytosis of fragment of apoptotic bodies of labeled cells by macrophages.

In vivo cell follow-up by MRI has been reported in previous works in other applications of cell therapy using iron labeling (Anderson et al., 2005; Kraitchman et al., 2003). Iron labeling in those studies was performed using dextran-coated nanoparticles, which requires longer incubation time (24 to 48h) and the use of a transfection agent to achieve sufficient iron load per cell for MRI detection. In this study an incubation of only one hour at relatively low iron concentration (extracellular [Fe]=1mM) ensured an iron load per cell sufficient to induce signal loss at 1.5T MRI. Percentage of signal loss which decreased from Day 0 (-84%) to Day 28 (-46%) may be linked to proliferation of implanted cells. In fact, cell proliferation leads to a decrease of iron load per cell, which induces signal modification in gradient echo sequences, as found in the previous in vitro work (Riviere et al., 2005). Low signal aortic wall areas remained globally unchanged (circumferential) in most cases (77%) between the initial MRI and the MRI performed later (Day 7 to day 28). This means that bulk of seeded cells did not disappear or migrate further after the initial loss directly following transplantation due to blood flow restoration. In three other animals, we detected a reduction of hyposignal area, but low spatial resolution of 1.5 MRI does not allow precise location.

Images of aneurysm obtained at Day 28 with a 9.4T MRI confirmed the improvement of spatial resolution and showed, in conjunction with Perls staining, that iron loaded cells were localized mainly in the deep portion of intimal hyperplasia and less in the adventicia at Day 28. In addition, these results confirm that T2* gradient echo images performed on high field 9.4 T MRI can approach histological resolution, as already shown *in vitro* (Dodd et al., 1999), but also *in vivo* (Zelivyanskaya et al., 2003).

Limitations

Precise cells localization in the aortic wall by a clinical 1.5T MRI is limited because of low spatial resolution. This limitation can be overcome by performing *in vivo* high field MRI or by using new-design detection coils such as supraconductive surface antenna or newly developed sequences and optimize imaging gradients (Foster-Gareau et al., 2003).

By histology, unambiguous identification of injected labeled cells up to one month remains a problem. We have used a double labeling with a fluorescent cell membrane tag and iron nanoparticles to try to overcome this problem. Nevertheless, fluorescent tracking is limited if a prolonged detection is required (> 2 weeks), and in case of death of the seeded cells, cell fragments containing iron nanoparticles can be uptaken by macrophages. As suggested by Borrenstein et al about myocardium cell therapy (Borenstein et al., 2004), only a genetic labeling would permit unambiguous identification of the implanted cells and analysis of their fate. These

experiments are currently under investigation in genetically engineered pigs.

Conclusion

Cell therapy of AAA emphasizes the need to validate cell delivery and to track their fate *in vivo*. In this study, we demonstrate for the first time that iron loaded VSMCs can be visualized and followed *in vivo* after local endovascular delivery in the lumen of experimental AAAs. Characterization of loaded cells on histology remains difficult in the long term, but follow-up is possible with MRI at least up to one month and MR imaging of AAAs seeded with iron labeled cells correlated with aneurym diameter stabilization and wall healing. Such cell imaging technique could thus be a versatile tool for surgeon to evaluate cell transplantation success.

3.9 Modèle d'incontinence urinaire

3.9.1 Problématique

L'équipe d'urologues du centre de recherche chirurgicale de l'hôpital Henri Mondor développe un traitement de l'incontinence urinaire par thérapie cellulaire. Plus précisément, des explants de fibres musculaires sont implantés directement au niveau de la zone lésée. **Ces explants de fibres musculaires contiennent entre autre des cellules précurseurs musculaires (CPMs) ou cellules satellites.** Si ces explants sont implantés à proximité d'une zone de destruction musculaire, **ces cellules sont activées, prolifèrent et migrent hors de l'explant vers la zone lésée puis se différencient et fusionnent pour reformer de nouvelles fibres musculaires (constituées de myotubes).** L'injection de CPMs a été utilisée principalement dans le cadre des myopathies génétiquement déterminées (Gussoni et al., 1999) et pour réparer des muscles défectueux (Irintchev and Wernig, 1994; Reimann et al., 2000). L'originalité de cette étude est **d'implanter par autogreffes, non pas directement les CPMs, mais les explants d'où sortiront ces cellules satellites** (Fan et al., 1996). Ceci évite une phase de culture *in vitro*, qui peut souvent modifier le phénotype et le caractère « souches » de ces cellules. Dans ce modèle, le marquage magnétique d'explants semblait une approche intéressante pour savoir d'une part si l'implantation d'explants s'était faite correctement et d'autre part si les cellules satellites avaient bien migré vers la zone lésée.

3.9.2 Démarche expérimentale

Nous avons donc mené une série d'expériences *in vitro* et *in vivo*. Comme dans le cas du modèle d'anévrisme d'aorte abdominale, les expériences *in vitro* nous ont permis d'une part de vérifier l'innocuité du marquage magnétique sur la prolifération et le phénotype cellulaire, et d'autre part d'optimiser le marquage magnétique pour les expériences *in vivo*.

L'injection *in vivo* dans ce modèle est également une injection locale. La grande différence est que cette fois-ci, ce ne sont pas des cellules qui sont injectées, mais des explants d'où sortiront les cellules à finalité thérapeutique. Ce sont donc les explants qui seront injectées *in vivo* qu'il faut marquer magnétiquement. *In vivo*, des cellules issues de ces explants migreront vers la zone lésée. Il est donc particulièrement intéressant d'étudier si les cellules qui sortent de ces explants sont elles aussi marquées magnétiquement.

Dans ce contexte, il apparaît important de connaître d'une part le taux d'internalisation des particules magnétiques par les cellules issues d'explants et d'autre part de savoir si ces cellules, une fois marquées magnétiquement gardent leur capacité à proliférer et à former des myotubes.

L'interaction explants/nanoparticules est différente de l'interaction cellule/nanoparticules. En effet, nous sommes ici en présence d'un tissu, composé de différents types cellulaires, avec une architecture et une organisation interne bien particulière. Le modèle d'internalisation par interaction électrostatique n'est donc pas directement applicable dans ce cas. Nous avons donc en parallèle étudié l'interaction des particules magnétiques avec les explants eux-mêmes. Pour comprendre les interactions explants/nanoparticules, deux types de marquage magnétique ont été analysés : (1) sur les cellules issues d'explants en culture et (2) sur les explants eux-mêmes. La démarche expérimentale suivie pour cette série d'expérience *in vitro* est représentée sur la Figure 33.

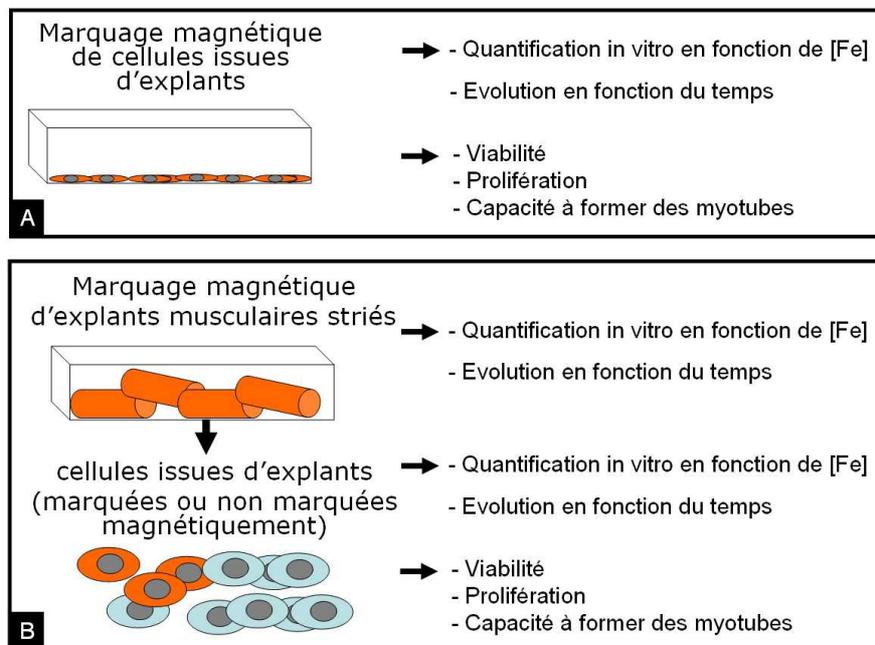


Figure 33

Démarche expérimentale pour le modèle d'incontinence urinaire. (A) Pour les cellules issues d'explants en culture et (B) pour les explants en culture. L'analyse a été faite jusqu'à un mois après marquage.

Des explants marqués magnétiquement ont ensuite été transplantés au sein de l'urètre de truies (n=3) et le devenir de ces explants *in vivo* a été étudié par IRM.

Une analyse qualitative du marquage magnétique a été faite par microscopie électronique à transmission, suivant le même protocole que celui présenté dans l'article du paragraphe 3.6.

L'analyse quantitative a été réalisée grâce aux deux méthodes décrites dans l'article du paragraphe 3.6. : la magnétophorèse et la Résonance Paramagnétique Electronique (RPE).

3.9.3 Résultats

Inocuité du marquage magnétique

Les études *in vitro* ont démontré l'inocuité de ce marquage : les cellules issues d'explants marqués magnétiquement à des concentrations de 10 et 25 mM gardent une croissance cellulaire comparable aux cellules témoins (Figure 34.A, B), et conservent leur capacité à former des myotubes (Figure 34.C).

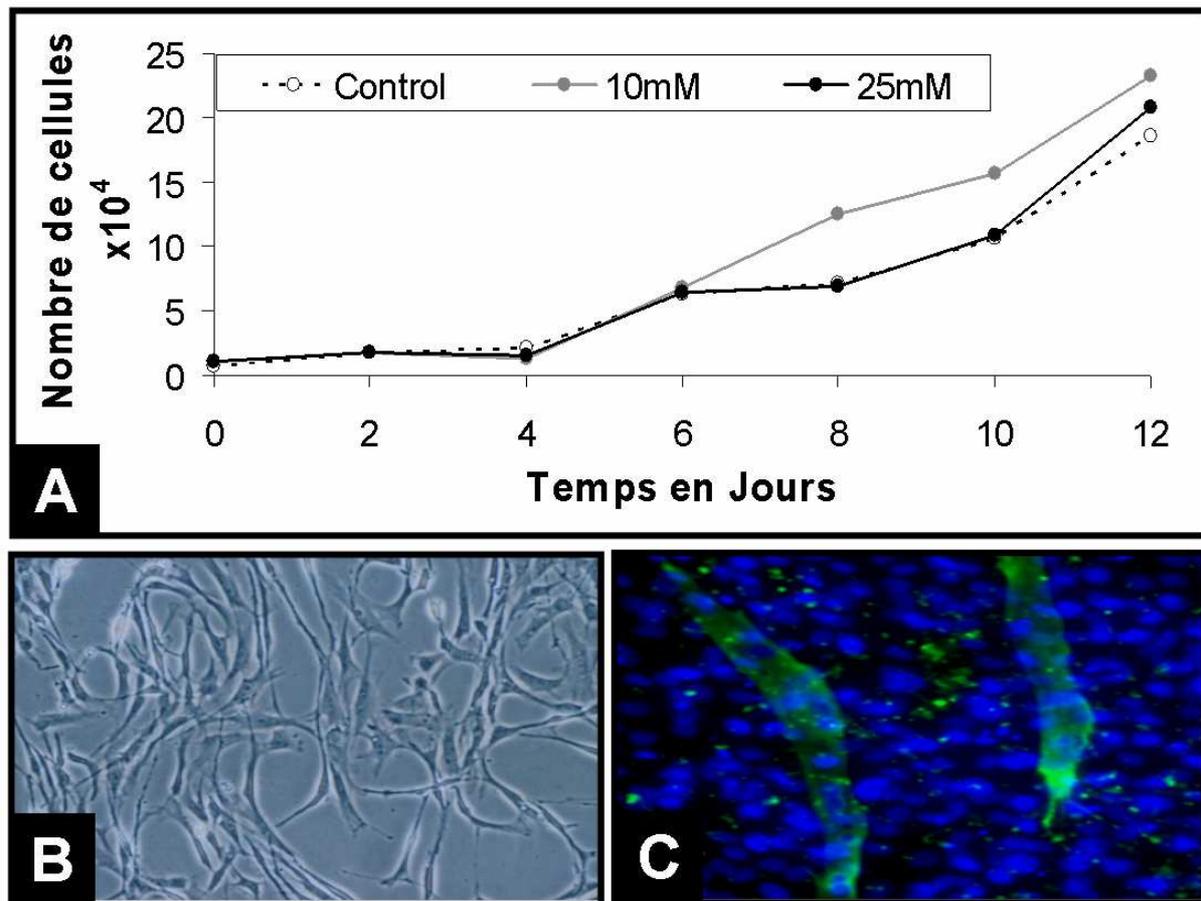


Figure 34

Analyse de l'effet du marquage magnétique sur la prolifération cellulaire (A), la capacité des cellules à sortir des explants (B) et la capacité à se différencier en myotubes (C). (A) : Prolifération cellulaire pour une population contrôlée (trait pointillé), pour des cellules incubées avec une solution de nanoparticules magnétiques à une concentration en fer [Fe]=10mM (trait gris) et [Fe]=25mM (trait noir). (B) : Cellules issues d'explants 7 jours après marquage magnétique. La morphologie des cellules en culture reste normale. (C) : Marquage desmyosine après 10 jours en culture. La desmyosine (coloration verte) est un marqueur des myotubes. Les noyaux ont été marqués par une coloration bleue.

Analyse qualitative du marquage magnétique : microscopie électronique à transmission

Pour mieux comprendre les interactions explants/nanoparticules, les explants ont été analysés qualitativement en microscopie électronique à transmission. Comme on peut le voir sur la Figure 35.A, les nanoparticules magnétiques existent sous deux formes au sein des explants : (1) libres,

dans la matrice extracellulaire et (2) internalisées au sein de vésicules intracellulaires. On peut donc penser que ces explants, au sein desquels existe un trafic cellulaire, servent en quelque sorte de réservoirs de nanoparticules magnétiques. Il paraît donc probable que les cellules issues de ces explants soient elles aussi marquées magnétiquement. Néanmoins, seulement un faible pourcentage des cellules issues des explants observées en microscopie électronique contiennent des endosomes magnétiques. Lorsque c'est le cas, le nombre d'endosomes magnétiques par coupe est très inférieur au nombre d'endosomes magnétiques sur les coupes de cellules marquées magnétiquement au sein des explants (Figure 35.B). Cette observation laisse supposer que les cellules qui internalisent les nanoparticules de façon prépondérante ne sont pas celles qui sortent des explants.

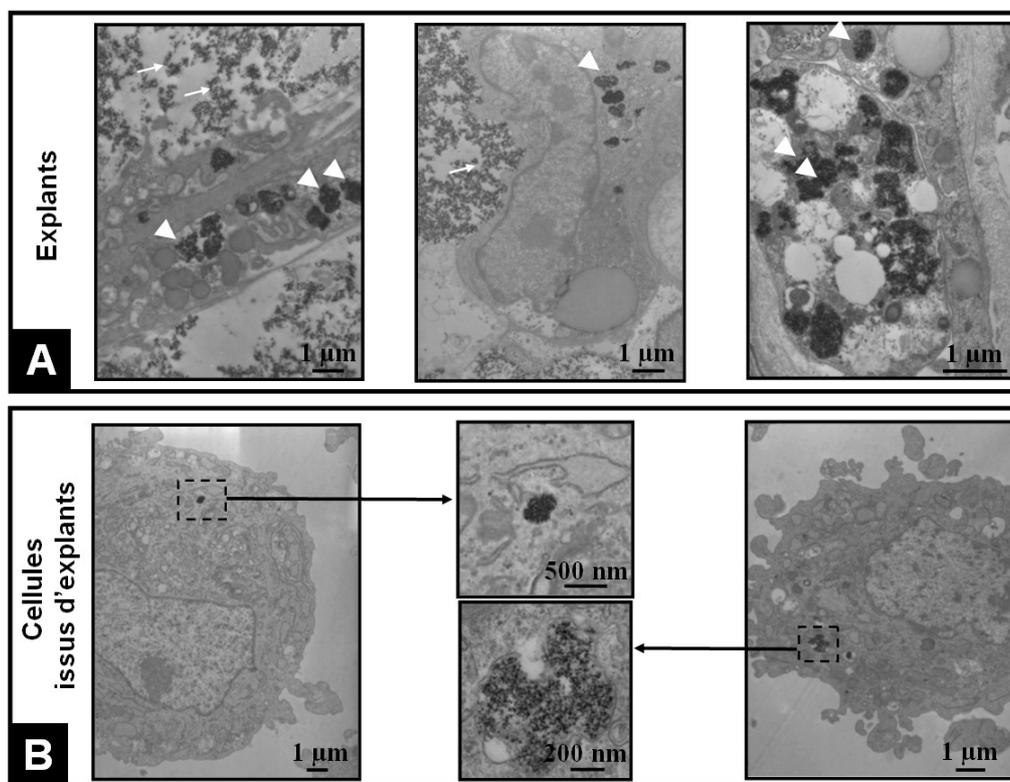


Figure 35

Clichés de microscopie électronique obtenus pour les explants en culture (A) et pour les cellules issues de ces explants (B). Les explants ont ici été marqués 1h à 37°C à une concentration en fer [Fe] = 25 mM. La présence de particules internalisées dans les cellules (flèches pleines), ainsi que de particules libres (petites flèches), est visible au sein des explants. Quelques cellules issues d'explants ont internalisées des particules magnétiques. Les vésicules d'endocytose correspondantes sont montrées à plus fort grossissement.

Analyse quantitative du marquage magnétique : Magnétophorèse et RPE

La quantification faite par magnétophorèse de la masse de fer par cellule issue d'explants montre que ces cellules suivent bien une internalisation classique, avec une masse de fer par cellule qui augmente avec la concentration en fer dans le milieu d'incubation jusqu'à un plateau (Figure

36.A₁). La distribution de charge de fer par cellule est cependant assez large (Figure 36.A₂). La largeur de la distribution s'explique par le fait que les cellules issues d'explants sont de types cellulaires différents (les cellules satellites ne représentant que 3 à 6% de ces cellules).

Nous nous sommes également intéressé à la quantification de la charge magnétique dans les explants eux-mêmes, puisque ce sont ces derniers qui vont être implantés chez l'animal. La quantification de la masse de fer par explant, analysée à partir des spectres RPE obtenus pour les explants secs, montre que là encore, plus la concentration en fer dans le milieu d'incubation est importante, plus la masse de fer par explant augmente (Figure 36.B₁). Au cours du temps, cette charge en fer diminue. La diminution correspond au nombre de cellules marquées magnétiquement qui sont sorties des explants (Figure 36.B₂).

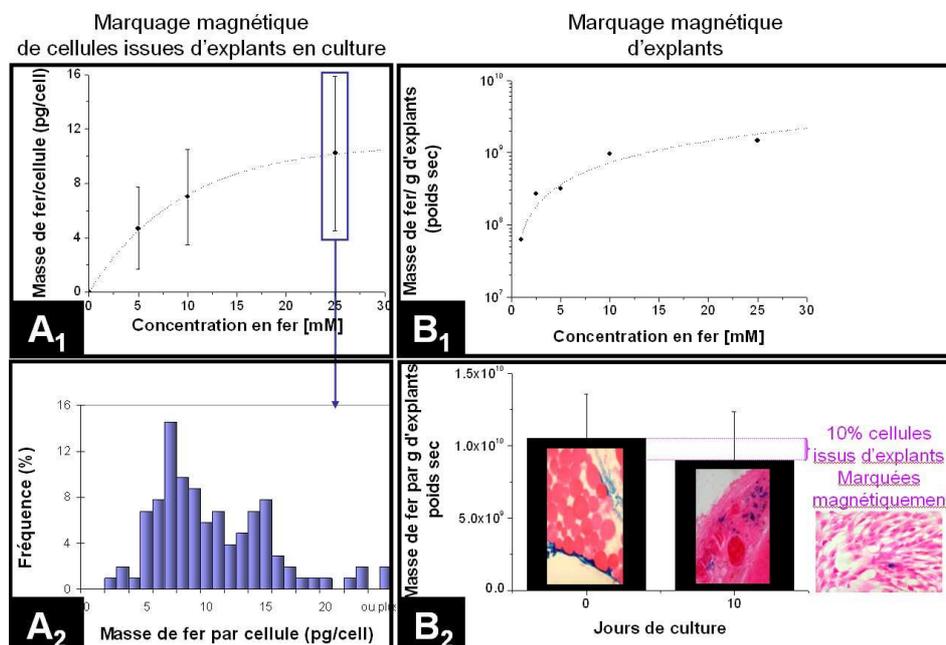


Figure 36

Quantification de la masse de fer par cellule (A₁ et A₂) et par explants (B₁ et B₂). La masse de fer par cellule augmente en fonction de la concentration en fer dans le milieu d'incubation (A₁). La largeur de la distribution (A₂) s'explique par l'hétérogénéité des types cellulaires. De même, la masse de fer par explants augmente en fonction de la concentration en fer dans le milieu d'incubation (B₁). Cette masse de fer par explants diminue au cours du temps de culture (B₂). La diminution correspondant au nombre de cellules marquées magnétiquement qui sont sorties des explants.

Analyse IRM

En parallèle, nous avons également analysé le signal IRM de ces explants *in vitro* afin de choisir les séquences IRM et les conditions d'incubation optimum (non montré).

Nous avons ensuite utilisé ce type de marquage pour localiser *in vivo* chez la truie les explants transplantés par IRM à 0,3T. Cette étude montre qu'il est possible de localiser ces explants même trois mois après leur implantation (Figure 37).

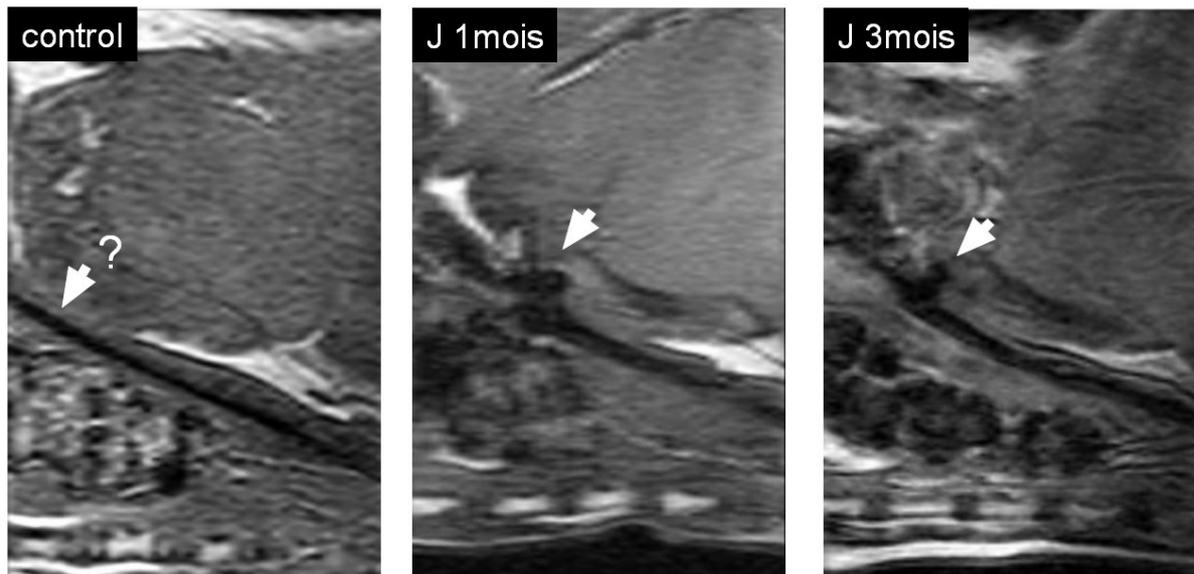


Figure 37

Images obtenues en IRM 0.3T (Séquence echo de gradient T1 ($T_r = 40$ ms, $T_E = 9$ ms)). De gauche à droite, les flèches représentent la zone d'implantation des explants non marqués magnétiquement (contrôle), puis un mois et trois mois après implantation d'explants marqués magnétiquement.

Ce marquage magnétique, associé à la technique IRM apparaît donc comme un moyen intéressant pour localiser et déterminer la réussite d'une telle transplantation. En revanche, les résultats histologiques sont plus difficiles à interpréter (Figure 38). En effet, même si les coupes de l'urètre contiennent des cellules marquées magnétiquement (colorées en bleu sur la Figure 38), il reste difficile de savoir de quels types cellulaires il s'agit. On retrouve en effet des myotubes à proximité des cellules marquées magnétiquement, mais sans réelle colocalisation de ces deux populations (Figure 38).

Coupe transversale de l'urètre

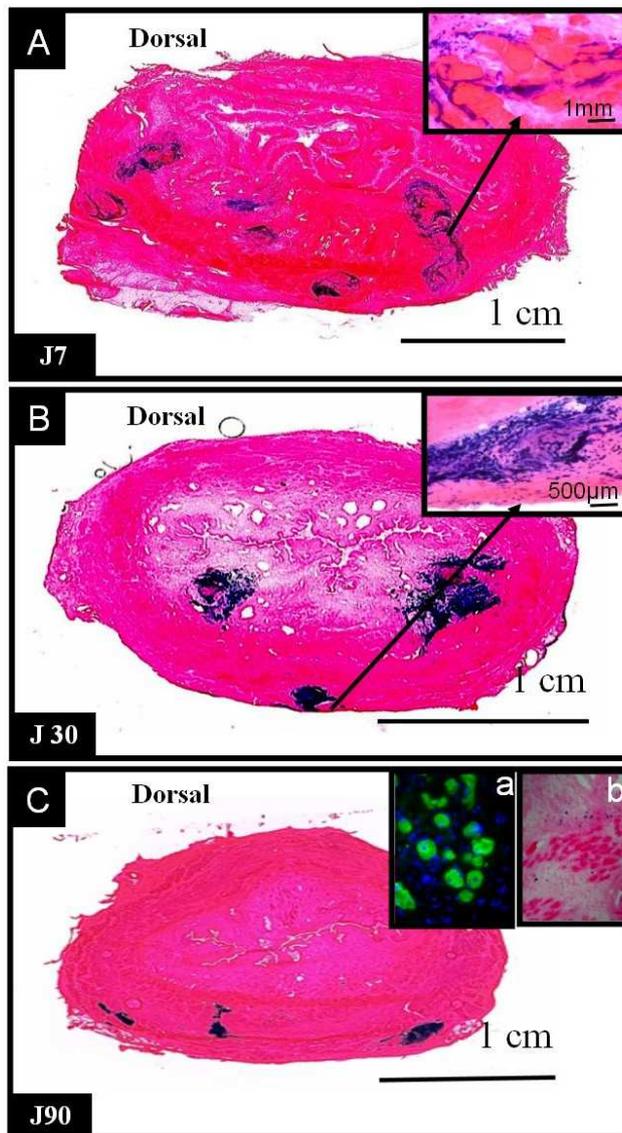


Figure 38

Coupes histologiques d'urètres 7 jours (A), 30 jours (B) et 90 jours (C) après transplantation in vivo. La coloration au bleu de Perls correspond aux cellules contenant du fer. Trois mois après implantation, il est possible de trouver de nouveaux myotubes ((C) insert a, coloré en vert) à proximité des zones marquées au perls ((C) insert b, coloré en bleu).

3.10 Conclusion et Perspectives

Les trois études présentées dans ce manuscrit sont des études sur les potentialités et les limitations d'un marquage magnétique pour le suivi de thérapies cellulaires longitudinal, non-invasif et chez le même animal par IRM.

Les deux exemples de thérapies cellulaires utilisées sont des thérapies dans lesquelles les cellules sont directement transplantées au niveau de la zone à traiter. Le but est d'abord de savoir si la transplantation des cellules ou des explants a été réussie: les cellules adhèrent-elles bien sur la paroi de l'anévrisme ? Les explants ont-ils bien été implantés correctement et au bon endroit ?

Une fois cette transplantation validée, il est ensuite important de suivre à long terme le devenir du greffon et d'analyser comment il s'intègre dans l'environnement.

Pour répondre à ces questions, une résolution cellulaire de l'imageur n'est donc pas indispensable. En revanche, il est important de garder un signal détectable par IRM même après plusieurs divisions cellulaires. Il a été démontré dans l'article présenté au paragraphe 3.6 ainsi que dans des études antérieures du groupe (Smirnov et al., 2004) que la charge en fer se répartissait de façon équitable entre cellules filles. Cette dilution du marquage au cours du temps laisse supposer des propriétés d'agents de contraste limitées à des temps d'observation relativement courts. Malgré cette limitation, la sensibilité des séquences pondérées en T_2 et surtout en T_2^* présentées dans l'article du paragraphe 3.6 pour ce type de marqueur montre dans les expériences *in vitro*, des propriétés d'agents de contraste à long terme, dans la mesure où les cellules prolifèrent au sein du même espace sans activer un processus de migration. Ces résultats sont confirmés par les deux études *in vivo* qui démontrent que la détection reste possible même un mois et trois mois après transplantation, pratiquement sans aucune modification du signal IRM. Les études *in vivo* ont également confirmé la supériorité des séquences pondérées en T_2^* pour détecter ce type d'agents de contraste. Dans l'étude sur l'anévrisme, alors que dans les séquences pondérées T_2^* , une région en hyposignal est clairement détectable là où les cellules ont été transplantées, la détection est impossible sur les séquences pondérées T_2 . En ce qui concerne le modèle d'incontinence urinaire, là encore les séquences pondérées en T_2^* se sont avérées être les plus sensibles à la présence des explants marqués magnétiquement. Néanmoins, des problèmes d'artéfacts pour ce type de séquence à 0.3T nous ont orienté vers des séquences écho de gradient pondéré T_1 .

Pour reprendre le cahier des charges présenté dans le paragraphe 3.1.2, les nanoparticules magnétiques anioniques utilisées dans le cadre de cette thèse répondent à la plupart des points clés relevés (Tableau 4).

| Marqueur idéal | | Nanoparticules magnétiques anioniques | |
|--|---|---------------------------------------|---|
| Biocompatibilité + | - Pas de modification de la prolifération | | |
| | - N'affectent pas les capacités réparatrices des cellules utilisées : | | |
| | Cellules Musculaires Lisses (CMLs) | <i>In vitro</i> | - Sécrétion d'inhibiteurs de métalloprotéinases jouant un rôle dans la stabilisation de l'anévrisme |
| | | <i>In vivo</i> | - Stabilisation des anévrismes après transplantation de CMLs marquées magnétiquement. |
| | Cellules Précurseurs Musculaires (CPMs) | <i>In vitro</i> | - Capacité de sortir des explants conservée - Différentiation en myotubes |
| | | <i>In vivo</i> | - Récupération d'une activité musculaire de l'urètre |
| Internalisé par les cellules + | Oui | | |
| Stabilité dans le temps - | - Diminution de la charge en fer par cellule proportionnelle à la prolifération - Dégradation lente au sein des lysosomes | | → Suivi à moyen terme possible |
| Propriété de contraste + | - Le contraste IRM reste constant si la prolifération cellulaire reste confinée au sein d'un même volume (sans processus de migration) - l'agrégation des particules au sein des cellules améliore les propriétés de contraste : un des meilleurs rapport r_2/r_1 des agents de contraste type T_2 à l'heure actuelle (Tableau 4). | | |
| Fiabilité du marquage - | - Aucune information sur la viabilité cellulaire <i>in vivo</i> - Faux positifs si débris cellulaire phagocytés par macrophages | | → Nécessité d'un double marquage à long terme |

Tableau 4.

Points respectés et non respectés du cahier des charges du marqueur idéal

Leur utilisation pour l'imagerie cellulaire par IRM apparaît ici comme un outil d'aide à la décision pour le chirurgien, pour valider et localiser la transplantation cellulaire à moyen et long terme. Dans ce contexte, l'IRM pourrait s'avérer utile pour déterminer de façon optimale la cinétique et le site d'injection des cellules thérapeutiques (Magnitsky et al., 2005).

La problématique est différente lorsque l'on veut suivre le devenir de cellules injectées de façon systémique. Il est dans ce cas important de descendre à une résolution cellulaire pour détecter les quelques cellules migrant vers la zone lésée (Smirnov, 2005 (en cours de préparation)).

Comme mentionné précédemment, une possibilité pour augmenter la résolution est de travailler sur des IRMs à hauts champs. En effet, plus on augmente l'intensité du champ magnétique,

meilleur est le rapport signal/bruit et donc meilleur est la résolution spatiale. On peut ainsi arriver à des résolutions cellulaires avec des voxels de l'ordre de $40 \mu\text{m}^3$. C'est ce que l'on a fait sur quelques anévrismes ex-vivo où une résolution proche de celle obtenue en histologie a pu être atteinte à 9.4T.

Pour des cellules marquées avec des particules superparamagnétiques de $0.9 \mu\text{m}$ imagées à 11.7T, il a par exemple été possible de distinguer des cellules progénitrices endothéliales de façon individuelle *in vitro* (Hinds et al., 2003). Ce même type de particules a permis récemment d'imager avec une très haute résolution ($42 \times 25 \mu\text{m}$) des cellules souches injectées dans la cavité médullaire du fémur (Mayer-Kuckuk et al., 2005).

En utilisant des nanoparticules dextran (Sinerem, Guerbet) et le fugene comme agent de transfection, l'équipe de (Hoehn et al., 2002) sur un imageur 7T, arrivent à un seuil de détection *in vitro* de 40 cellules et *in vivo* de 500 cellules marquées. En associant ce suivi non-invasif par IRM avec des analyses immunohistochimiques, la migration et la différenciation des cellules souches implantées a ainsi été démontré, et ce avec une résolution IRM de $78 \mu\text{m}^3$.

Malheureusement, les études à haut champ sont souvent limitées par la taille de l'entrefer, qui permet d'imager seulement des échantillons relativement petits (souris, rat). Beaucoup d'études utilisent en fait des IRMs d'intensité de champ plus faible, et réservent les IRMs hauts champs pour une analyse ex-vivo. C'est le cas par exemple d'une étude récente démontrant l'intérêt de l'IRM pour le suivi de la migration de cellules souches au sein du cerveau (Magnitsky et al., 2005). En utilisant des particules commerciales enrobées de dextran (Feridex) et la poly-l-lysine comme agent de transfection, il a été possible de détecter un minimum de 500 cellules au 4.7T et seulement 100 cellules au 9.4T.

Toujours à 4.7T, (Dodd et al., 1999) ont démontré la faisabilité d'une détection unicellulaire et ont ainsi pu corréliser les images IRMs obtenues *in vitro* avec les images de fluorescences des mêmes cellules fluorescentes et marquées magnétiquement.

Sur des IRMs cliniques à plus bas champ (1.5T), il est néanmoins également possible d'arriver à une telle résolution grâce à l'utilisation de séquences particulières type FIESTA par exemple en combinaison avec des gradients de champs et des antennes de détection optimisés. De cette façon, (Foster-Gareau et al., 2003) ont tout aussi bien pu corréliser leurs images de cellules uniques individuelles obtenues en IRM, avec les images de microscopie optique.

A long terme, l'association de l'IRM avec d'autres méthodes d'imagerie, telles que des méthodes optiques, pourrait permettre d'arriver à une meilleure compréhension des processus biologiques mis en jeu dans les thérapies cellulaires.

Il paraît en effet peu probable que l'IRM seule puisse permettre une analyse approfondie du devenir des cellules transplantées, comme par exemple détecter le niveau de différenciation de cellules individuelles transplantées. De plus, comme évoqué dans le modèle de l'anévrisme, il est possible d'avoir des faux positifs si des cellules phagocytaires captent des débris cellulaires de cellules mortes contenant des particules d'oxydes de fer.

En effet, le type de marquage employé jusqu'à présent ne donne aucune information sur le type et la viabilité cellulaire. Il semble donc primordial de combiner l'IRM à d'autres méthodes d'imagerie pour avoir une meilleure compréhension des processus mis en jeu et avoir une vision la plus proche possible de la réalité. De plus, à long terme, il sera peut être nécessaire de transplanter différents types cellulaires de manière à réparer de façon totale des zones lésées à l'architecture et l'organisation complexes telles que le cœur (Melo et al., 2004), d'où l'intérêt des marqueurs multifonctionnels.

Une autre limitation de l'IRM est qu'il est parfois difficile de discriminer entre l'hyposignal dû aux nanoparticules et les artéfacts. Des séquences dédiées pour la détection de ces nanoparticules pourraient être intéressantes. Une séquence récemment développée qui permet d'avoir un contraste positif dans les zones où les nanoparticules sont présentes pourrait s'avérer particulièrement utile (Cristine et al., 2004).

Enfin, même si la relaxivité r_2 est directement proportionnelle aux nombres de cellules marquées *in vitro*, comme suggéré dans l'article présenté au paragraphe 3.6, une corrélation fiable entre l'hyposignal et le nombres de cellules marquées présentes *in vivo* reste jusqu'à présent difficile. Des essais encourageant ont toutefois été mené par un autre doctorant de l'équipe (Smirnov et al., 2004). Une méthodologie dédiée à cette corrélation reste encore à développer.

Chapitre 4 :

Guidage magnétique *in vivo*

| | | |
|-----|---|-----|
| 4.1 | GUIDER MAGNÉTIQUEMENT LES CELLULES..... | 123 |
| 4.2 | GUIDER MAGNETIQUEMENT DES VECTEURS DE MEDICAMENTS | 124 |
| 4.3 | SYSTEMIC TARGETING OF BRAIN BY MAGNETIC DRIVING OF NANO-HYBRID CARRIERS | 126 |
| | <i>Abstract</i> | 126 |
| | <i>Introduction</i> | 127 |
| | <i>Materials and Methods</i> | 128 |
| | <i>Results</i> | 131 |
| | <i>Discussion</i> | 133 |
| | <i>Conclusion</i> | 136 |
| 4.4 | GUIDAGE MAGNETIQUE CELLULAIRE : PERSPECTIVES | 137 |

Chapitre 4

Guidage magnétique *in vivo*

Nous avons vu dans le chapitre précédent comment les nanoparticules magnétiques pouvaient être utilisées en tant qu'agents de contraste cellulaire en IRM. En marquant ainsi magnétiquement les cellules, il est possible de suivre la migration d'une population cellulaire de manière non-invasive, chez l'animal vivant.

Un autre avantage des nanoparticules magnétiques qui n'a pas encore été évoqué dans ce manuscrit est le fait **qu'elles peuvent être manipulables, lorsqu'elles sont agrégées sous forme d'endosomes, par l'application d'un gradient de champ magnétique** ou d'un champ magnétique uniforme. Une telle manipulation magnétique a pu ainsi permettre, comme évoqué dans le chapitre 2, de sonder les propriétés viscoélastiques de la cellule (Wilhelm et al., 2004; Wilhelm et al., 2003b). Une autre possibilité est d'utiliser ces particules magnétiques confinées au sein des endosomes intracellulaires pour guider magnétiquement les cellules au sein de l'organisme. Ceci peut s'avérer utile pour potentialiser une thérapie cellulaire. Dans le cas des cellules souches par exemple, leur différenciation vers un type cellulaire donné est activée en fonction de l'environnement tissulaire. Par conséquent, si on peut **favoriser l'implantation de cellules marquées dans l'organe à traiter par guidage magnétique**, on orientera la différenciation des cellules souches en cellules d'intérêt thérapeutique et on améliorera d'autant la réparation tissulaire, tout en visualisant par IRM la localisation du greffon. En appliquant un gradient de champ magnétique local, on peut donc penser forcer ce devenir en exploitant simplement les propriétés magnétiques des cellules marquées.

4.1 Guider magnétiquement les cellules

En collaboration avec l'UMR-CNRS 7052 de Lariboisière, nous avons voulu **tester la possibilité d'un guidage magnétique de cellules marquées**. Un système *in vitro* modélisant la circulation à l'intérieur d'un capillaire sanguin a d'abord été réalisé. Après l'application d'un gradient de champ magnétique local, nous avons ainsi pu visualiser l'attraction de macrophages (marqués à 10 ± 1 pg de fer/ cellules) fluorescents marqués magnétiquement (Figure 39), contrant un débit D de 30 μ L/min (sur une section rectangulaire de 0.2/2 mm soit une vitesse du flux= $\frac{D}{Section}=1.25\text{mm/s}$)

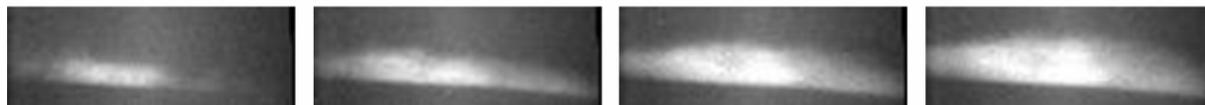


Figure 39. Attraction de macrophages magnétiques et fluorescents circulant dans un capillaire. L'accumulation de fluorescence au cours du temps (t_0 , t_4s , t_{8s} , t_{12s}) est dû à l'arrêt des macrophages magnétiques par un gradient de champ magnétique. (aimant en bas de la série d'images, voir l'article du paragraphe 4.3 pour ses caractéristiques)

Le guidage de macrophages marquées magnétiquement (10 ± 1 pg de fer/ cellules) mais également de cellules souches marquées magnétiquement (5.8 ± 0.4 pg de fer/ cellules) *in vivo* a ensuite été testé. Cette équipe a en effet développé un modèle qui permet de visualiser la circulation du cerveau de souris par microscopie confocale à fluorescence (Seylaz et al., 1999). Il s'agit d'une fenêtre collée de manière étanche sur le cerveau de la souris, dont la boîte crânienne a été préalablement rabotée. Après injection en intraveineuse de globules rouges fluorescents (erythrocytes), on peut par exemple visualiser toute la microcirculation du cerveau. Malheureusement, probablement en raison de problèmes d'incompatibilité cellulaire (tailles cellulaires trop grandes, ou reconnaissance par le système immunitaire), nous n'avons jusqu'à présent pas réussi à visualiser l'arrivée de nos cellules dans la circulation sanguine du cerveau de la souris, contrairement aux globules rouges. Nous n'avons donc pas pu les stopper ($n=2$ animaux pour chaque type cellulaire). Nous avons alors également essayé de marquer magnétiquement les globules rouges (que l'on voit, eux, circuler). Malheureusement, il n'est pas possible de marquer ces cellules à plus de 0.4 ± 0.2 pg de fer/ erythrocytes. A cette concentration là, la force magnétique est trop faible pour contrer le flux sanguin *in vivo*, qui transporte les globules rouges à une vitesse moyenne de 0.4 mm/s (Seylaz et al., 1999).

4.2 Guider magnétiquement des vecteurs de médicaments

Étant donné les problèmes rencontrés lors des essais de magnétoguidage de cellules marquées, nous nous sommes orientés vers un guidage magnétique, non pas de cellules, mais de vecteurs de médicaments³⁶ : des magnétoliposomes fluorescents furtifs³⁷.

Les magnétoliposomes utilisés sont des liposomes de 200 nm de diamètre, composés d'une bicouche lipidique recouverte de PEG (polyéthylène-glycol), dans lesquels ont été encapsulées des nanoparticules magnétiques (Figure 40).

³⁶ Collaboration avec le laboratoire de pharmacie Galénique, faculté de pharmacie de Chatenay-Malabry, UMR CNRS 8612 et avec le LI2C, UMR CNRS 7612

³⁷ Le terme furtif est un qualificatif employé pour des vecteurs de médicaments capables de circuler relativement longtemps dans la circulation sanguine sans être éliminé par le système réticulo-endothélial (par les macrophages par exemple)

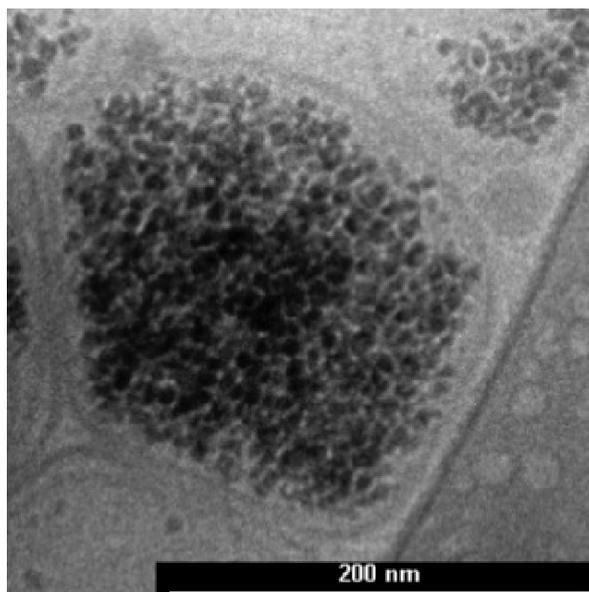


Figure 40.

Photos de microscopie électronique à transmission de magnétoliposomes. Une centaine de particules magnétiques sont encapsulées dans la plupart des liposomes (Martina et al., 2005).

Dans des travaux récents de notre groupe, ces magnétoliposomes se sont déjà révélés être de très bon agents de contraste pour l'IRM (Martina et al., 2005). De plus, la faisabilité du guidage magnétique a récemment été démontré sur des tumeurs sous-cutanées par un autre doctorant du groupe (Fortin et al., 2005). La furtivité de ces magnétoliposomes, ainsi que leur charge magnétique importante (fraction volumique $\Phi=1$ à 4 % soit entre 120 et 500 particules par liposomes), nous a également permis de stopper magnétiquement ces objets nanométriques sur la paroi des vaisseaux intracérébraux. Ces résultats font l'objet d'un article présenté dans le paragraphe suivant. Une version plus courte sera soumise pour publication au journal Nanoletters

4.3 Systemic targeting of brain by magnetic driving of nano-hybrid carriers

Article à soumettre pour publication dans une version plus courte à Nanoletters

C. Rivière^{1,4*}, M.-S. Martina², Y. Tomita³, C. Wilhelm¹, A. Tran Dinh³, C. Ménager⁴, E. Pinard³, S. Lesieur², F. Gazeau¹, J. Seylaz³.

¹Pôle Matière et Systèmes Complexes, CNRS UMR 7057, Université Paris 7 –Denis Diderot, 140, rue de Lourmel, 75015 Paris, France

²Equipe Physico-Chimie des Systèmes Polyphases, CNRS UMR 8612, F-92296 Chatenay-Malabry Cedex, France.

³Centre de recherche cardiovasculaire, INSERM U 689, Université Paris 7, UFR Lariboisière-St Louis, 10 Avenue de Verdun, 75010 Paris Hôpital Lariboisière, Paris, France

⁴Laboratoire des Liquides Ioniques et Interfaces Chargées, CNRS UMR 7612, Université Paris 6 -Pierre et Marie Curie, Bat F, 4 place Jussieu, 75005 Paris, France

*corresponding author : Charlotte Rivière, criviere@ccr.jussieu.fr

Abstract

The development of easy and effective strategies for local delivery after non-invasive injections of therapeutic agents is still a challenging issue. Biophysical targeting, using a magnetic force as the driving force to carry drugs or genes to a given location, has been proven to be a promising non-invasive guidance strategy for tumor treatment. In spite of the crying need for novel brain therapy, accessing brain tissues remains difficult thus preventing the delivery of therapeutic agents after intravenous injection. In recent years, a real effort has been undertaken to create both biocompatible and non-invasive nano-scaled systems capable of brain targeting after systemic administration. Due to their lipophilic properties and peculiar affinity for the blood brain barrier, liposomes have been developed both as drug and/or gene carriers for delivery to the central nervous system. Recently, we validated stealth[®] magnetic-fluid loaded liposomes for magnetic resonance imaging and magnetic targeting of solid tumors. Here, we show for the first time that, thanks to a magnetic force, superparamagnetic liposomes can be conveyed to selected cerebral areas. These nano-hybrid carriers combine biological availability of liposomes and physical properties of encapsulated magnetic nanoparticles. Through time-resolved visualization of the liposomes *in vivo* in brain microcirculation, we demonstrate that those nano-hybrid carriers can be used as specific drug delivery system to selected areas

Introduction

Over the past few years, systemic drug delivery is slowly replaced by local drug delivery. By using various physico-chemical tricks to lower overall dosage of drugs while still achieving an efficient concentration, local drug delivery helps reducing toxicity and delivering drugs to pathologic sites. In case of cancer treatment by systemic administration, since a high level of toxicity is needed to kill cancer cells, healthy cells are also destroyed as the drugs travel through the body. This issue becomes of major interest when dealing with brain treatment. Indeed, except in local delivery, which require a neurosurgical approach, its low accessibility, together with the blood-brain barrier (BBB) rise up difficulties for any curative treatment to reach its target in therapeutic concentrations. Present treatment of brain cancer usually implies a combination of surgery, radiation and chemotherapy. However, that kind of strategy only yields to relatively modest increase in survival time for malignant tumor (Davis et al., 1998; Jeremic et al., 2004; Meier et al., 2004). Research now focuses on promising new treatment for brain therapy using new generation of drugs to cell (Kulbatski et al., 2005; Safford and Rice, 2005) and gene therapy (Saitoh et al., 2003; Schlachetzki et al., 2004; Teresa Girao da Cruz et al., 2005).

In parallel to the development of these new therapies, pathological brain area accessibility limitations have led to the development of different strategies for targeting diseased area of the brain. These new strategies could limit side effects due to non specific systemic exposure, by both reducing the total amount of drug administered and limiting circulation of the drug throughout the body. By sequestering the drug at the desired site, the local concentration remains high while circulating levels are minimal in the body. Approaches to enhance drug delivery to the central nervous system include direct increase in permeability of the BBB to facilitate drug penetration into the brain parenchyma (Rapoport, 2000) or infusion of a drug via a catheter directly to the targeted tumor (Riva et al., 1995). Even if image-guided delivery has been remarkably improved over the past few years (Broaddus et al., 2001; Storm et al., 2003), a major drawback with the latter approach, is that such solid implant could damage brain tissue both around the implant and along the track of the catheter. It will also always be limited by the potential risk of infection. In a similar way, even if the increase in BBB permeability leads to a 10- to 100- fold increase in the drug delivery, one should also admit several undesirable side effects due to plasma solutes.

Complementary strategies include the use of implantable polymeric microspheres or microchips to directly deliver medical therapy (Wang et al., 2002a). Stereotactic

implantations of biodegradable microspheres for examples have led to double patient survival time (Benoit et al., 2000a; Menei et al., 2004). However, in that latter case, the diffusion distances from microspheres are reduced to an accessible volume smaller than 1 mm³ per implant. In the same manner, even if very promising for multiple agent delivery (Santini et al., 2000), the use of newly developed microchip biotechnology will stay limited by diffusion.

An alternative potentially powerful strategy of local drug delivery to the brain, especially in areas where surgery cannot be performed is convection enhanced-delivery. Convection enhanced delivery principle is based on a simple pressure gradient. This pressure gradient can be used to deliver high drugs concentrations to large cerebral regions without inducing functional or structural damage (Lidar et al., 2004; Mardor et al., 2001).

Another interesting strategy is to increase drug delivery within the brain by encapsulating the drug in a particulate carrier. Relatively large amounts of therapeutic agent can be incorporated into that kind of structures, providing the possibility for significant delivery to the central nervous system. Moreover, poor solubility of drugs often requires either modification of their physico-chemical properties themselves or their encapsulation in a particulate carrier. Incorporation of the drug into a particulate carrier, while making possible the controlled release and targeting of the drugs, has the advantage to avoid any degradation process and pharmacological modification of drug properties. Moreover, by increasing the plasmatic half-life, this type of approach also induces passive targeting into tumors, where BBB permeability is increased (Papahadjopoulos et al., 1991).

Many materials are under investigation for their use as drug carriers, the most intensively investigated for brain drug delivery being liposomes (sphere formed by a double layer of lipids) and nanospheres (polymeric nanoparticles). The use of biodegradable nanoparticles polymers for drugs or other therapeutic molecules encapsulation has been assessed for delivery into the brain in both *in vitro* (Vinogradov et al., 2002) and *in vivo* models (Vinogradov et al., 2004). Polymeric micelles formed by amphiphilic diblock copolymers such as polaxomer micelles (Pluronic™) have also been shown to provide an effective transport of solubilized neuroleptic agents across the BBB (Kabanov and Batrakova, 2004; Kabanov et al., 2002).

Liposomes present the advantage of being composed, as cell membranes, of phospholipids, making the carrier highly biocompatible. Size distribution can be easily modulated and controlled, and liposomes can be used for coencapsulation of both hydrophobic (within the bi-phospholipid layer) and hydrophilic molecules (inside the liposome). The demonstrated furtivity of those liposomes, especially when coated with polyethylene glycol, makes them ideal carrier for passive drug delivery. Liposomes have also the advantage to be less immunogenic than

other ligand functionalized carriers. Production of that kind of carriers can be made at a relatively low cost and in large scale.

To improve targeting efficiency, carriers surfaces can then be engineered and functionalized. Liposomes functionalization includes combination with various other materials such as antibodies for specific recognition, drugs or genes incorporation for therapeutic treatment, as well as imaging contrast agent grafted or encapsulated. Fully developed “platform” can also include attachment of functionalized groups at the liposome surface, so that it can be targeted to the central nervous system. Such nano-hybrid vectors appear thus as versatile tools for both imaging and therapeutic purpose.

Recent work used liposomes for the delivery of doxorubicin, a classical tumor treatment, to the brain. Liposomal doxorubicin encapsulation is presently on a phase II clinical trial and has been found to contribute to prolonged survival of patients with malignant glioma (Fabel et al., 2001; Hau et al., 2004). Pegylated immunoliposomes, using a targeting ligand such as a monoclonal antibodies (mAb), have also been successfully used to target and transfect β -galactosidase and luciferase into the brain (Pardridge, 2002; Shi et al., 2001; Zhang et al., 2003a; Zhang et al., 2003b), and opens up new therapeutic applications for such carriers in gene delivery. Acting as a Trojan horse, the mAb binds to receptors expressed on the blood-brain barrier, triggering receptor-mediated transcytosis across the BBB (Zhang et al., 2004). Instead of active targeting via biochemical principle (specific ligand recognition), active targeting can also be assessed using a physical principle based on magnetic force (Hafeli, 2004; Lubbe et al., 2001). Pre-clinical and clinical trials have used this strategy in patients with advanced cancers or sarcoma (Alexiou et al., 2000; Alexiou et al., 2003; Lubbe et al., 1996a; Lubbe et al., 1996b), demonstrating that such magnetic drug targeting was well tolerated. However, such strategy has never been proven to be possible for brain targeting. For a cerebral approach, it is thus necessary to come back to small animal model to validate brain magnetic targeting concept before any clinical trial for this peculiar organ. Moreover, most magnetic targeting studies used micromagnetic particles in aqueous suspensions as drug carriers. However, the plasmatic half-life of such particles is relatively short and restrained their use. To increase the furtivity of such carriers, a new generation of magnetoliposomes has been developed (Martina et al., 2005). These liposomes exhibit the essential prerequisite for organ targeting via a systemic route, i.e., high physical and biological stability, no cell toxicity, stealthiness and mobility under magnetic field gradient. After magnetic nanoparticles encapsulation inside liposomes, it is possible to magnetically guide those magnetoliposomes towards a selected location. The feasibility of such efficient and relatively easy drug targeting has been

demonstrated recently for superficial tumor (Fortin et al., 2005), but never, to our knowledge, for brain.

As drug delivery to the brain is a key challenge in present drug development, we took advantage here of different original technologies, involving neuro-imaging, chemical synthesis and physics, to show the feasibility of drug carriers magnetic targeting to the brain. By means of an external magnet, we succeeded in stopping magnetoliposomes in brain vessels of selected area. The fate of magnetoliposomes was monitored by combining an original intravital microscopy technique and newly engineered fluorescently labeled magnetoliposomes. As a first step towards effective magnetically driven brain drug targeting, the aim was, using those original techniques, to visualize circulating magnetoliposomes accumulation in the living mouse brain and to determine whether it was possible to stop them into the brain vasculature.

Materials and Methods

Synthesis of Magnetic nanoparticles

According to a procedure already described, superparamagnetic Fe_3O_4 (magnetite) nanocrystals were prepared by alkaline coprecipitation of FeCl_2 and FeCl_3 salts (Lesieur et al., 2003; Massart, 1981). Monodisperse γ - Fe_2O_3 (maghemite) nanocrystals were synthesized by oxidizing magnetite (1.3 mol) into 1 L of nitric acid 2 N containing 1.3 mol of iron nitrate under boiling. After being decantation-sieved, the maghemite particles were heated at 80 °C for 30 min in water supplemented with 70 g of sodium citrate before being precipitated in acetone at 25 °C, filtered and suspended in 23 mM aqueous sodium citrate by conductivity-controlled dialysis. Final adjustment of both aqueous medium (108 mM NaCl, 20 mM sodium citrate, 10 mM HEPES, pH 7.4 buffer) and maghemite concentration was performed by ultrafiltration. A 12-mL aliquot of the colloidal particle suspension was centrifuged in a MACROSEP filter, cutoff 50 kD (Fisher Scientific Labosi, France) at 12 000g for 30 min. Next, 10 mL buffer was added into the filter before a second similar centrifugation. Twice-centrifuged particles were diluted again with buffer to obtain the desired Fe(III) concentration in the 0.7-5.4 M range. Final iron contents were checked by flame spectrometry. The recovered magnetic fluid was ready to use and stable at room temperature for at least 1 year.

Magnetoliposomes preparation

Magnetic-fluid loaded liposomes (MFL) were prepared according to the methodology developed by (Lesieur et al., 2003; Martina et al., 2005), corresponding to the thin film hydration method coupled with sequential extrusion

under nitrogen pressure at 25°C through polycarbonate filters with decreasing pore diameter of 0.8 / 0.4 / 0.2 µm (PORETICS, Osmotics, Livermore, USA). Lipid contents of EPC: DSPE-PEG2000: Rho-PE (94:5:1 mol %) films were determined by weight.

Non-entrapped maghemite particles were removed by gel exclusion chromatography performed with a 0.4 X 5.8 cm Sephacryl S1000 superfine (Pharmacia) column (TERUMO 1 mL-syringe) saturated with lipids before sample elution. The eluent was the buffer used for the liposome preparation.

Magnetic separation

To select only magnetoliposomes that contain the highest number of encapsulated magnetic nanoparticles, a magnetic separation was performed. Magnetoliposomes were submitted to a 0.1T magnet for 4h. During this time, highly iron loaded magnetoliposomes were attracted towards the permanent magnet, whereas low iron loaded magnetoliposomes did not have time to move towards the magnet. This “non-magnetic” fraction was then eluted and the remaining magnetic fraction was diluted in half the initial volume.

Magnetic separations led to a concentrated solution of highly iron-loaded magnetoliposomes (volume fraction Φ between 1 to 4%).

Magnetic force calibration

A cylindrical 3 mm diameter neodymium magnet (Calamit, Paris, France) was used for magnetic targeting.

Magnetic field created by the magnet was fully characterized thanks to a Hall probe mounted in the sample holder of the microscope. A maximum magnetic field of 0.25T was measured at the surface of the magnet and of 0.1T at a distance of 100 µm from the surface. 100 µm is the estimated working distance between the magnet and the upper part of the mouse brain (separated by a cranial window as described below).

To calibrate the force experienced by the magnetoliposomes when submitted to this magnet within the cranial window, we need to calibrate the magnetic field gradient it created. Indeed, the magnetic force experienced by the magnetoliposomes is defined as:

$$\vec{F}_{magnetoliposomes} = (\vec{M} \cdot \vec{\nabla}) B \quad (1)$$

where \vec{M} is the magnetic moment of the magnetoliposomes and $\vec{\nabla} B$ is the magnetic field gradient.

In our set-up, the magnetic force is mainly created by the vertical magnetic gradient acting on the magnetoliposomes and the magnetic force is mainly vertical (z-direction):

$$\vec{F}_{magnetoliposomes} = m(\text{grad}B)_z \vec{e}_z = m \frac{dB}{dz} \vec{e}_z \quad (2)$$

Magnetic gradient along the z-direction direction was calibrated thanks to commercial micrometric magnetic bead of known diameter and magnetic properties (Dynabeads® M-280 Tosylactivated, Dymal). Those beads of 2.8 µm in diameter contained a 3.1% volume fraction of dispersed particles of maghemite, with a saturation magnetization of the order of 8.7x10³A/m.

They were dispersed in 60% glycerol/40%water (viscosity $\eta=0.0137$ Poiseuille) in an Hellma chamber and submitted to the same magnet used for *in vivo* experiments. Their velocity (V_z) was measured as they moved towards the magnet. To mimic *in vivo* configuration, the distance between the helma chamber and the magnet was set to 100 µm and only beads in an observation window of 100 µm square were taken into account (*in vivo* observation are made up to a depth of 100 µm maximum). Within this field of view, the beads moved with constant velocity and in a direction parallel to the z axis. The magnetic force F_m was thus precisely counterbalanced by the viscous one: $F_D = 3\pi\eta DV_z = F_m(\text{beads})$, showing that the magnetic force experienced by each bead was 4 pN. This magnetic force is created by the magnetic gradient acting on the superparamagnetic beads: $F_m(\text{bead}) = m(\text{grad}B)_z$, where m is the magnetic moment of the beads (8.3x10⁻¹⁴ Am² at 0.1T). We could thus directly derive the magnetic field gradient along the z axis in the observation window, as follows: $(\text{grad}B)_z = 42\text{T/m}$.

Animal preparation

Male C57BL/6 mice (22-25g) from the “Centre d’Elevage et de Reproduction Janvier” (CERJ, l’Arbresle, France) were studied according to the National Institute of Health guide for the care and use of laboratory animals. Experiments were performed under Permit Number 02934 from the French ministry of Agriculture.

Anesthesia

In all surgical and experimental approaches, anesthesia was induced by 1.8% to 2% isoflurane and maintained with 1.4% to 1.6% isoflurane in a mixture of O₂ (20%) and N₂O (80%). A custom-built system was used to secure the mouse head and stabilize the ensemble under a confocal microscope. It was equipped for delivering anesthetic gas.

Chronic cranial window implantation

All surgery was performed under an operating microscope (S21; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). The protocol was the same as already reported (Tomita et al., 2005). Briefly, one week before the experiment, a 3-mm hole

was drilled in the bone above the left parieto-occipital cortex. The center was at 2.5 mm posterior to bregma and at 2.5mm lateral to the midline (Atlas Paxinos). The dura was left intact. A circular 140- μm thick quartz coverslip was sealed to the bone with dental cement (Ionosit, DMG, Hamburg, Germany), making the preparation waterproof. Neither bleeding nor inflammatory process was objectivated. The vascular network under the window was digitally photographed via the surgical microscope before and after the experiment.

In vivo experimental procedures

Seven mice were studied and randomly separated in two groups: one with an external magnet placed in contact with the window (n=4, MAGNET), the other without any magnet (n=3, CONTROL).

Dynamic confocal fluorescence microscopy

For both groups, fluorescent tracers were injected via the left tail vein. A tracer dose (50 μL) of Fluorescent isothicyanate FITC-dextran (Mw=71,200 Da; 20mg/mL, Sigma, France) was first injected and used to visualize the microvascular network. Rhodamine labeled magnetoliposomes were then injected (100 μL) and tracked within the focused microvessels for 2 minutes every 15 minutes up to 1 hour.

The fate of magnetoliposomes within brain local microcirculation of each mouse was video-monitored through the closed cranial window using a Viewscan DVC-250 confocal laser-scanning unit (BIorad, UK) attached to an Optiphot-2fluorescence microscope (Nikon, Japan), as described by (Seylaz et al., 1999) for fluorescent red blood cells. The light source was an argon/krypton laser whose wavelengths were 488, 568 and 647 nm. The objectives used were Nikon dry lens (x10 and x4). The numerical apertures were 0.4 and 0.55, and the working distances were 1.8 and 2 mm, respectively. The particularity of this confocal microscope comes from its linear diaphragm, allowing rapid 2D image acquisition (50 frames/sec).

Appropriate filters for FITC or Rhodamine were used. Images from one single plane were visualized with an SIT camera (C-2400, Hamamatsu Photonics, Japan) and digitally videorecorded (DSR-25 DVCAM, Sony, Japan). Images were then stored on a PC using an 8-bit frame grabber card LG-3 (Scion Corp Inc., MA, USA).

For the MAGNET group, during the magnetoliposomes injection and for each subsequent 15 min period, the magnet was placed in direct contact with the closed cranial window (magnet-brain surface distance =100 μm). Due to space requirement during confocal microscopy sequences, the magnet was removed during each image acquisition.

Static confocal fluorescence microscopy

Before magnetoliposomes injection and after the 1-hour dynamic imaging period, the superficial vessels were also visualized with a higher definition using another laser-scanning confocal fluorescence microscope (MRC 600, Biorad, UK) whose characteristics are the same as those of the dynamic confocal microscope but with a pinhole. Conversely to Viewscan confocal microscope, several planes can be summed when using the MRC 600 confocal microscope. Images were obtained up to 200 μm beneath the brain surface. The quality of static images is higher than that of dynamic image because the speed of image sampling is much slower (0.5 frames/s instead of 50 frames/s). Typical images obtained with this confocal microscope for that study were acquired 3 times and then summed.

Image analysis

The quantification of magnetoliposomes accumulation on video-images was made as follows.

(1) Images obtained with the x4 objective lens were used to provide an overview of the cranial window and analyze major magnetoliposomes accumulation. An intensity threshold (typically in the order 150-254 in a 256 grey scale image) was adjusted in order to analyze liposomes accumulation in terms of total area covered by the liposomes. Area was then normalized by the microscope field of view and expressed as follow :

$$\text{Normalized Area (\%)} = \frac{100 \times \text{Total area above intensity threshold}}{\text{Total field of view}}$$

Only regions where intensity threshold area was larger than 100 pixel² (0.15 mm²) were taken into account.

(2) Images obtained with the x10 objective lens were used to provide a global view at higher magnification of magnetoliposomes in the whole brain area covered by the cranial window and to analyze accumulation of individual or small spots of liposomes within intracerebral microvessels. Small fluorescent “spots” present within intracerebral vessels in the reconstituted windows were counted and then normalized by the field of view. Number of spots is expressed in number/0.025 mm²).

Blood flow measurements

Cerebral blood-flow was analyzed before and after each liposome experiment using Laser-Doppler flowmetry (Laser-Doppler Flowmeter, MBF 3D, Moor Instruments, Axminster, UK).

Histology

At the end of the experiment, each mouse was sacrificed with an overdose of anesthetic. The brain was carefully removed, immersed for 4 days in 4% paraformaldehyde in

0.1M Phosphate buffer at 4°C, pH 7.4 and for 2 days in 20% sucrose in phosphate buffer for cryoprotection. Coronal sections (45µm) were cut in a cryostat (CM3050S, Leica, Germany).

Every 10th section was used for fluorescence analysis using the static confocal microscope (MRC600).

Statistical analysis

Data are expressed as mean ± standard deviation. Repeated measures ANOVA was used to compare blood flow values before and after liposomes experiments. A value of p<0.05 was considered significant.

Results

Dynamic confocal fluorescence microscopy

Magnetoliposomes fate has been analyzed in kinetic terms using the images obtained with the dynamic confocal microscope. A schematic representation of experimental procedure can be found in (Figure 1).

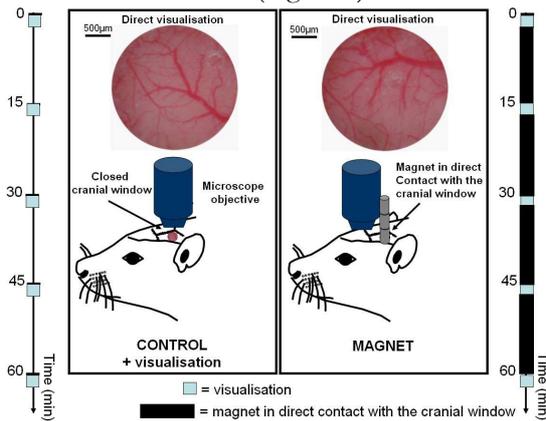


Figure 1. Schematisation of the experimental procedure. Two groups of animal were made : one bearing a closed cranial window and an other bearing the same cranial window, and submitted to a magnetic field gradient of an external magnet. Time scheduled of both groups is shown on the left (control group) and right (magnet group) side of the figure. Due to space requirement, magnet was withdrawn during visualization.

CONTROL group

Blood-flow driven liposomes were seen just after their injection. From 15 to 60 minutes after injection, circulating liposomes were visible in all vessels. Their velocity was so high that only the slowest one could be measured at 50 frames/s. We can nevertheless state that the velocity of magnetoliposomes was at least 1 order of magnitude faster than the velocity of erythrocytes (0.4mm/s (Seylaz et al., 1999)), as the lowest magnetoliposomes were circulating at a speed of 4 mm/s. Negligible liposomes accumulation was detected under

the imaged cranial window (0.3 ±0.1% of the area under the cranial window after 60 minutes, figure 2. A and B) and only few liposomes spots could be counted (from 0.1 ± 0.1 to 0.2 ± 0.1 spots /0.025 mm² at 15 minutes and 60 minutes respectively, Figure 2. A).

MAGNET group

After placing the magnet, accumulation of liposomes occurred progressively and increased with time, following a 2-step kinetic. During the first 15 minutes after injection, the number of magnetically driven magnetoliposomes increased drastically before reaching a plateau 30 minutes after injection, and stabilized from 30 to 60 minutes, forming large aggregate structures in dural vascular network, i.e, at the meninge level (3.6 ±0.6% of the area under the cranial window, figure 2.A and C). After the formation of large aggregates (15 to 30 minutes after magnetoliposomes injection, depending on mouse), small spots of individual magnetoliposomes were seen within deeper veins (Figure 3.B). Only a limited number of small spots of liposomes were detected 15 minutes after the injection (0.6 ± 0.4 spots /0.025 mm²), whereas a large number of small spots were present on the venule walls at 60 minutes after injection (1.7 ± 1.0 spots /0.025 mm²).

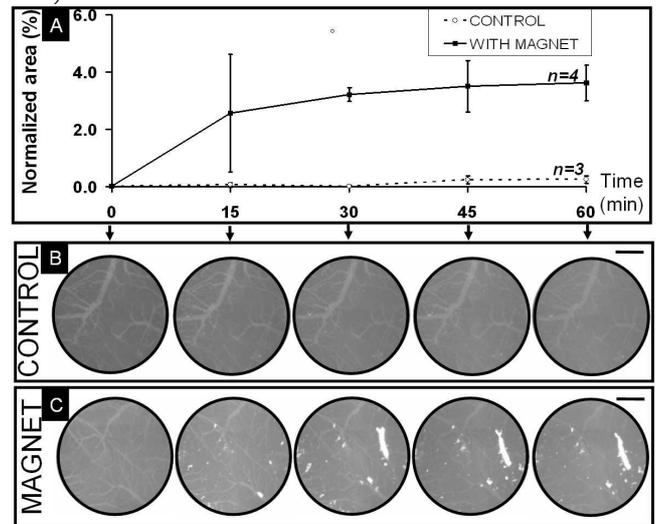


Figure 2. Analysis of overall magnetoliposomes accumulation within the field of view. (A) Total area analysis of magnetoliposomes accumulation (control n=3 and with magnet n=4). Area, expressed in %, was normalized by the total observed area. (B-C) Confocal microscopy images of fluorescent magnetoliposomes in the brain of live mice, through a close cranial window. Magnetoliposomes were intravenously injected at t₀ in both mice. A magnet was applied on the cranial window only in row (C). Note magnetoliposomes accumulation when the magnet was applied.

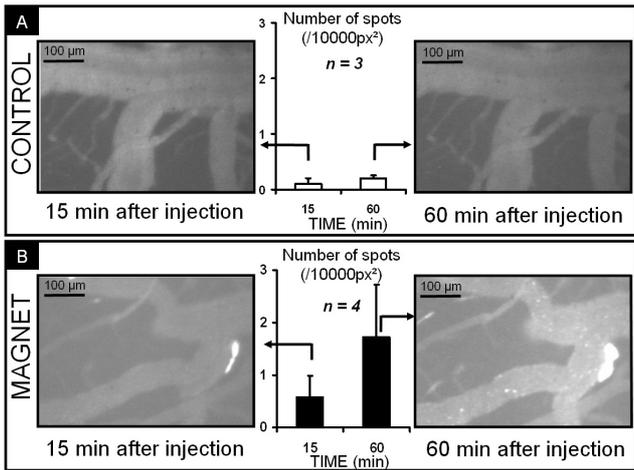


Figure 3. Accumulation of small clusters of magnetoliposomes in the intracerebral vessels of live mice. Examples of x10 magnification observation of fluorescent magnetoliposomes for control (A) and for the mice submitted to the magnetic field (B). Circulating liposomes can not be seen in those images (too small) so that fluorescent spots correspond to stopped magnetoliposomes. Mean number of small fluorescent spots counted within intracerebral vessels in every reconstituted windows and normalized by the field of view are shown for both groups (control n=3 and with magnet n=4). Number of spots is expressed in number/10000 px² (0.025 mm²).

The large aggregates of accumulating liposomes in dural network were transient since dissociation of those aggregates by the blood-flow was observed upon magnet removal. Moreover, those aggregates could also be manipulated and dissociated *in vivo*, thanks to a simple permanent magnet, as illustrated in the images sequence of figure 4.

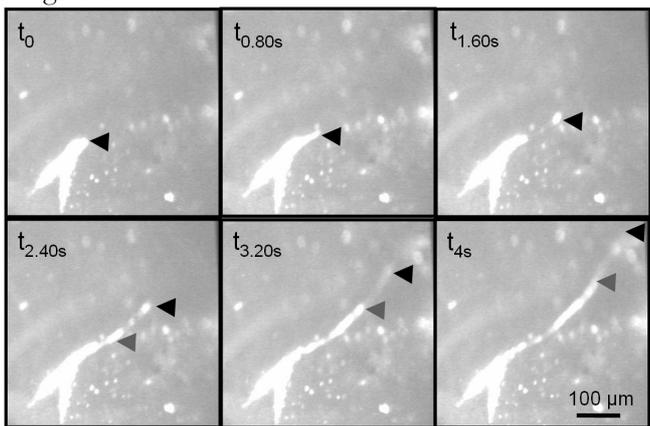


Figure 4. Aggregate manipulation with an external magnet.

Magnetic dissociation of magnetoliposomes aggregate following magnet motion displacement. Sequence of images over 4 second captured with the dynamic confocal microscope and videorecorded.

Static confocal fluorescence microscopy

CONTROL group

Figure 5.A₁ shows the microvascular network labeled with FITC-dextran analyzed with the static confocal microscopy just before magnetoliposomes injection in the control group. In this group, sixty minutes after injection, magnetoliposomes were still present within the intracerebral microvasculature. No accumulation was observed in any places and images acquired with the static confocal microscope only show the microvascular network labeled with the FITC-tracer (Figure 5.A₂).

MAGNET group

Figure 5.B₁ shows the microvascular network labeled with FITC-dextran analyzed with the static confocal microscopy just before magnetoliposomes injection in a mouse with a magnet. By contrast, sixty minutes after injection, the accumulation of magnetoliposomes within the intracerebral venous system was clearly visible in all mice, which were bearing a magnet (Figure 5.B₂). Intense rhodamine-labeled spots appeared in the FITC-labeled microvessels. Magnetoliposomes not only accumulated as large areas in vessels, but also as small aggregates of few individual magnetoliposomes within pial mater and upper cortical vessels, as illustrated in the inset of figure 6.B₂.

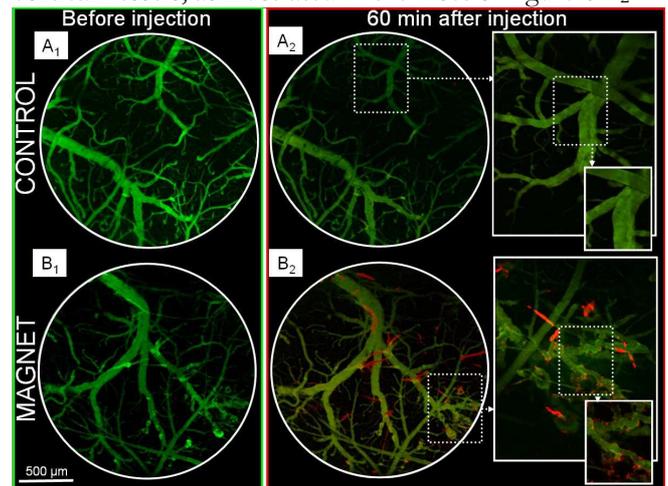


Figure 5. Confocal analysis of Magnetoliposomes accumulation into the intracerebral brain vessels. Just before magnetoliposomes injection, the microvascular network labeled green-fluorescent tracer was analyzed with the static confocal microscopy (CONTROL - A₁- versus MAGNET-B₁-). Sixty minutes after injection, no accumulation was observed in any places and images acquired with the static confocal microscope only show the microvascular network labeled with the FITC-tracer (A₂). For the magnet group, accumulation of red-fluorescent magnetoliposomes within intracerebral venous system was clearly visible (B₂). Intense red-fluorescent region appeared in the green-fluorescent microvessels. Magnetoliposomes not only accumulated as large areas in vessels, but also as small clusters of few individual magnetoliposomes within pial mater and upper cortical vessels (B₂, inset).

Blood flow measurements

No significant difference in laser Doppler flowmetry values was found for both group ($p > 0.05$), indicating that the injection of magnetoliposomes did not disturb the basal blood flow.

Histology

CONTROL group

Fluorescent liposomes were present in every histological slices and were mainly localized inside the microvascular network (data not shown).

MAGNET group

The contralateral hemisphere served as control since it was outside the magnetic zone. In this area, the microvascular network was labelled by rhodamine-liposomes, but no accumulation of liposomes was evidenced (Figure 6.A, left part). Few liposomes could be observed within the tissue at high magnification (x63, figure 6, B).

By contrast, in the hemisphere equipped with the cranial window, and submitted to the magnetic field gradient, venules were observed in the cortical network, confirming the presence of the magnetically driven liposomes within intracerebral venules. Besides those transient accumulations within venules, some capillaries are well-defined by rhodamine-labeling, whereas many scattered spots within cortex tissue could be evidenced at higher magnification (x 63) (Figure 6.B)

Discussion

The aim of this study was to trap magnetoliposomes inside brain microvascular network using an external magnet placed in direct contact with a cranial window over the parieto-occipital-cortex. Cranial window allows direct visualization of microvascular network and dynamic image analysis. The present study shows that when the magnet were applied, stealth liposomes were effectively stopped within brain vessels under the cranial windows, leading at 60 minutes after their injection to a 15-fold increase in the normalized area of large aggregates, and a 10-fold increase of the number of small aggregates within pial and cortical vessels.

Using *in vivo* confocal microscopy analysis in mice, we demonstrate that optimised magnetoliposomes and magnetic force can lead to effective accumulations of those potential therapeutic carriers in brain microvascular network, with no modification of blood flow, as demonstrated by laser-doppler analysis.

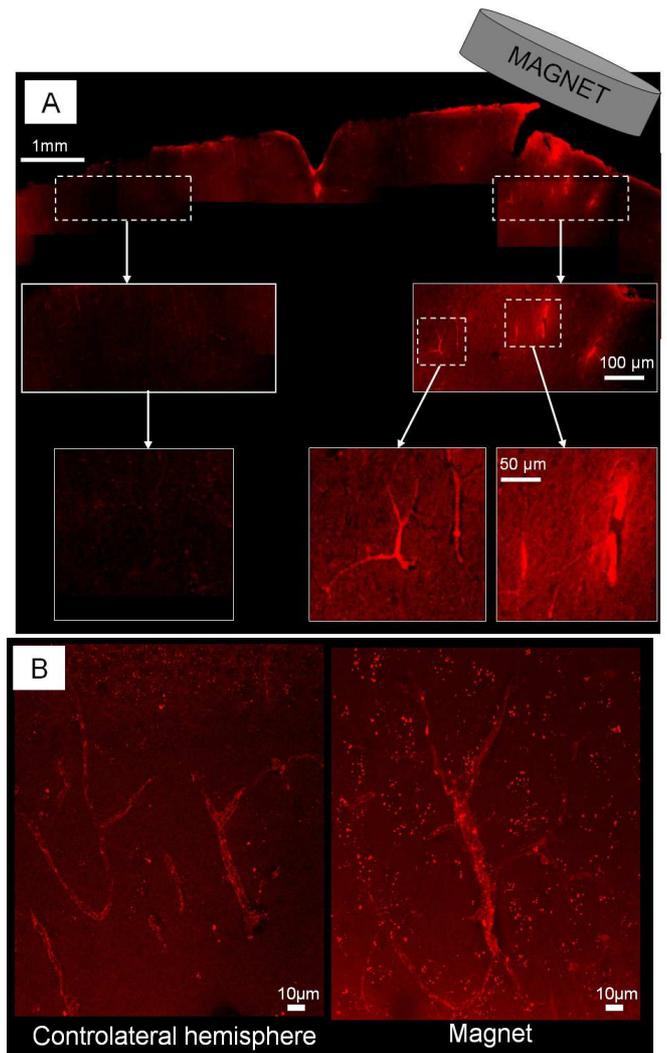


Figure 6. Typical example of histological analysis. (A) Reconstituted slice of the brain of one of the 4th mice submitted to the magnet (indicated on the figure) and analysed by fluorescent histology (x10). The controlateral hemisphere served as control. The presence of liposomes within veins of the cortex is clearly visible in the side submitted to the magnetic field gradient (right lateral part). (B) Higher magnification analysis for the same mouse (x63). The picture shown represents the sum of 40 images taken at different depth within the 45 μ m slice. Note the reconstituted rhodamine labelled capillaries, as well as the presence of scattered rhodamine spots within cortex tissue (the size of the spots corresponds to the size of individual magnetoliposomes).

Nano-hybrid carrier properties and magnetic targeting

Liposomes have the advantage to be non toxic, biodegradable and less immunogenic than other carriers. The presence of PEG at their surface improves their furtivity and increases their plasmatic half-life.

Superparamagnetic nanoparticles are encapsulated within liposomes in high concentration (volume fraction: $\Phi = 1$ to 4 %), leading to relatively high magnetic properties (Martina et al., 2005). The magnetic force acting on each

liposome, as described in the materials and methods section, is indeed directly proportional to the number of magnetic nanoparticles. In a similar manner, the magnetic interactions between a liposome and an aggregate of liposomes will be directly proportional to the number of magnetic liposomes inside the aggregate. In this way, the large aggregates, when submitted to the magnetic field gradient created by the permanent magnet, turned to also behave as small magnets and therefore to participate in any further magnetoliposomes accumulation, through dipolar interaction (dipolar force which decreases as $1/r^4$, with r , the distance between two liposomes). Once initiated, magnetic accumulation was thus amplified by the firstly stopped magnetoliposomes. Magnetic interactions between magnetoliposomes were thus responsible of a chain reaction phenomenon, leading to small liposomes spots accumulation within cortical vessels, as described in figure 3. Magnetoliposomes thus accumulate in a given region following a 2-step process. First, large aggregates occurred transiently in the superficial dural network, whereas in a second time small aggregates were formed more deeply, at pial and cortical levels.

It is also of importance to note that, as large aggregates could be externally manipulated (Figure 4), the large aggregates are not only useful for the accumulation of small aggregates deeper in the brain microvasculature but can also be used to modulate magnetoliposomes accumulation.

Brain magnetic targeting

The presence of magnetoliposomes was found mainly within intracerebral vessels, which naturally orient the use of such targeting techniques in vascular-mediated therapy. To broaden the scope of possible application, magnetoliposomes must be able to be transported across the blood-brain barrier. Indeed, the presence of a blood-brain barrier (BBB) is an important problem to overcome for final drug delivery to the central nervous system via systemic injection. In this study, high magnification histology provided some incomplete analysis on the possible transport of magnetoliposomes across the BBB. Indeed, Rhodamine labeling of some capillaries (where transport across the BBB occurs) suggests the presence of rhodamine-labeled magnetoliposomes. Together with the presence of scattered rhodamine spots (of size comparable with size of individual magnetoliposomes) within cortex tissue (Figure 6.B), it suggests that magnetoliposomes had been transported across the BBB. There is no sufficient experimental proof that magnetoliposomes are transported through the BBB, but strong optimistic hypothesis can be made on the basis of those observations. Moreover, their lipidic structure could be an advantage for transport across the BBB, as it is believed that lipophilic structure such as the

phospholipids shell of liposomes can be transported through the BBB by passive diffusion (Lesniak and Brem, 2004) and enhanced transport of liposome-encapsulated drugs has indeed been observed in many different studies (see (Garcia-Garcia et al., 2005) for a review). Moreover, transport across the BBB could be enhanced in case of the presence of a lesion, inflammation or ischemia. Hence, after active magnetic targeting, which allows the delivery of drug in high concentration, passive targeting through modification of BBB permeability could lead to efficient drug targeting to the desired site within the central nervous system. This passive diffusion could be emphasized by encapsulating a drug with high lipid solubility. Indeed, there is a clear relationship between the drug lipid solubility and its penetration into the central nervous system (Begley, 2004). Designing a drug with optimal lipid solubility for BBB penetration while still retaining a significant central pharmacological activity would be the desired solution. However, increasing lipid solubility would also involve a decrease in drugs bioavailability and solubility. Encapsulating that kind of ideal drug into a magnetoliposomes could then be an interesting solution for efficient brain therapy. The drug carriers would be first magnetically guided to the intracerebral vein network. Then, after destruction of this phospholipids shell by a proper technique, the drug could be transported through the BBB and thus be delivered locally in much higher concentration than the one obtained after systemic injection.

Drug magnetic targeting could lead in a way to a multiple “drug reservoir” from where the drug could diffuse towards their targeted site. In that sense, magnetoliposomes accumulation within brain vessels could be seen as a multiple drug microchip pattern. The marked difference is that those smart “implants” do not need any invasive surgical intervention to get to their site of action. Thus, even without the use of sophisticated functionalization, efficient active targeting of compounds encapsulated into magnetic liposomes should be achieved.

In combination with functionalized magnetoliposomes, this type of magnetic targeting should even be more effective (Kullberg et al., 2005). This would imply again a two-step process. After magnetic targeting, the intact magnetoliposomes are then transported across the BBB, using an endogenous transport mechanism such as the one used in immunoliposomes (Chekhonin et al., 2005; Pardridge, 2003; Schnyder and Huwyler, 2005; Shi and Pardridge, 2000; Shi et al., 2001).

Potential application in brain tumor therapy

The main application of such approaches is for brain tumor therapy: the narrow therapeutic index of most antitumor drugs makes local drug delivery the most urgent medical need. As meninges depth in humans is

smaller than a millimeter, by using high magnetic gradient, magnetic targeting could be possible in many brain regions, leading to non-invasive and effective drug targeting. To improve the magnetic force and the accuracy of the targeted area, one could also be helped by an additional craniotomy to put a magnetizable needle or wire closer to the lesion to treat (Iacob et al., 2004). One particularity of tumor tissues is their hypervascularization that supplies tumors with nutrients, promotes their growth and eventually metastasis. Embolization therapy has been recently used for intracranial meningioma to isolate tumors from the rest of the body and induced their necrosis by starvation (Bendszus et al., 2003; Bendszus et al., 2000; Bendszus et al., 2002; Engelhard, 2001). Magnetically driven magnetoliposomes could be used to induce such embolization in selected brain area. In addition, magnetoliposomes could also be loaded with anti-angiogenic factor to improve tumor starvation efficiency.

Taking advantage of magnetic properties

Targeting magnetically responsive materials into a desired site of the brain also enables new promising therapeutic strategies that directly exploit specific magnetic properties of this nano-hybrid vector.

Magnetic hyperthermia

First, magnetic liposomes can be used as heat mediators for cancer therapy. Superparamagnetic single-domain nanoparticles are actually known to generate hyperthermia by converting magnetic energy into heat when submitted to high frequency magnetic field. Such magnetically induced hyperthermia has been used for treatment of tumors (Ito et al., 2004; Ito et al., 2001), including clinical trials in Germany for brain tumors with local injection of magnetic fluid (magforce nanotechnologies, Jordan). In addition to heat-induced cell death, it was found in animal models that the hyperthermic treatment using magnetic cationic liposomes also induced an antitumor immunity (Suzuki et al., 2003). Magnetically induced hyperthermia has also been shown to activate tumor-necrosis factor- α gene therapy driven by the stress inducible promoter, *gad 153* (Ito et al., 2001). In addition, combining immunotherapy (such as the injection of Interleukines and granulocyte-macrophage colony stimulating factors) with hyperthermia had provided efficient tumor regression, potentially leading to vaccine-induced response (Ito et al., 2003). Since heat generation is proportional to the quantity of nanoparticles into the tumor, systemic injection limits the efficacy of such treatment, unless the magnetic materials may be concentrated into desired sites by targeting strategy. For this purpose, highly efficient encapsulation of magnetic nanoparticles into liposomes enables both enhancement

of the magnetic driving force for physical targeting and potentiating heat generation effect. This kind of multifunctional system (combination of magnetic targeting, hyperthermia and immunotherapy) should thus lead to real breakthrough in brain tumor treatment.

In addition, magnetic hyperthermia could also be used in combination with therapeutic embolization in order to (1) initiate a starvation process by embolization, and then (2) increase both cell death and immune response by magnetic hyperthermia. This strategy has already been successfully applied in liver tumors (Moroz et al., 2002b; Moroz et al., 2001) and renal tissue (Moroz et al., 2002a).

Magnetic control of drug release

The use of thermosensitive magnetoliposomes in combination with magnetic hyperthermia could also be of interest to control drug release over time, by using the provided heat generation to open pores in the lipid shell and release therapeutic agents. The feasibility of such approach for larger dextran-magnetite incorporated magnetoliposomes (1 μm) has been probed in mouse tumor model (Viroonchatapan et al., 1996).

MRI

In parallel to magnetic guidance, magnetoliposomes fate can be non-invasively assessed by Magnetic Resonance Imaging (MRI). MRI is indeed a powerful imaging technique particularly suited for high resolution brain mapping and allow non-invasive follow-up of brain therapy (Henson et al., 2005). The high contrast properties of magnetoliposomes have been recently demonstrated (Fortin et al., 2005; Martina et al., 2005). The possibility provided by such imaging could be thus of high interest for many long term therapeutic protocols, including magnetic hyperthermia (Pardoe et al., 2003).

Application in neurodegenerative disease

To widen the scope of therapeutic applications, apart for malignant gliomas or other brain tumor treatment, magnetic delivery could be of interest for the treatment of many other brain diseases and in particular for neurodegeneration.

Magnetic targeting could in that case be exploited in combination with stem cell therapy, a highly promising new treatment for such brain disease (Sonntag et al., 2005). But for effective cell therapy, and especially in case where relatively low amount of homing signals are produced by the damaged area, it would be of primary importance to facilitate stem cells homing towards the site of injury. Combining stem cell therapy to magnetically driven liposomes could provide such effective stem cells homing. Magnetically targeting of magnetoliposomes loaded with chemotaxis compounds could provide an effective strategy to help stem cells to reach targeted sites.

Magnetoliposomes could for example allow the delivery of growth factors which have potential of promoting the survival of key populations of cells lost in Alzheimer's or Parkinson's disease, such as glial-derived neurotrophic factor (GDNF). It could also again promote stem cell migration and differentiation or even increase brain neurogenesis in a particular brain area by delivering adequate compounds (Collombet et al., 2005; Kulbatski et al., 2005; Safford and Rice, 2005).

This type of biophysical targeting is far from specific to brain diseases but is gaining value in this organ, where access has proved particularly problematic. Even if many experimental optimizations are necessary before the development of a complete nanoplatform including multifunctional imaging and therapeutic agents, clever use of this carrier could help for the treatment of many diseases. Range of potential applications is widely open.

Application in gene therapy

Other highly promising therapy strategy where this kind of non-invasive magnetically-active targeting could find applications is gene delivery. Indeed, immunoliposomes-based gene therapy has already shown great potential for non-viral gene transfer technology in intracranial brain cancer (Zhang et al., 2004). Nevertheless, one strong barrier to effective gene therapy is low efficiency of gene transfer in targeted tissues (Gemeinhart et al., 2005; Luo and Saltzman, 2000; Shen et al., 2004). As demonstrated in both *in vitro* and *in vivo* models, by using magnetic drug targeting principle to gene vector, gene therapy can be magnetically enhanced (Scherer et al., 2002). Applying magnetic force to magnetoliposomes for gene specific spatial targeting could then in the meantime enhance cell transfection efficiency.

Limitation

This study presented here is only a “proof of principle”, but many other obstacles should be overcome before clinical efficient magnetic drug targeting to the brain. Indeed, if this magnetic targeting could be achieved with success in this small animal model, some scale factor must be taken into account to apply a sufficient magnetic force in larger animals and humans, where treated areas could be found deeper within the organism than in mouse.

This magnetic targeting could lead to significant clinical applications only if those magnetoliposomes are able to be transported through the BBB. There must be some deeper analysis of this part of the process to answer this key question.

Moreover, we did not investigate in this study whether accumulated liposomes on vessel walls induced any inflammation process or not. Such physiological parameter must be taken into account before any further investigation.

Conclusion

Magnetic force combined with magnetoliposomes appeared thus as a versatile tool that allow both spatial and temporal control of selected accumulation of potential drug carrier within cerebrovascular network.

4.4 Guidage magnétique cellulaire : perspectives

Au-delà des applications potentielles pour le ciblage de médicaments, le guidage magnétique des magnétoliposomes montre qu'il est possible, par l'intermédiaire d'aimants externes de géométrie optimisée, **d'appliquer une force magnétique suffisamment importante pour stopper au sein de la microcirculation, des objets magnétiques nanométriques, fortement chargées en particules magnétiques.**

En utilisant des gradients de champs magnétiques du même ordre de grandeur que ceux permettant le guidage de magnétoliposomes (42T/m), la force magnétique exercée sur une cellule marquée magnétiquement est supérieure puisqu'une masse de fer par cellule de 10 pg correspond à 6×10^6 particules internalisées. La force magnétique exercée sur chacun des objets magnétiques est directement proportionnelle au nombre de particules:

$$F_m = Nm_{eff} \frac{dB}{dz} \quad \text{Eq.4.1}$$

où N est le nombre de particules par objet et m_{eff} le moment magnétique effectif de chaque nanoparticule ($m_{eff} = 0.7M_s \frac{\pi}{6} d_{particule}^3 = 7.53 \times 10^{-20} A.m^2$ pour les particules de 8.7 nm utilisées

dans un champ magnétique de 0.1T) et $\frac{dB}{dz}$, le gradient de champ magnétique (0.42 T/m). Les

forces magnétiques exercées sur un macrophage (6×10^6 particules) sont donc de plusieurs ordres de grandeur supérieures aux forces magnétiques exercées sur un liposome (500 particules) :

$$\frac{F_m^{macrophage}}{F_m^{liposome}} = \frac{6 \times 10^6}{500} \approx 10^4 \quad \text{Eq.4.2}$$

Évaluons en parallèle, la force exercée par le flux F_f sur ces deux objets : en l'absence d'autres forces extérieures, cette force contrebalance en régime stationnaire la force visqueuse ($F_v = 6\pi\eta Rv$) et il est donc possible d'estimer la force exercée par le flux sanguin sur ces deux objets en comparant leur vitesse et leur rayon. Pour les macrophages, dont le diamètre est du même ordre de grandeur que celle des globules rouges (12 μm versus 7 μm), on peut estimer que la vitesse des globules rouges dans la microcirculation sanguine (0.4 mm/s) serait la limite supérieure pour les macrophages. La vitesse des liposomes *in vivo* est difficile à évaluer car leur petite taille leur confère une vitesse trop grande pour être mesurée avec précision à 50 images/s. Nous avons seulement pu estimer la vitesse des liposomes les plus lents (4 mm/s). Il y a donc *in vivo* au moins

un facteur 1/10 sur les vitesses contre un facteur 60 sur les tailles (12/0.2 μm), donnant au final un rapport entre la force exercée par le flux sur les macrophages et les liposomes :

$$\frac{F_f^{macrophage}}{F_f^{liposome}} = \frac{6\pi\eta R_{macrophage} v_{macrophage}}{6\pi\eta R_{liposome} v_{liposome}} = \frac{60}{1} \frac{1}{10} = 6 \quad \text{Eq.4.3}$$

Même si à priori les liposomes que l'on arrive à stopper ne sont pas des liposomes mais des petits agrégats de liposomes (avec donc une force magnétique supérieure), si l'on compare les deux

rapports $\frac{F_m^{macrophage}}{F_m^{liposome}}$ et $\frac{F_f^{macrophage}}{F_f^{liposome}}$, la force magnétique exercée sur un macrophage devrait être

également en mesure de contrer la force exercée par le flux sanguin.

Nous n'avons pourtant jamais réussi jusqu'à présent à guider ou tout au moins stopper magnétiquement des cellules marquées magnétiquement au sein de l'organisme. Même si, dans le modèle présenté au paragraphe 4.1, le problème ne semblait par être la force magnétique³⁸, il ne faut pas oublier non plus que contrairement aux magnétoliposomes, les **cellules ne sont pas des objets passifs mais peuvent répondre de façon active à de nombreux signaux externes, en générant elle-même des forces pour se déformer, migrer ou adhérer**. Cela est d'autant plus vrai *in vivo*, puisqu'au sein de l'organisme, la cellule est continuellement soumise à de nombreux stimuli qu'elle doit intégrer pour adapter sa réponse en conséquence.

De façon à mieux comprendre comment réagit la cellule lorsqu'elle est soumise à une force magnétique et comment on peut la guider magnétiquement de façon efficace, nous avons donc développé en parallèle un test *in vitro* de migration cellulaire. Les résultats de ce test sont présentés dans le chapitre suivant.

³⁸ les cellules ne circulaient pas à des distances suffisamment proches pour que l'aimant puisse avoir un quelconque effet.

Chapitre 5 :

Exploration du mouvement cellulaire

in vitro

| | | |
|-------|--|-----|
| 5.1 | LA MIGRATION CELLULAIRE..... | 142 |
| 5.1.1 | <i>Le cycle de la migration</i> | 143 |
| 5.1.2 | <i>Importance de la polarisation</i> | 144 |
| 5.1.3 | <i>Les protrusions membranaires</i> | 145 |
| 5.1.4 | <i>Le gel d'actine intracellulaire : un partenaire clé pour le mouvement</i> | 146 |
| 5.1.5 | <i>Les forces mécaniques générées par la cellule</i> | 148 |
| 5.1.6 | <i>La cellule comme capteur</i> | 153 |
| 5.2 | LA MIGRATION DIRIGEE | 154 |
| 5.2.1 | <i>Rôle des signaux chimiques : chimiotaxie</i> | 155 |
| 5.2.2 | <i>Rôle des interactions mécaniques : mécanotaxie</i> | 156 |
| 5.3 | MISE EN EVIDENCE EXPERIMENTALE D'UN MECANISME DE MECANOTRANSDUCTION EN REPONSE A UNE FORCE MAGNETIQUE LOCALE | 160 |
| 5.4 | À L'ECHELLE DE LA CELLULE INDIVIDUELLE: <i>ENTAMOEBIA HISTOLYTICA</i> COMME MODELE..... | 160 |
| 5.4.1 | <i>Introduction à Entamoeba histolytica</i> | 160 |
| 5.4.2 | <i>Intérêt du modèle</i> | 163 |
| 5.5 | PI3-KINASE SIGNALING AT THE REAR POLE OF ENTAMOEBIA HISTOLYTICA REGULATES MAGNETICALLY INDUCED MECHANOTAXIS | 165 |
| | <i>Abstract</i> | 165 |
| | <i>Introduction</i> | 165 |
| | <i>Materials and Methods</i> | 167 |
| | <i>Results</i> | 170 |
| | <i>Discussion</i> | 174 |
| | <i>Conclusion</i> | 176 |
| 5.6 | CONCLUSION SUR LE MOUVEMENT A L'ECHELLE DE LA CELLULE INDIVIDUELLE | 177 |
| 5.7 | ANALYSE COMPLEMENTAIRE SUR LE MOUVEMENT DE CETTE AMIBE | 179 |
| 5.7.1 | <i>Modélisation du mouvement cellulaire</i> | 179 |
| 5.7.2 | <i>Résultats et interprétations de ce mouvement</i> | 180 |
| 5.8 | DE L'ECHELLE DE LA CELLULE INDIVIDUELLE A L'ECHELLE MULTICELLULAIRE..... | 183 |
| 5.9 | À L'ECHELLE D'UNE POPULATION DE CELLULES : MODELE DE L'AMIBE DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM | 183 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 5.9.1 | <i>Choix du modèle</i> | 183 |
| 5.9.2 | <i>Présentation de Dictyostelium discoideum</i> | 183 |
| 5.9.3 | <i>Démarche expérimentale</i> | 187 |
| 5.9.4 | <i>Premiers résultats</i> | 187 |
| 5.9.5 | <i>Premières interprétations</i> | 188 |
| 5.10 | CONCLUSION ET PERSPECTIVES : GUIDAGE MAGNETIQUE DE CELLULES..... | 191 |
| 5.10.1 | <i>Pour l'ingénierie tissulaire</i> | 191 |
| 5.10.2 | <i>Pour la thérapie cellulaire in vivo</i> | 192 |

Chapitre 5

Exploration du mouvement cellulaire *in vitro*

La migration cellulaire a une importance centrale dans une grande variété de processus normaux et pathologiques (Figure 41) qui inclut la morphogénèse des tissus, le recrutement des globules blancs jusqu'aux sites d'inflammation, la réparation tissulaire, l'angiogénèse et la dissémination des métastases. Processus moteur dans l'invasion et le développement des infections parasitaires, elle entre aussi en jeu dans la virulence des parasites.

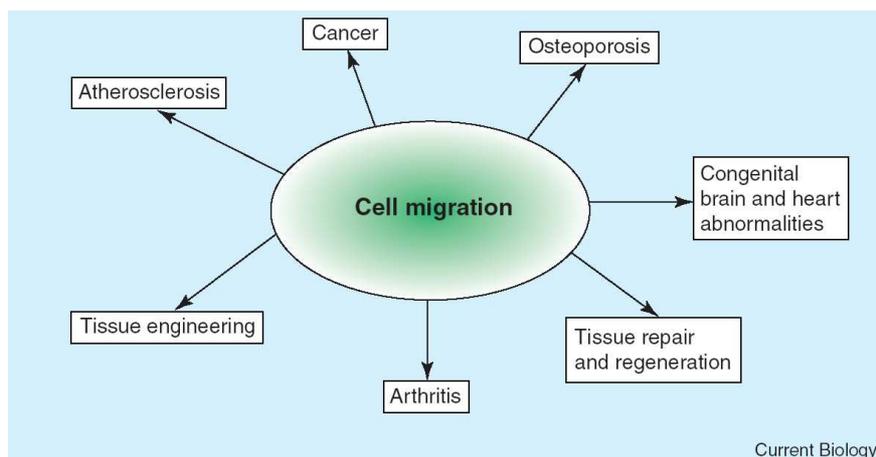


Figure 41. la migration cellulaire dans la santé humaine. D'après (Horwitz and Webb, 2003).

Il existe deux types de migration cellulaire suivant la nature du milieu dans lequel évoluent les cellules. Dans un milieu liquide, certaines cellules spécialisées se déplacent à l'aide de cils ou de flagelles, comme les spermatozoïdes. Mais la plupart des cellules animales migrent sur un support solide. C'est ce type de migration qui sera étudié dans ce chapitre.

Qui dit migration sur un support solide, dit forcément adhésion, car pour migrer la cellule a d'abord besoin de pouvoir s'accrocher sur son support. Cette adhésion doit bien évidemment n'être que transitoire pour pouvoir conserver une certaine mobilité. La migration cellulaire résulte donc d'un équilibre finement régulé avec l'adhésion cellulaire. La relation entre les processus d'adhésion et de migration sont décrits dans l'annexe 2. **Les différents acteurs impliqués dans ces deux processus intimement liés : la matrice extracellulaire, les molécules d'adhésion cellulaire et le cytosquelette sont également brièvement décrits dans l'annexe 2.** Nous

verrons d'abord dans ce chapitre le processus de migration lui-même tel qu'il est connu à l'heure actuelle, avant de se focaliser sur les différentes façons de moduler cette migration cellulaire en soumettant la cellule à des contraintes mécaniques dans un processus appelé **mécanotransduction**. La migration *in vivo* implique en effet généralement **une intégration par la cellule des contraintes mécaniques de son environnement**. La cellule va alors traduire cette stimulation mécanique en signaux biochimiques et modifier sa forme et son mouvement en conséquence. Afin de mieux comprendre ce phénomène de mécanotransduction, nous avons mis au point une **méthode de micromanipulation où nous sommes capables d'appliquer des forces magnétiques locales de façon contrôlée**. Cette approche nous permet d'appréhender comment nous pouvons influencer sur cette migration cellulaire et éventuellement comment nous pourrions **guider ces cellules artificiellement**.

Après avoir décrit le modèle d'étude et son intérêt, la démarche expérimentale ainsi que les principaux résultats de ce travail seront exposés dans l'article présenté dans le paragraphe 5.5 de cette partie. Des analyses complémentaires sur le mouvement cellulaire sont ensuite présentées.

Les principaux résultats obtenus au cours de cette thèse concernent le comportement de cellules à l'état individuel. Néanmoins, dans une première étape d'étude du comportement d'organisme pluricellulaire, il est également intéressant d'analyser le comportement collectif des cellules. **En guise d'ouverture, des résultats préliminaires sur le comportement migratoire non plus d'une cellule, mais d'un agrégat de cellules soumis à une force mécanique seront exposés.**

5.1 La migration cellulaire

Au sein d'un organisme, les cellules migrent en rampant soit sur la surface d'autres cellules, soit sur la matrice extracellulaire, voire également à travers les tissus. Ces cellules peuvent migrer de façon aléatoire ou dirigée, et vont changer leur comportement migratoire en fonction des signaux externes qu'elles reçoivent et de leur fonction au sein de l'organisme. Leur vitesse de migration diffère également en fonction du type cellulaire et de « l'état d'activation » des cellules. Les cellules les plus rapides sont les neutrophiles. Ces cellules du système immunitaire de petites tailles (10-20 μm de diamètre) sont capables de migrer à des vitesses de 7 à 10 $\mu\text{m}/\text{min}$. Elles font parties des cellules capables de détecter des signaux biochimiques et de migrer vers des sites d'infection bactérienne, par un processus appelé chimiotactisme, qui sera détaillé par la suite. Les macrophages ont des capacités de migration similaires et peuvent également migrer à travers l'organisme vers la source d'infection.

Les tissus conjonctifs³⁹ sous la peau, riches en collagène, sont d'autres endroits où le mouvement cellulaire est important. Les fibroblastes qui synthétisent le collagène ont une motilité cellulaire importante bien que plus lente (0.3-1.3µm/min). Ce sont eux qui migrent vers les plaies de la peau pour reformer du tissu et aider les cellules épithéliales à s'assembler en tissus.

Les cellules étudiées (l'amibe *Entamoeba histolytica* et l'amibe sociale *Dictyostelium discoideum*) font toutes les deux parties des cellules au mouvement dit « amibien », qui présente une grande similarité avec le mouvement des neutrophiles ou des lymphocytes.

5.1.1 Le cycle de la migration

La migration cellulaire peut être aléatoire ou dirigée, les phénomènes les plus étudiés étant la migration dirigée et la transition d'un mode de migration à l'autre. Dans les deux cas, la migration est un processus dynamique et cyclique. La cellule se déforme et migre suivant les étapes suivantes (Lauffenburger and Horwitz, 1996; Serrador et al., 1999) (Figure 42) :

(1) Formation de protrusions membranaires à l'avant de la cellule en polymérisant l'actine. La cellule devient alors asymétrique : elle est polarisée.

Ces protrusions jouent le rôle d'antennes, tâtant le terrain et « sentant » la direction d'où elles reçoivent des signaux. C'est donc cette étape qui permet la transition d'une migration aléatoire vers une migration dirigée. Si une direction privilégiée est établie, la machinerie qui permet le mouvement se met en place et s'assemble vers la direction de migration.

(2) La protrusion s'attache alors sur le substrat en collectant à l'avant de la protrusion des complexes adhésifs nécessaires à la traction. Elle crée ainsi des points focaux d'adhésions dans lesquels des protéines adhésives telles que la vinculine sont concentrées.

(3) Il y a alors génération de forces de contractions et de tractions qui permettent de déplacer le corps cellulaire vers l'avant dans la direction de la protrusion. Ces forces sont générées grâce entre autres aux complexes actines-myosines, qui se contractent à l'arrière de la cellule et poussent le corps de la cellule vers la protrusion.

(4) Le cycle se finit par la libération des connections adhésives à l'arrière de la cellule et la rétraction de la queue. L'arrière de la cellule se détache alors et le cycle peut recommencer.

L'orchestration de ce processus complexe réside dans de nombreuses molécules qui servent à distinguer l'avant de l'arrière de la cellule et dont les actions sont méticuleusement minutées.

³⁹ Les tissus conjonctifs sont présents dans tous les organes et occupent les espaces libres entre les autres tissus. Ils ont un rôle de remplissage ou de soutien. Ils sont composés principalement d'éléments de la matrice extracellulaire et de cellules relativement isolées, principalement des fibroblastes.

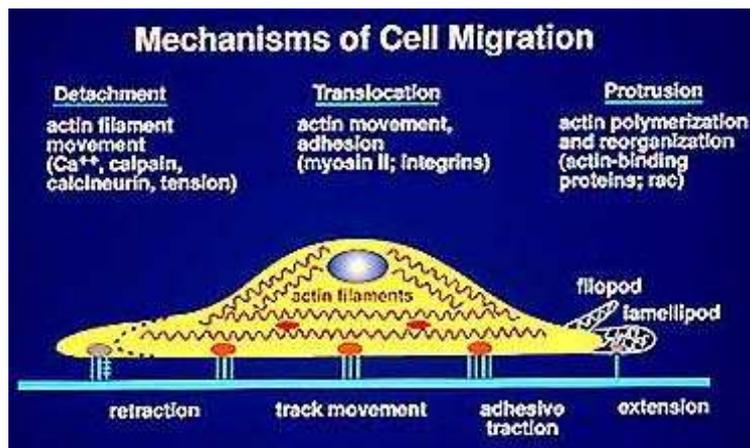


Figure 42. Le mécanisme de migration cellulaire, D'après Horwitz.

5.1.2 Importance de la polarisation

La première étape de tout processus de migration nécessite donc une réorganisation complète du cytosquelette ainsi que d'un certain nombre de récepteurs et de composants intracellulaires. La cellule devient alors asymétrique, avec un avant et un arrière bien distincts: on dit qu'elle est polarisée. C'est cette asymétrie dans la morphologie de la cellule qui permet d'avoir un bilan de forces non nul et qui permet à la cellule de convertir les forces mécaniques internes en mouvement cellulaire.

Cette asymétrie est le résultat d'un réarrangement spatial de nombreuses protéines du cytosquelette (Serrador et al., 1999). Cette réorganisation nécessite la polymérisation d'actine à l'avant de la cellule et sa dépolymérisation à l'arrière. Des protéines intracellulaires qui répondent à différents signaux (biochimiques, ioniques, mécaniques) escortent l'actine tout au long de ce cycle dans lequel les filaments sont assemblés, pontés, puis désassemblés.

Ces protéines vont ainsi moduler la direction de polymérisation d'actine, et donc l'orientation de la polarisation cellulaire, puis la direction de la migration cellulaire. Lorsque la migration est aléatoire, la direction de polymérisation d'actine est modifiée sur des temps caractéristiques très courts et la persistance de la direction de polarisation est très faible. En revanche, lorsque la migration est dirigée, il existe une persistance dans la direction de polymérisation beaucoup plus longue et donc une persistance dans la direction de polarisation sur des échelles de temps bien plus importantes.

Dans l'article présenté au paragraphe 5.5, nous avons démontré l'importance de la polarisation dans la mise en place du mouvement pour le cas particulier de l'amibe *Entamoeba histolytica*.

5.1.3 Les protrusions membranaires

Lorsqu'elles migrent ou changent de forme, les cellules émettent donc des protrusions membranaires. Ces protrusions portent des noms différents en fonction de leur morphologie (Figure 43). Les amibes telles que *Entamoeba histolytica* produisent des protrusions relativement larges et fines (0.1-0.2 μm) contenant un réseau dense de filaments d'actine appelées pseudopodes. Les cellules fibroblastiques émettent également des protrusions fines en forme de feuillet, mais moins larges que les protrusions émises par les cellules au mouvement amibien, appelées lamellipodes. Pseudopodes et lamellipodes ont des structures voisines et différent par leur taille. De nombreuses cellules envoient également des petites protrusions fines et rigides, appelées microspicules, puis filopodes, d'environ 0.1-0.2 μm de diamètre et de 5 à 10 μm de long pour les microspicules, et pouvant atteindre jusqu'à 50 μm pour les filopodes. Ces microspicules et filopodes contiennent un faisceau lâche d'une vingtaine de filaments d'actine.

Ces différentes structures dynamiques permettent d'une part l'adhésion aux substrats et d'autre part le déplacement du corps cellulaire.

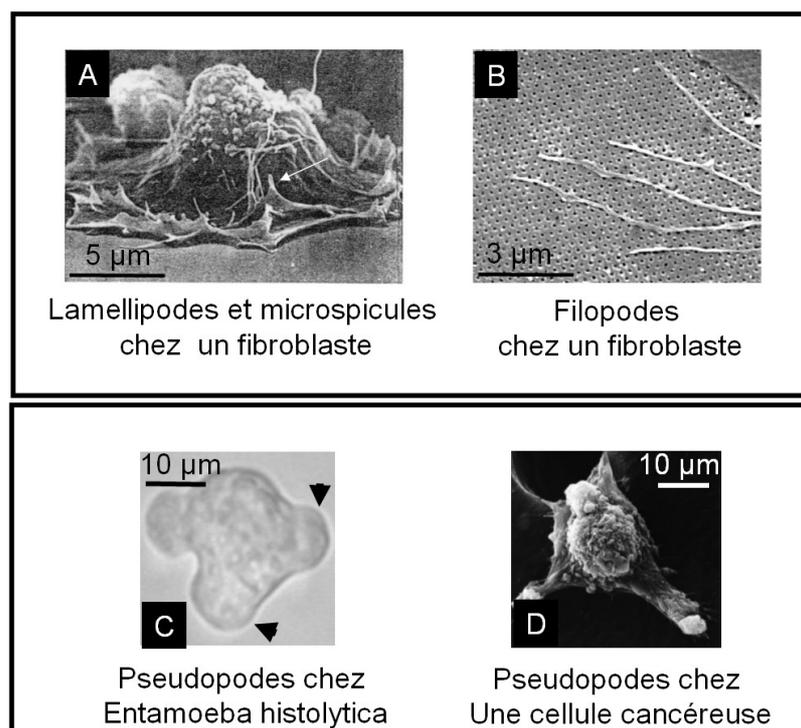


Figure 43. Protrusions membranaires

(A) Les lamellipodes (parties plates de la cellule) et les microspicules (flèche) se retrouvent généralement dans des cellules telles que les fibroblastes. D'après (Bray, 1992), p24. (B) Les filopodes sont des protrusions fines et longues, souvent initiées à partir de microspicules, qui « tâtent » à distance le support sur lequel les cellules adhèrent. D'après (Curtis, 2004). (C) Les pseudopodes, plus larges, sont des protrusions émises pendant le mouvement amibien. On les observe chez l'amibe *Entamoeba histolytica* (ici observée en microscopie optique) (C), mais également chez des cellules cancéreuses par exemple (D'après <http://visualsonline.cancer.gov/browseaction.cfm?topicid=79>) (D).

5.1.4 Le gel d'actine intracellulaire : un partenaire clé pour le mouvement

Pour migrer, la cellule a besoin de se déformer. Cette déformation est principalement assurée par le gel d'actine. Plus précisément, ce sont les processus de polymérisation/dépolymérisation, ainsi que les transitions gel-sol⁴⁰ de ce polymère (Janson and Taylor, 1993) qui permettent la formation de protrusions membranaires (revue : (Mogilner and Oster, 2003b)). La polymérisation d'actine permet la production de forces suffisantes pour propulser des organismes pathogènes intracellulaires comme la *Listeria monocytogenes* (Figure 44), mécanisme qui peut être reconstitué *in vitro* (Miyata et al., 1999). Ces analyses ont permis de développer des modèles pour ce mode de propulsion, comme le « polymerization ratchet » (Peskin et al., 1993), modifié ensuite par l'« elastic polymerisation ratchet » (Mogilner and Oster, 2003a).

Il existe des similarités entre la dynamique d'actine nécessaire à la propulsion de *Listeria* et celle nécessaire à l'extension du lamellipode de certaines cellules, où la polymérisation d'actine apparaît là aussi être la force de propulsion principale (Cameron et al., 2000). Les études sur *Listeria* permettent donc d'expliquer en partie la propulsion de la protrusion membranaire à l'avant de la cellule. La déformation et le mouvement cellulaire peuvent dans ce contexte être décrits comme ceux d'un matériau polymérique aux propriétés viscoélastiques complexes. Par des analyses théoriques uniquement basées sur l'équilibre thermodynamique de polymérisation/dépolymérisation pour des gels de polymères d'une part et l'équilibre des forces de friction et d'adhésion avec le substrat d'autre part, de nombreuses études mettent en évidence la génération de mouvement.

C'est dans ce contexte que (Gerbal et al., 2000) décrivent le mouvement de la bactérie *Listeria Monocytogènes*. Cette bactérie se propulse par la formation d'une comète ou queue d'actine de la cellule hôte. En décrivant le gel d'actine comme un milieu continu, cette équipe a analysé la propulsion de la bactérie dans le cadre de la théorie linéaire de l'élasticité. Dans ce modèle, l'addition de nouveaux filaments d'actine à la surface de la bactérie induit des déformations élastiques dans le gel : la nouvelle couche polymérisée comprime la précédente. L'énergie libre produite par la polymérisation d'actine n'est donc pas directement utilisée pour la propulsion, mais est dans un premier temps stockée en tant qu'énergie élastique, induisant des contraintes

⁴⁰ L'actine à l'état sol est un polymère non réticulé, à la viscosité relativement faible, et qui peut s'apparenter à un état proche d'un fluide. On retrouve l'actine dans cet état principalement au centre de la cellule amibienne, dans une région appelée endoplasme.

L'actine à l'état gel forme un réseau réticulé, à la viscosité élevée. On retrouve l'actine sous cette forme sur les bords de l'amibe, et en particulier à l'avant de la cellule.

La transition sol-gel à l'avant et gel-sol à l'arrière de la cellule permet ainsi la rétraction de la queue à l'arrière de la cellule, ainsi que l'extension de protrusions à l'avant de la cellule.

entre la bactérie et le gel d'actine. Le mouvement de la bactérie est alors dû à la relaxation de la déformation dans la comète d'actine.

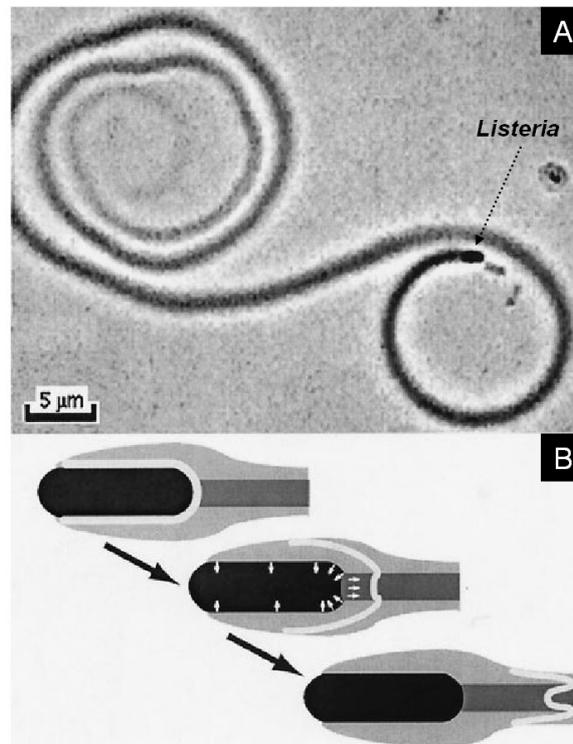


Figure 44. Mouvement de la bactérie *Listeria* et modélisation de son mouvement

(a) Observation de *Listeria* se déplaçant dans un extrait de plaquette (microscopie à contraste de phase). La bactérie se déplace à 8 µm/min et la comète d'actine peut atteindre plus de 100 µm de longueur. (b) Modèle élastique de la propulsion de la bactérie : les nouveaux filaments de polymère à la surface de la bactérie poussent l'ancienne couche, induisant des contraintes dans le gel d'actine. Le mouvement de la bactérie est dû à la relaxation de la déformation dans la comète. D'après (Gerbal et al., 2000).

Des modèles récents, comme celui de (Joanny et al., 2003) ont également pris en compte la modification du mouvement du gel par un stimulus extérieur. Dans ce modèle l'influence d'une force extérieure sur le mouvement du gel est différente en fonction du point d'application de la force. Si la force est appliquée au niveau où le gel adhère au substrat, elle n'a pas d'effet sur la vitesse du mouvement tant que la force appliquée ne dépasse pas la force nécessaire pour rompre les points d'adhésion (la déformation du gel et la contrainte appliquée restent localisées autour du point d'application de la force). En revanche, si la force est appliquée à l'arrière du gel, à l'endroit où les points d'adhésion sont rompus, elle doit être prise en compte dans le bilan global des forces. Éventuellement, une force appliquée à l'arrière du gel, à l'opposé du mouvement influencera la vitesse de dépolymérisation, augmentant ainsi la vitesse globale du mouvement du gel.

Ces modèles peuvent permettre d'expliquer une partie des mécanismes impliqués dans la migration cellulaire induite par la polymérisation/dépolymérisation d'un gel, comme la migration du sperme de nématodes (Bottino et al., 2002) ou celle des cellules au mouvement amibien. Ils

peuvent aussi permettre d'isoler les processus d'origine purement physique dans le comportement cellulaire. Nous avons d'ailleurs essayé de les confronter à nos résultats expérimentaux dans l'article présenté au paragraphe 5.5. Ces modèles ont néanmoins des limites : l'environnement cellulaire y est seulement décrit comme un gel de polymère, sans rendre compte de la complexité du réseau d'interactions intra- et inter-cellulaire. De plus, la polymérisation d'actine n'est pas la seule force permettant la propulsion. Même si elle permet d'expliquer de façon relativement fidèle les forces développées dans les lamellipodes, d'autres éléments, tels que la pression osmotique locale peuvent également jouer un rôle dans le déplacement de cette protrusion.

Dans le mouvement amibien, la transition gel-sol des polymères d'actine crée des flux de cytoplasme importants et ces flux peuvent également générer des forces nécessaires au mouvement (Figure 45).

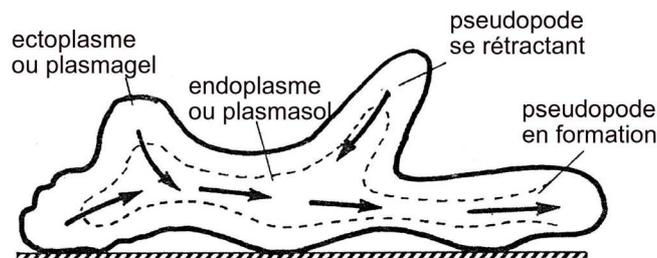


Figure 45.

Flux de cytoplasme pendant la migration amibienne (ici l'amibe *Amoeba Proteus*). La partie centrale du cytoplasme est plus fluide et connue sous le nom d'endoplasme, ou plasmasol. Des flux d'endoplasme ont lieu en direction des pseudopodes qui se forment et à l'opposé des pseudopodes qui se rétractent. Plus à l'extérieur, la viscosité du cytoplasme augmente et cette partie plus rigide peut être assimilée à un gel. Elle est connue sous le nom d'ectoplasme, ou plasmagel. À l'extrémité d'un pseudopode, il y a une conversion continue de plasmasol en plasmagel (c'est-à-dire une transformation de l'actine d'un état fluide à un état plus solide). La transformation inverse se produit aux endroits où des pseudopodes se rétractent. D'après (Bray, 1992).

À l'arrière de telles cellules, ce sont alors les moteurs moléculaires et notamment les myosines qui permettent la contraction de la queue ainsi que la génération de ces flux de cytoplasme (Janson and Taylor, 1993). Les cellules que nous avons étudiées rentrent dans cette dernière catégorie.

5.1.5 Les forces mécaniques générées par la cellule

Pour ramper, les cellules génèrent donc deux types de force : une force de propulsion pour étendre leur front avant et une force de traction pour déplacer le corps cellulaire (Figure 46), impliquant une activation et un réajustement permanent du cytosquelette.

FORCES EXERTED IN CELL LOCOMOTION

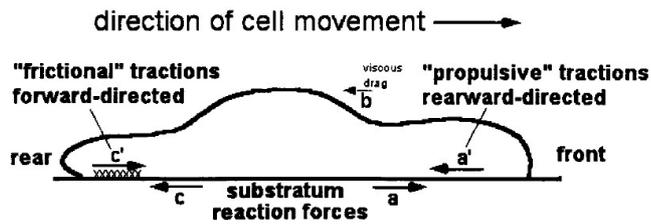


Figure 46. Bilan des forces pour une cellule en mouvement

Une cellule migrant sur son substrat déploie et est soumise à différents types de forces, qui comprennent : des forces de réactions du substrat (a) aux forces de propulsion à l'avant de la cellule (a'), des forces visqueuses (b) entre la cellule et le milieu liquide environnant et des forces de réactions (c) aux forces de tractions (c') créées à l'arrière de la cellule. D'après (Oliver et al., 1999).

La cellule répond de façon active en modifiant les forces mécaniques qu'elle exerce sur son substrat. La caractérisation des forces mécaniques exercées par les cellules et les phénomènes permettant la génération de ces forces ont été étudiés de façon approfondie tant d'un point de vue théorique qu'expérimental. Ainsi, grâce à un substrat élastique dont on peut contrôler l'élasticité (Harris et al., 1980), des études ont montré il y a plus de vingt ans que des fibroblastes produisaient des forces de tractions suffisamment élevées pour plisser les feuilles de silicone de quelques microns d'épaisseur (Figure 47). Ces études, analysant l'amplitude globale des forces exercées par les cellules, ont montré que les forces générées par les cellules étaient inversement proportionnelles à leur vitesse. Les plissements générés par les cellules peuvent ensuite être analysés de façon à cartographier les forces mises en jeu (Burton et al., 1999; Burton and Taylor, 1997).

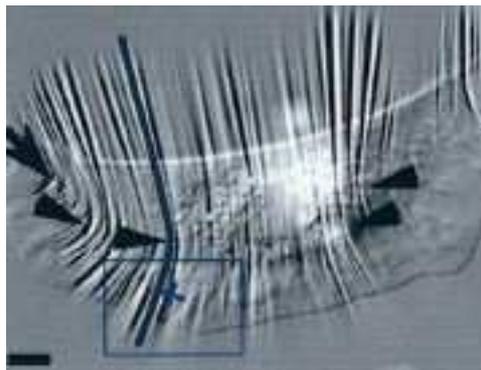


Figure 47

Forces de tractions appliquées par la cellule révélées grâce à un substrat flexible. L'exemple ici est un keratocyte qui génère des forces sur le substrat (les plissements à la droite de la cellule correspondent à 680nN. Les plissements sont produits sur les côtés (flèches) et le long de tout le corps cellulaire (tête de flèches). La plupart des plissements sont localisés perpendiculaire à la frontière du lamellipode avec le corps cellulaire, et symétriquement par rapport à une ligne au centre de la cellule. Barre = 5 μm . D'après (Burton et al., 1999).

Des techniques complémentaires, comme l'inclusion de microbilles dont on suit le déplacement au cours du temps (Dembo and Wang, 1999), permettent de remonter à l'amplitude des forces de

traction exercées (Butler et al., 2002). En général, les forces les plus importantes se trouvent suivant l'axe majeur de la cellule. Cette axe est parallèle à la direction du mouvement cellulaire pour des fibroblastes mais peut aussi être perpendiculaire pour des cellules de type kératocyte (Oliver et al., 1999)(Figure 48).

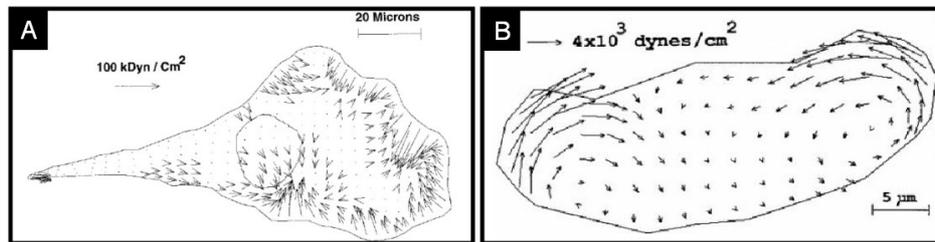


Figure 48

Reconstruction de l'amplitude des forces exercées par un fibroblaste (A, (Dembo and Wang, 1999)) et un Keratocyte (B, (Oliver et al., 1999)). Note : $100\text{kDyn}/\text{cm}^2 = 10\text{nN}/\mu\text{m}^2$ et $4\text{kDyn}/\text{cm}^2 = 0.4\text{nN}/\mu\text{m}^2$.

Ces techniques ont également permis de mettre en évidence que, **par un mouvement rétrograde d'actine (Wang, 1985), la force de traction à l'avant de la cellule était orientée à l'opposé du mouvement cellulaire.** En revanche **à l'arrière de la cellule, une force de contraction dirigée dans la direction du mouvement est générée.** Ce sont ces forces opposées qui permettent au corps cellulaire de se déplacer vers l'avant, en contractant le cytoplasme.

Dans le même ordre d'idée, il est possible d'utiliser des microplaques (Figure 49) pour mesurer la force de traction exercée par une cellule isolée (de l'ordre de 40 nN pour un fibroblaste (Thoumine and Ott, 1997b)) ou même pour mesurer les propriétés mécaniques du noyau (Caille et al., 2002). Ce même dispositif permet également de quantifier les forces d'adhésion développer par une cellule sur un substrat protéique préalablement déposé sur une des microplaques (Thoumine and Meister, 2000).

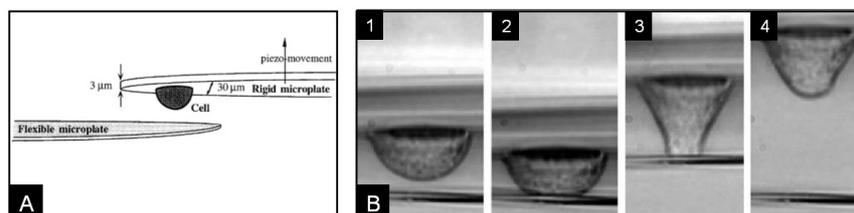


Figure 49. Système de microplaques.

(A) Dessin en perspective de l'expérience. Une microplaque rigide est enrobée de glutaraldehyde et la microplaque flexible de fibronectine. (B) Séquence d'images d'une expérience typique : un fibroblaste capturé et légèrement étalé sur la plaque rigide (B1) est placé en contact avec la plaque flexible enrobée de fibronectine et est incubé pendant 5 minutes. Une légère compression est imposée jusqu'à la fin de la période d'adhésion (B2). La microplaque rigide est alors déplacée vers le haut (25 μm en 10s). La cellule est montrée juste avant (B3) et après (B4) la rupture de l'adhésion avec la plaque flexible. (Notez la déflexion de la microplaque rigide). Barre = 5 μm .

L'apport des micro-, puis nano-technologies a ensuite permis une analyse plus fine. Dès 1997, en fabriquant un microlevier dont on peut quantifier la déformation, (Galbraith and Sheetz, 1997) ont réussi à mesurer l'amplitude des forces exercées par une cellule individuelle et à mettre en évidence de façon quantitative les différents domaines de force au sein du corps cellulaire (Figure 50), confirmant l'analyse qualitative faite auparavant. **Les forces de traction exercées par le lamellipode sont en fait d'assez faibles amplitudes (8 nN) et orientées à l'opposé du mouvement cellulaire. Au contraire, les forces exercées à l'arrière de la cellule sont 10 fois plus importantes (de 80 à 100 nN) et orientées dans la direction du mouvement cellulaire.** Ces forces sont générées par un petit nombre seulement de points focaux d'adhésion, chaque point focal d'adhésion générant une force estimée à 3 nN.

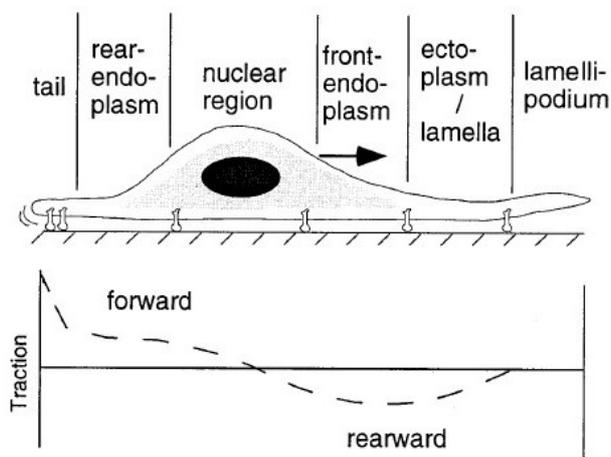


Figure 50

Distribution des forces de traction dans un fibroblaste, mesurées par la déformation de microleviers. Les forces de tractions sont négatives à l'avant de la cellule (indiquant qu'elles sont dirigées à l'opposé de la direction de migration) et augmentent à la frontière entre endoplasme et ectoplasme, puis changent de direction au niveau du noyau pour devenir largement positives à l'arrière de la cellule (indiquant cette fois-ci qu'elles sont dirigées dans le sens de la migration). D'après (Galbraith and Sheetz, 1997).

Grâce aux nanotechnologies, le substrat déformable a ensuite été remplacé par un « tapis de fakir », composé de plots verticaux nanométriques. L'enregistrement de la déflexion des plots permet alors de remonter aux contraintes exercées par la cellule sur son substrat (du Roure et al., 2005; Tan et al., 2003) (Figure 51).

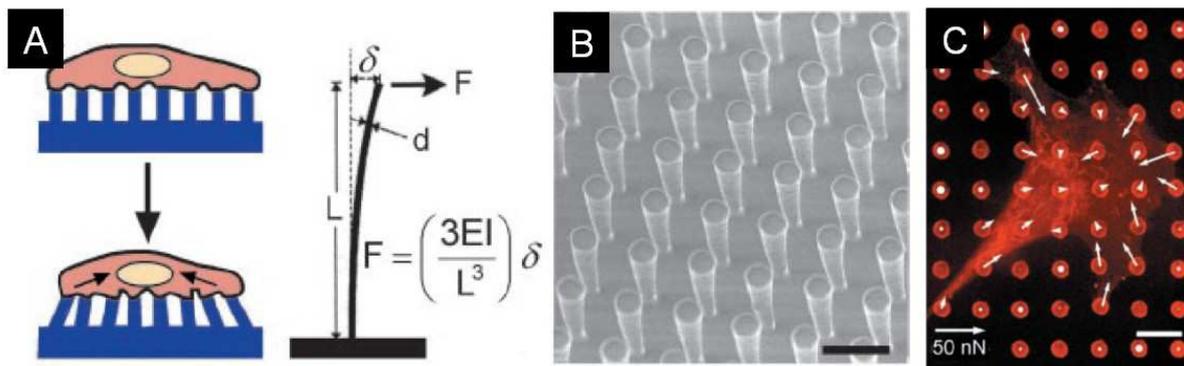


Figure 51. Schéma du dispositif de microplots.

(A) Si les plots sont suffisamment proches les uns des autres, la cellule est capable de s'étaler normalement, comme schématisé sur le dessin. La cellule exerçant des forces de traction dévie les plots d'élastomères. La déflexion du plot δ peut être reliée à la force exercée, en connaissant le module d'Young E , le moment d'inertie I et la longueur L de chaque plot. Un cliché de microscopie électronique des plots fabriqués est montré en (B). (C) Cartographie des forces contractiles sur la cellule. Barre = 10 μm . D'après (Tan et al., 2003).

En utilisant ce système, (Tan et al., 2003) ont montré une corrélation directe entre la taille des points focaux d'adhésion et la force générée à ces points d'adhésion, avec un seuil de coupure pour des surfaces inférieures à 1 μm^2 , où cette corrélation disparaît. Ce type de système pourrait s'avérer particulièrement utile pour contrôler de façon indépendante les propriétés chimiques et physiques du substrat et étudier les mécanismes par lesquels la cellule détecte les propriétés mécaniques et biochimiques de son environnement.

La complémentarité de ces différentes techniques nous permet aujourd'hui d'avoir une idée assez précise des contraintes mécaniques intrinsèques exercées par les cellules et par chaque élément de l'architecture cellulaire (Tableau 6). Les recherches portent maintenant sur le contrôle de l'adhésion et de la migration cellulaire et du remodelage du cytosquelette par des contraintes mécaniques, comme nous allons le voir dans le paragraphe 5.2.2.

| Types de Forces | Éléments | F(pN) | référence |
|--|---|--|--|
| Forces intracellulaires | Myosine | 3-4 | (Finer et al., 1994) |
| | Dynéine | 2.5 | (Ashkin et al., 1990) |
| Forces transmembranaires | Integrine-fibronectine | 30-100 | (Lehenkari and Horton, 1999) |
| | 1 point focal d'adhésion | 3000 | (Galbraith and Sheetz, 1997) |
| | 1 point d'adhésion cellules-cellules chez <i>Dictyostelium discoideum</i> | 23 | (Benoit et al., 2000) |
| Forces visqueuse du cytoplasme chez <i>Entamoeba histolytica</i> | | >> 60 | Calculé par rapport aux forces dipolaires (paragraphe 5.4.1) |
| Forces associées à la protrusion/extension à l'avant | Lamellipodes | 8000 | (Galbraith and Sheetz, 1997) |
| | | 2000 | (Dembo and Wang, 1999) |
| Forces exercées à l'arrière | | 80 000 à 100 000 | (Galbraith and Sheetz, 1997) |
| Forces globales | F adhésion | 40 000 (fibroblastes) >2000 (<i>Dicty.</i>) | (Thoumine and Ott, 1997) (Fukui et al., 2000) |
| | F traction | 10 000 (keratocytes) | (Oliver et al., 1999) |

Tableau 6. Ordre de grandeur des forces impliquées dans la migration (pN).

5.1.6 La cellule comme capteur

La cellule a une capacité fascinante à sentir et répondre à un stimulus et ce, avec une incroyable sensibilité. Cette capacité qu'a la cellule d'intégrer son environnement est d'ailleurs capitale dans la mise en place de la réponse immunitaire (notamment dans le recrutement des lymphocytes) et dans de nombreux aspects du maintien et du développement des tissus.

La cellule est en fait un matériau extrêmement complexe, qui peut être vu comme un capteur, composé d'un nombre encore méconnu de boucles de rétroaction, et qui va moduler sa réponse et déclencher toute une machinerie cellulaire en fonction des interactions qu'elle subit et des signaux qu'elle reçoit (Figure 52).

Ainsi, la cellule va interagir avec le substrat sur lequel elle adhère par l'intermédiaire de protéines adhésives ou avec ces cellules voisines par l'intermédiaire des cadhérines, mais également avec des signaux biochimiques qui vont être reconnus par des récepteurs présents sur la membrane cellulaire. Enfin, elle est également sensible à des stimuli mécaniques, tels que le flux sanguin, la rigidité du substrat ou la compression imposée par l'agencement cellulaire. Elle va alors moduler son comportement en fonction des contraintes mécaniques qui lui sont imposées.

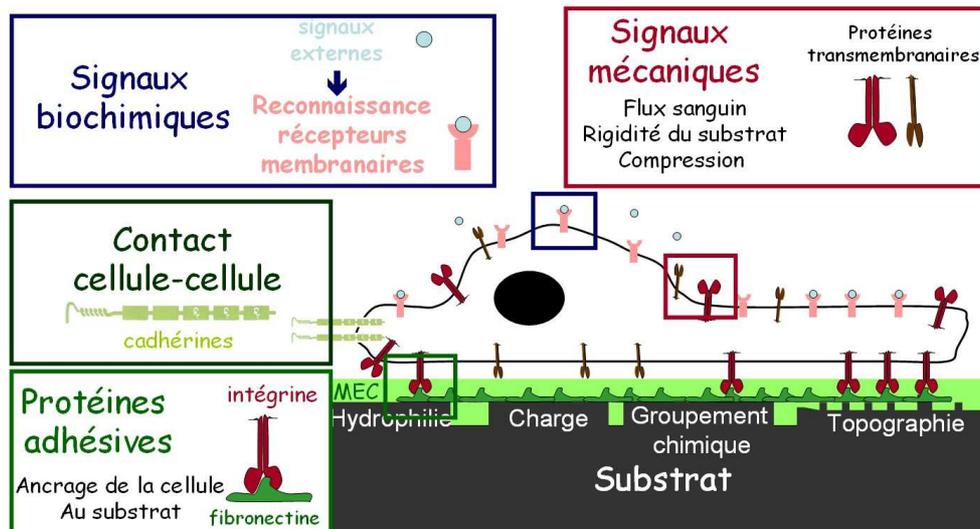


Figure 52. Les différentes interactions de la cellule avec son environnement

Toutes ces interactions ont lieu à différentes échelles : de l'échelle moléculaire (de quelques nanomètres) à l'échelle cellulaire (de plusieurs dizaines de microns) et vont se faire avec différentes dynamiques : de la picoseconde à la minute.

La cellule est donc un véritable capteur multisignal, capable de détecter aussi bien des signaux biochimiques, physico-chimiques que mécaniques. C'est l'intégration de ces différents signaux qui va moduler la réponse cellulaire, et dans le cas qui nous intéresse, la migration cellulaire.

5.2 La migration dirigée

Même si les cellules les plus motiles sont capables de migrer de façon aléatoire, la plupart des cellules migrent de façon réellement efficace seulement en présence de signaux externes, déclenchant une cascade de changements internes et permettant la mise en place d'une migration dirigée.

Cette migration dirigée, médiée par la mise en place d'une forme polarisée, est généralement modulée par des signaux chimiques externes (chimiotaxie) reconnus par des récepteurs membranaires. Néanmoins, la cellule est également capable de déclencher une migration directionnelle en fonction des propriétés du substrat (guidage par contact) ou en réponse à une contrainte mécanique (mécanotaxie).

L'étude développée dans le cadre de cette thèse a porté sur ce dernier type de stimulus. Après un bref rappel sur la chimiotaxie, la suite de ce paragraphe sera donc concentrée sur les phénomènes de mécanotaxie et de mécanotransduction.

5.2.1 Rôle des signaux chimiques : chimiotaxie

La cellule est capable de détecter des différences de concentrations de molécules extracellulaires extrêmement faibles (de l'ordre de la nanomole, voire de la picomole). Parmi ces signaux chimiques, on trouve des peptides, appelés chimiokines, mais également des facteurs de croissance. **La détection du gradient chimique va induire des modifications dans la morphologie et la motilité cellulaire, instaurant ainsi une migration dirigée vers (chimioattractant) ou à l'opposée (chimiorepoussant) du gradient de molécules.** C'est ce qu'on appelle généralement **chimiotaxie**.

Ces signaux chimiques, reconnus par des récepteurs membranaires, entraînent ainsi une réorganisation d'un nombre encore méconnu de récepteurs membranaires et d'acteurs intracellulaires (revue : (Niggli, 2003)). Parmi ceux-ci, on trouve notamment une kinase **activée par les protéines G (protéines transmembranaires), la Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)**, ses produits lipidiques (transformation de PIP2 en PIP3), ainsi qu'une autre phosphatase lipidique, PTEN, qui inhibe la production de ce même PIP3 (Iijima et al., 2002) (Figure 53). En effet, la concentration locale de PIP3 semble être un paramètre clé pour la mise en place de la direction de polymérisation d'actine, et donc pour la mise en place de la direction de migration (Merlot and Firtel, 2003 ; Ward, 2004). La PI3K est souvent décrite comme la « boussole cellulaire » (Rickert et al., 2000 ; Weiner, 2002) : sa régulation est particulièrement importante pour amplifier les faibles gradients de molécules chimiotactiques externes en un gradient interne de PIP3 suffisamment fort pour favoriser la polymérisation d'actine dans cette direction particulière (Chen et al., 2003). A l'arrière de la cellule, le rôle de la PTEN et des myosines II est complémentaire à celui de PI3K puisqu'elles permettent d'inhiber la formation de pseudopodes latéraux.

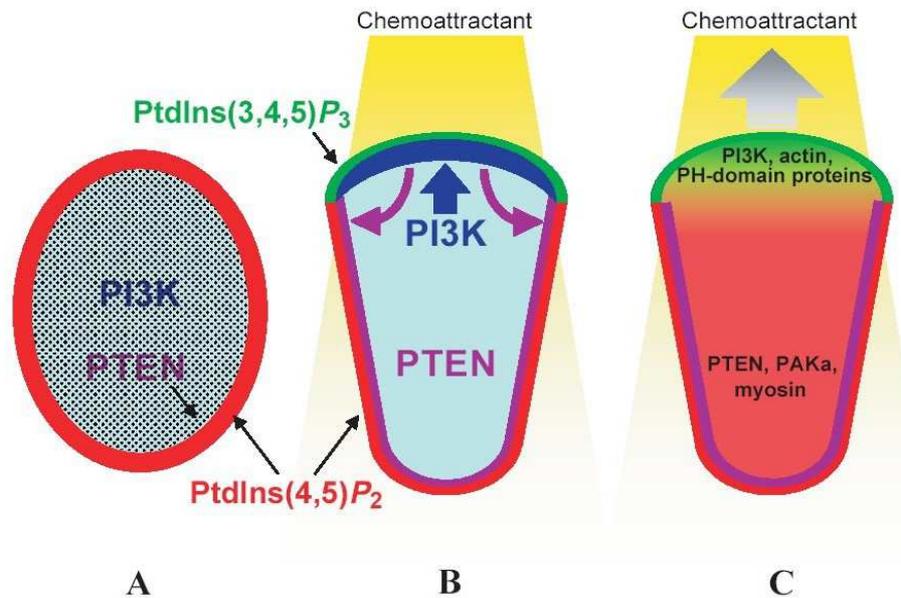


Figure 53

(A) En l'absence de stimuli, la PI3K est principalement cytoplasmique alors que la PTEN est localisée au niveau de la membrane cellulaire, résultant en une distribution homogène de PIP₂ au niveau de la membrane cellulaire. (B) Lorsque les cellules détectent un signal chimiotactique, une ou des cascade(s) biochimique(s) encore méconnue(s) modifie(nt) rapidement la localisation de PI3K vers l'avant de la cellule, dans la direction de la plus grande concentration en chemoattractants et délocalise(nt) la PTEN de ce même front avant. Ceci permet d'une part la transformation de PIP₂ en PIP₃ au niveau du front avant, et d'autre part l'inhibition de cette transformation sur les côtés et à l'arrière de la cellule par la PTEN. La relocalisation de la PI3K et de la PTEN permet ainsi de créer un fort gradient antérieur/postérieur de PIP₃ interne. (C) PIP₃ recrute et active alors au niveau du front avant d'autres protéines qui stimulent la polymérisation de l'actine dans cette direction, orientant ainsi la polarisation cellulaire et donc la direction de migration. En coordination avec les événements au niveau du front avant de la cellule, d'autres cascades biochimiques encore méconnues retiennent certaines protéines à l'arrière de la cellule, dont le rôle est d'inhiber la formation de pseudopodes latéraux et de rétracter le pôle arrière de la cellule lorsque le front avant se déplace. Le rôle de la myosine II dans la rétraction de la queue et l'inhibition des pseudopodes latéraux a notamment été mis en évidence. D'après (Merlot and Firtel, 2003).

5.2.2 Rôle des interactions mécaniques : mécanotaxie

Contraintes mécaniques rencontrées par les cellules in vivo

Les cellules au sein d'un tissu *in vivo* sont continuellement soumises à des contraintes mécaniques imposées par leur environnement et doivent être capables de moduler leur phénotype et leurs fonctions en cas d'éventuel changement, même infime, de la contrainte qu'elles subissent. En cas de lésion superficielle de la peau par exemple, les cellules épithéliales doivent non seulement lancer un programme de division cellulaire, mais également sécréter des molécules chimiques canalisant la migration des fibroblastes vers la zone lésée. De même, les cellules endothéliales constituant les vaisseaux subissent continuellement le cisaillement imposé par le flux sanguin et doivent être capables de détecter la moindre anomalie dans l'écoulement sanguin (Sheikh et al., 2003). Toujours au niveau des veines, des déformations et des contraintes mécaniques ont

également été démontrées comme étant à l'origine de l'induction d'un signal de mort cellulaire (Moore et al., 2001). Quant aux cellules osseuses et musculaires, elles sont également continuellement soumises à des contraintes mécaniques externes.

Il apparaît donc évident que les interactions mécaniques doivent influencer sur le comportement cellulaire.

Rôle des propriétés mécaniques du substrat

La migration cellulaire est modulée par les propriétés mécaniques du substrat. Ainsi, l'organisation d'une cellule adhérente sur un substrat mou sera différente de celle sur un substrat plus rigide (Bischofs and Schwarz, 2003).

Il a été démontré que les cellules pouvaient aussi être dirigées par des interactions purement physiques à l'interface cellule/substrat. Ainsi, non seulement la flexibilité du substrat régule la croissance cellulaire et la mise en place de l'apoptose (Wang et al., 2000), mais la rigidité et la déformation du substrat jouent également un rôle important dans la migration cellulaire (Lo et al., 2000). Dans cette étude, les cellules placées sur un substrat comportant un gradient de rigidité, migrent vers les régions les plus rigides, dans un processus que ces auteurs ont appelé, par analogie avec la chimiotaxie, « durotaxie ».

Des études du même groupe ont également montré des différences au niveau de la morphologie et de la vitesse de migration cellulaire pour des substrats ayant la même composition chimique, mais des rigidités différentes (Pelham and Wang, 1997; Pelham and Wang, 1998).

Il ne faut pas oublier non plus qu'*in vivo*, les cellules migrent non pas sur un substrat 2D, mais au sein d'une structure 3D. Des études sur la migration des neutrophiles ont montré que là encore, les neutrophiles pouvaient sentir les propriétés mécaniques de la matrice extracellulaire 3D et qu'ils migraient alors le long des fibres les plus rigides (Mandeville et al., 1997). Les rôles de la topographie et de l'architecture 3D ont été mis en avant comme des facteurs clés dans la migration des lymphocytes au sein des tissus (Friedl and Brocker, 2000).

De ces différentes observations, on peut donc raisonnablement penser que les cellules sont dotées d'un « sens tactile » et sont donc capables de répondre et de s'adapter à la rigidité du substrat en exerçant des forces contractiles et en interprétant ensuite la déformation du substrat pour déterminer une direction privilégiée pour leur mouvement (Sheetz et al., 1998).

D'ailleurs, en cultivant les cellules sur des substrats contenant des îlots de matrice extracellulaire dont la taille et la distribution spatiale sont imposées par impression de microcontacts, les cellules prennent alors la forme des îlots sur lesquels elles adhèrent (Figure 54). Il est ainsi possible de moduler la distribution des points focaux d'adhésion et de contrôler spatialement les forces de

tractions exercées par les cellules (Parker et al., 2002). Dans ce cas, la position des protrusions qui contrôlent le mouvement (lamellipodes, filopodes et microspicules) s'en trouve elle aussi affectée : les cellules émettent des protrusions préférentiellement à partir des zones de fortes contraintes mécaniques. En analysant l'orientation des protrusions cellulaires pour des cellules carrées, cette étude montre que les interactions mécaniques entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire, par l'intermédiaire des points focaux d'adhésion peut donc favoriser la direction de migration cellulaire.

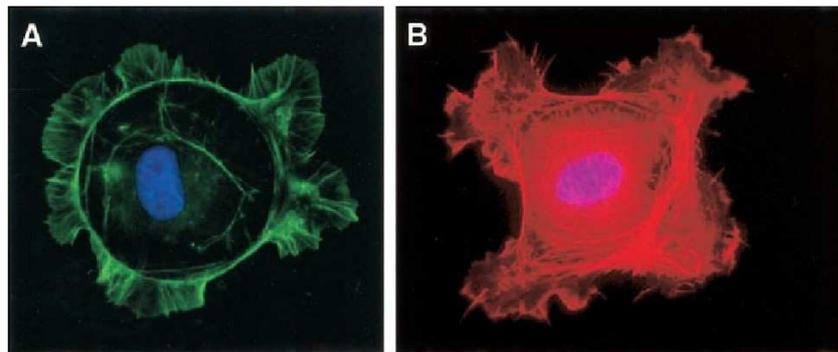


Figure 54. Les cellules endothéliales sur des îlots de fibronectine carrés émettent préférentiellement des protrusions au niveau des coins.

Image de microscopie à fluorescence d'une cellule cultivée sur un îlot circulaire de 50 µm (A) et sur un îlot carré de 40x40 µm (B) et coloré à la phalloïdine fluorescente pour visualiser les filaments d'actine F au niveau des lamellipodes et filopodes ainsi qu'au DAPI pour visualiser le noyau. D'après (Parker et al., 2002).

La cellule doit donc être capable d'intégrer et de réagir à l'ensemble des contraintes mécaniques imposées par son microenvironnement.

Forces mécaniques traduites par la cellule : détection et transmission du signal

Pour assurer ce « sens tactile », la cellule doit avoir des récepteurs spécialisés, capables de détecter et transmettre le signal mécanique à l'intérieur de la cellule. Comme décrit dans l'annexe 2, les molécules d'adhérences, et en particulier les intégrines, de part leur fonction de senseurs extracellulaires, et de traducteurs intracellulaires sont les protéines les plus impliquées dans la transduction des stimuli mécaniques. Ainsi, le rôle des intégrines dans la mécanodétection du cisaillement sanguin de l'endothélium a été mis en évidence (Morigi et al., 1995; Shyy and Chien, 2002). De même, les lymphocytes circulants répondent non seulement aux médiateurs de l'inflammation, mais également aux contraintes imposées par le flux (Marschel and Schmid-Schonbein, 2002), là encore, par l'intermédiaire de leur intégrines. Il a aussi été montré que les lymphocytes soumis aux flux sanguins peuvent faciliter la migration et l'extravasation des cellules

tumorales (Slattery and Dong, 2003; Slattery et al., 2005), cette fois-ci par l'intermédiaire des P-sélectines et des ICAMs⁴¹.

Au niveau des points focaux d'adhésion, la moindre altération du niveau des contraintes mécaniques transmises par les intégrines au cytosquelette peut activer une transduction du signal mécanique en cascades de signalisation biochimique (Balaban et al., 2001 ; Nicolas et al., 2004; Wang et al., 2001) et donc influencer potentiellement sur la migration cellulaire (Sheetz et al., 1998).

Ces exemples ne sont bien évidemment que quelques exemples du phénomène de mécanotransduction. Ce phénomène est en réalité bien plus large et couvre toute une gamme de stimuli (topographie, compression, charge, flux, tension) et de réponses très variées.

De plus, la migration cellulaire au sein d'un tissu, d'un organe ou d'un embryon est probablement guidée par des interactions complexes entre signaux chimiques et physiques, prenant en compte non seulement les gradients de molécules chimiques, mais également la rigidité du substrat, l'architecture de la matrice extracellulaire et sa topographie à l'échelle nanométrique, ainsi que les forces générées par le cisaillement du sang et les interactions cellules/cellules.

Mais dans un premier temps, il est important d'analyser de façon indépendante la contribution de ces différents signaux dans la mise en place de la migration cellulaire.

Forces mécaniques traduites par la cellule : modèles biophysiques de mécanotransduction

Une fois le signal détecté et transmis au sein de la cellule, pour modéliser la façon dont le cytosquelette peut transmettre des signaux mécaniques, Ingber a développé depuis le début des années 1985 la théorie de la tenségrité (Ingber, 2003; Wang et al., 1993). Dans son modèle, les microfilaments d'actine et les microtubules forment une structure de tenségrité (de « Tensional integrity ») au sein de la cellule. Ces structures sont stabilisées par une tension continue. Le couple actine/myosine est utilisé pour appliquer des précontraintes à la structure de tenségrité, alors que les microtubules forment l'élément en compression. Les filaments intermédiaires servent quant à eux à procurer une certaine rigidité à la cellule, en s'interconnectant fréquemment avec les réseaux de microtubules et de microfilaments d'actine.

D'autres théories sont basées sur la percolation, décrivant un réseau interconnecté qui permet la transmission rapide d'un bout à l'autre de la cellule (Forgacs, 1995). Dans ce modèle, l'environnement cellulaire entier fonctionne par percolation : le réseau interconnecté de la matrice extracellulaire est relié au réseau du cytosquelette par l'intermédiaire des points focaux d'adhésion, réseau lui-même relié au noyau grâce aux filaments intermédiaires.

⁴¹ Se reporter à l'annexe 2 pour les définitions de ces protéines d'adhérences

5.3 Mise en évidence expérimentale d'un mécanisme de mécanotransduction en réponse à une force mécanique locale

Dans ce contexte, l'utilisation de pinces optiques (Kuo and Sheetz, 1992) ou magnétiques (Bausch et al., 1999; Glogauer et al., 1995) permet d'appliquer localement des stimuli contrôlés et d'analyser ainsi la mécanotransduction cellulaire indépendamment d'autres stimuli extérieurs.

Nous nous sommes ici intéressés au phénomène de mécanotransduction pendant la migration cellulaire. Il est plus aisé de suivre le mouvement cellulaire, tout en appliquant une force mécanique locale par pince magnétique que par pince optique. C'est pour cette raison que nous nous sommes orientés vers un système de pinces magnétiques. Il s'agit d'une expérience de micromanipulation qui, à l'aide de gradients de champs magnétiques puissants et très localisés, permet d'appliquer une force magnétique locale sur des zones précises du corps cellulaire. Le montage consiste en une pointe magnétique canalisant les lignes de champ, guidée par un micromanipulateur associé à un microscope. Nous avons utilisé ce test à l'échelle de la cellule individuelle, chez l'amibe *Entamoeba histolytica* et à l'échelle d'une population de cellules chez l'amibe *Dictyostelium Discoideum*.

Le montage, ainsi que les forces auxquelles sont soumises les cellules diffèrent d'un modèle à l'autre et sont donc décrits plus en détail dans les paragraphes correspondant à chaque modèle.

L'intérêt de l'étude chez *Entamoeba histolytica* est que la migration cellulaire est étudiée indépendamment des récepteurs membranaires classiquement activés dans les études de chimiotaxie. Il est donc possible d'analyser uniquement les modifications intracellulaires déclenchées par la force mécanique. A l'échelle d'une population de cellules, comme chez *Dictyostelium Discoideum*, le modèle est plus complexe car l'interaction cellule-cellule reste ici le signal prédominant. L'intérêt est d'analyser si une perturbation mécanique du système peut modifier le comportement collectif des cellules.

5.4 À l'échelle de la cellule individuelle: *Entamoeba histolytica* comme modèle

5.4.1 Introduction à *Entamoeba histolytica*

En collaboration avec l'Institut Pasteur (U 389), nous avons analysé la réponse en terme de migration de l'amibe *Entamoeba histolytica* lorsqu'elle est soumise à des forces magnétiques faibles et localisées. Notre modèle d'étude, l'amibe *Entamoeba histolytica*, est un parasite motile

responsable de l'amibiase intestinale⁴² (Figure 55). L'amibiase est la troisième maladie parasitaire mondiale, et il a été estimé qu'une personne sur dix était porteuse du parasite (500 millions de personnes).

Entamoeba histolytica existe sous deux états biologiques : (1) sous forme de kiste (de 10 à 15µm contenant 1 à 4 noyaux) résistant aux agressions extérieures et qui permet la transmission du parasite et (2) sous forme de cellules eukaryotes individuelles, forme trophozoïte⁴³ capable de se reproduire et de migrer. Le parasite réside normalement dans le colon, puis, au cours des infections symptomatiques, adhère à la muqueuse intestinale, stimulant la sécrétion de mucus. Par la suite, les amibes adhèrent aux cellules épithéliales à l'aide de leurs molécules de surfaces et sécrètent des enzymes protéolytiques pour rompre la barrière intestinale. Elles peuvent ensuite, dans les cas les plus graves, se disséminer dans d'autres organes tels que le foie. Bien que la plupart des porteurs sont asymptomatiques, environ 34 à 50 millions de personnes souffrent d'amibiase, parmi lesquelles 50 000 à 100 000 en meurt chaque année.

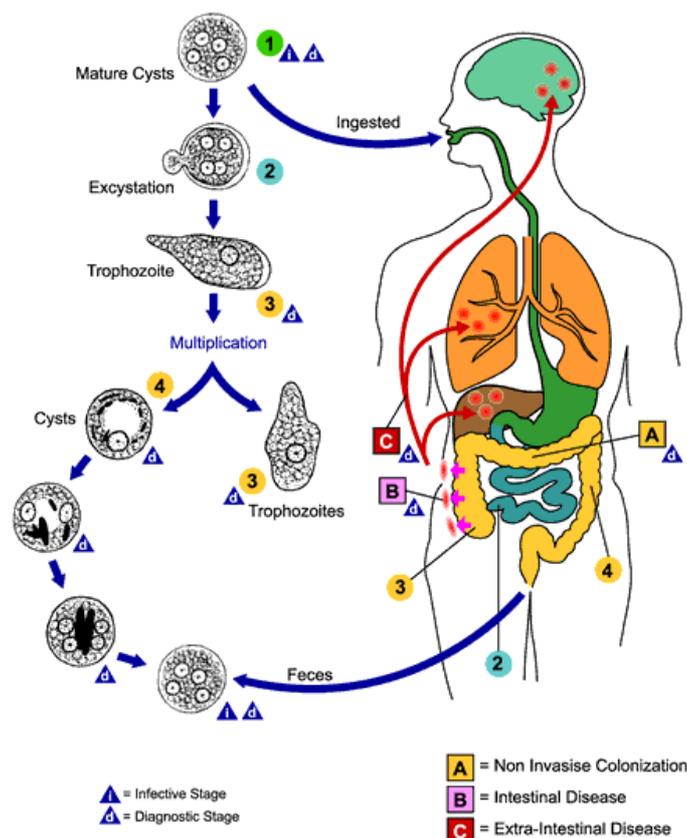


Figure 55. Cycle de l'amibiase

⁴² *Entamoeba histolytica* est un protozaire, c'est-à-dire un micro-organisme formé d'une seule cellule, mobile au moins à un stade de son cycle et qui doit entrer dans un autre organisme vivant pour se reproduire.

⁴³ Le trophozoïte est la forme active et mobile d'un protozaire tel que *Entamoeba histolytica* en dehors de sa forme kystique (c'est-à-dire apparaissant sous la forme d'une coque)

L'amibe a une morphologie proche de celle des lymphocytes activées, avec un avant et un arrière bien définis (Arhets et al., 1995). L'arrière de l'amibe est en fait une structure bien spécifique, appelée uroïde, et qui comporte de nombreux repliement de membrane (Figure 56).

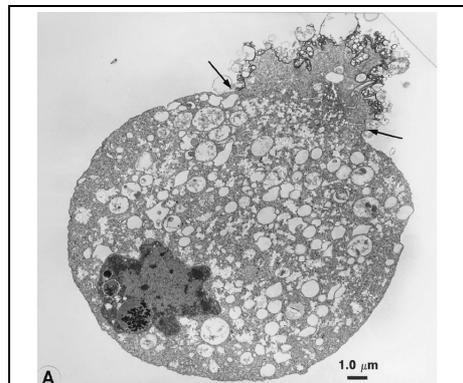


Figure 56.

Cliché de microscopie électronique à transmission d'une amibe ayant formé un uroïde (début marqué par les flèches). L'important repliement de membranes au niveau de l'uroïde est clairement visible. D'après (Arhets et al., 1995).

C'est grâce à cet uroïde que l'amibe, au sein de l'organisme, arrive à échapper au système immunitaire : tout anticorps anti-amibe est automatiquement envoyé vers l'uroïde, avant d'être rejeté par l'amibe qui se sépare petit à petit d'une partie de sa membrane uroïdale (Tavares et al., 2000).

Le cycle de migration de l'amibe est schématisé sur la Figure 57.

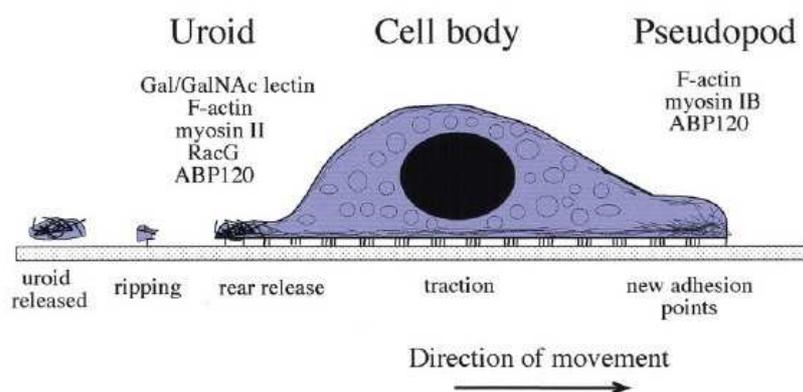


Figure 57

Schéma de la migration de l'amibe polarisée *Entamoeba histolytica*. L'amibe présente un large noyau (cercle noir) et contient de nombreuses vésicules à l'intérieur du cytoplasme (cercles transparents). L'amibe polarisée est caractérisée par deux structures particulières : un pseudopode au niveau de son front avant et un uroïde à son pôle arrière. Les molécules démontrées comme étant prédominantes dans ces deux structures sont répertoriées. Les filaments d'actine, également concentrés au niveau de ces deux structures, sont représentés par des traits fins. Les traits verticaux entre l'amibe et le substrat représente les points d'adhésion. Les différents événements associés à cette migration, ainsi que le rejet de fragments membranaires au niveau de l'uroïde sont indiqués au bas de la figure. D'après (Tavares et al., 2000).

L'amibe migre grâce à l'émission d'une large protrusion membranaire, appelée pseudopode (voir paragraphe 5.1.3). L'émission de ces pseudopodes est principalement gouvernée par des flux cytoplasmiques importants. Pour donner un ordre de grandeur, nous avons vu que les forces développées par ces flux de cytoplasme sont capables de surmonter les forces magnétiques dipolaires et de casser un doublet de phagosomes magnétiques (Figure 58). Elles ont ainsi été estimées bien supérieures à 60 pN.

Ces flux sont responsables du mouvement intracellulaire des billes phagocytées, mouvements étudiés en détail dans l'article présenté dans l'annexe 3 (Magnetohydrodynamics, 2004 pages 327 et 330).

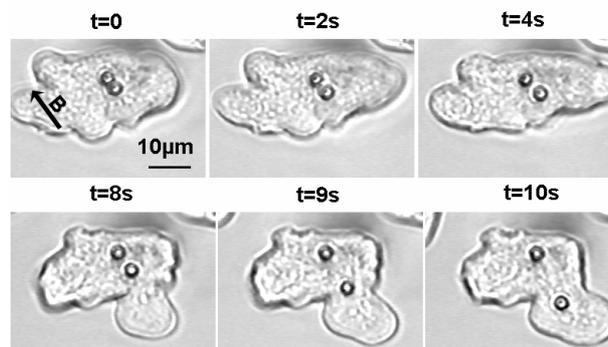


Figure 58.

Illustration des flux de cytoplasme intracellulaires, générant des forces capables de séparer deux phagosomes magnétiques liés par la force magnétique dipolaire. A $t = 0$ (gauche), les deux phagosomes forment une paire dans la direction du champ magnétique. A $t = 2$ s, les phagosomes magnétiques sont séparés et écartés l'un de l'autre.

5.4.2 Intérêt du modèle

L'analyse de la motilité de cette amibe pathogène a deux intérêts majeurs. Premièrement, une telle amibe est un modèle cellulaire intéressant car son comportement migratoire est similaire à celui de certaines cellules du système immunitaire telles que les lymphocytes. On appelle d'ailleurs ce mouvement de façon générique « mouvement amibien ». Il reste cependant simplifié, avec notamment un cytosquelette se limitant principalement à un réseau d'actine. Le deuxième intérêt réside dans l'analyse du mouvement d'*Entamoeba histolytica* en tant que tel. En effet, la virulence de ce pathogène est directement liée à ces capacités migratoires, qui lui permettent, chez l'homme, d'envahir ses organes cibles.

Le but de notre étude était d'analyser si une force exogène locale et relativement faible pouvait modifier la motilité cellulaire par mécanotransduction. Les résultats de cette étude font l'objet d'un article soumis à Journal of Biomechanics, présenté au paragraphe suivant. Le principal résultat réside dans la mise en évidence d'un phénomène de mécanotransduction lorsqu'une force magnétique de 50 pN est appliquée au pôle arrière de la cellule. Dans ce cas, le mouvement

pseudo-aléatoire de l'amibe est modifié en un mouvement dirigé à l'opposé de cette force, avec persistance dans l'orientation de la polarisation de l'amibe. En revanche, l'application d'une force magnétique du même ordre de grandeur au niveau intracellulaire n'induit aucune modification du comportement migratoire de l'amibe. La réponse cellulaire dépend donc du point d'application de la force.

Lorsque la force est appliquée au niveau extracellulaire sur l'arrière de la cellule, nous avons alors mis en évidence le rôle d'une kinase, la PI3K, dans la mise en place de la persistance de la polarisation et du mouvement dirigé. Cette kinase, impliquée par ailleurs dans la migration chimiotactique dans d'autres types cellulaires, apparaît dans cette étude fondamentale dans la mécanotransduction et l'amplification de ce stimulus mécanique extracellulaire en cascade de signaux biochimiques à l'intérieur de la cellule.

5.5 PI3-kinase signaling at the rear pole of *Entamoeba histolytica* regulates magnetically induced mechanotaxis

Soumis pour publication à Journal of Biomechanics

C.Rivière¹, S. Marion², N. Guillén², J-C. Bacri¹, F. Gazeau¹, and C. Wilhelm^{1*}

¹ Pôle Matière et Systèmes Complexes, Université Paris 7 –Denis Diderot, CNRS UMR7057
140, rue de Lourmel, 75015 Paris – FRANCE

² Unité Biologie Cellulaire du Parasitisme – INSERM U389. Institut Pasteur
289, rue du Dr Roux 75724 Paris Cedex 15 – FRANCE

Running title: Migration under local magnetic force

Key words: motility, cell polarization, mechanotransduction

*corresponding author: wilhelm@cr.jussieu.fr

Abstract

In micro-organisms, as well as in metazoan cells, cellular polarization and directed migration are finely regulated by external stimuli, including mechanical stresses. The mechanisms sustaining the transduction of such external stresses into intracellular biochemical signals remain mainly unknown. Using an external magnetic tip, we generated a magnetic field gradient that allows migration analysis of cells submitted to local low intensity magnetic forces (50 pN). We applied our system to the amoeba *Entamoeba histolytica*. Indeed, motility and chemotaxis are key activities that allow this parasite to invade and destroy the human tissues during amoebiasis. The magnetic force was applied either inside the cytoplasm or externally at the rear pole of the amoeba. We observed that the application of an intracellular force did not affect cell polarization and migration, whereas the application of the force at the rear pole induced a persistent polarization and strongly directional motion, almost directly opposed to the magnetic force. This phenomenon was completely abolished when phosphatidylinositol 3-kinase activity was inhibited by wortmannin. This result demonstrated that the applied mechanical stimulus was transduced and amplified into an intracellular biochemical signal, a process that allows such low intensity force to strongly modify the migration behavior of the cell.

Introduction

Cell motility is crucial for many biological processes, such as tissue morphogenesis, leukocyte recruitment to inflammatory sites, angiogenesis, metastasis, and certain parasitic infections. Cell motility is governed by complex interactions between cell surface adhesion molecules, the cytoskeleton, and the extracellular matrix (Kawabata et al., 2001). Basically, crawling cells move in three steps (Serrador et al., 1999). First, the cell becomes polarized

through the extension of a leading protrusion. Then, focal adhesion complexes are established at the leading edge, together with de-adhesion at the trailing edge. Finally, contractile forces pull the rear of the cell towards the leading edge. The mechanical forces generated at the leading edge and at the rear of the cell are mainly due to actin filament dynamics and myosin motor activity (Mogilner and Oster, 2003b). Cell polarization before movement includes a polarized distribution of organelles, microtubules, and the actin cytoskeleton.

Under many physiological conditions, cell migration is guided by a spatial gradient of soluble compounds that interact with cell surface receptors (Devreotes and Janetopoulos, 2003) to induce attractive (Dormann and Weijer, 2003) or repulsive (Nguyen-Ba-Charvet et al., 2004) directed cell motility in a process called chemotaxis. The binding of the chemoattractant to the surface receptors triggers a series of cytoplasmic signaling events that notably activate actin filaments polymerization at the leading edge of the cell. The cell senses the direction of the external gradient by spatially regulating the activity of signaling pathways leading to cell polarization, increase in cell speed, and directed movement.

Furthermore, shape changes also occur when adherent cells actively probe the physical properties of the extracellular matrix and build adhesive complexes through their actin-based contractile machinery. Cells integrate such external mechanical stresses through a process called mechanotransduction, which is notably crucial for tissue integrity. The nature and location of the “mechanosensors” at the cell surface, as well as the activity of the contractile actin fibers attached to the cell adhesion sites, are key issues for cell motility.

Various experimental techniques and theoretical models have been developed to unravel the molecular mechanisms involved in cell mechanotransduction. From a theoretical standpoint, several physical models analyzed motile cell as a complex polymer elastic gel submitted to high deformation (Bottino et al., 2002; Gerbal et al., 2000). Experimentally, maps of traction forces generated by the cell have been obtained using deformable substrata with embedded beads (Oliver et al., 1999) or a micromachined device consisting of micropatterned cantilevers (Galbraith and Sheetz, 1997). By local indentation with an atomic force microscope (Rotsch et al., 1999), it has even been possible to obtain quantitative information on such traction forces to a spatial resolution of 100 nm. In addition to these “passive” techniques, micromanipulation devices have been developed over a wide force range (1 pN-100 nN), allowing controlled force to be applied at the cellular or subcellular level and yielding a good description of cellular responses in high stress conditions. For instance, micromanipulation approaches based on micropipettes (Usami et al., 1992; Vereycken et al., 1995) or centrifugation (Koo et al., 2002; Thoumine and Ott, 1997a) stress the entire cell body. In parallel, shear-flow experiments have been adapted to impose directed cell motion in response to external mechanical stimuli in a more physiological environment (Decave et al., 2003; Wojciak-Stothard and Ridley, 2003). Cell sensing of shear flow modification is indeed particularly important for epithelial cells of vessel wall (Chappell et al., 1998) as well as for neutrophils to start adhesion and transmigration processes (Stein et al., 2003). Furthermore, by means of functionalized beads (coated with specific ligands), optical and magnetic tweezers give the possibility to apply stresses in well-defined and

restricted cell locations (Bausch et al., 1999; Matthews et al., 2004; Schwarzbauer, 1997). Both techniques generate forces in the same range: 1 to 100 pN. The main difference is that in classical optical tweezers set, only one bead at a time can be controlled. In addition, following cells while they are moving requires sophisticated image analysis and demanding feedback to precisely impose the same applied force during the whole experiments length. This technique has mainly been used to study the local response of the plasma membrane and cytoplasm elasticity (Choquet et al., 1997) as well as movements of molecular scale elements such as molecular motors (Kuo and Sheetz, 1993) or the formation of focal adhesion complexes (Galbraith et al., 2002).

Optical and magnetic tweezers techniques have provided new insights cell mechanics (Hu et al., 2004; Puig-de-Morales et al., 2004) and on the interplay between cell adhesion and migration (Galbraith et al., 2002). In particular they allowed a good description of the range of forces generated by the entire cell for adhesion (e.g. few nN (Fukui et al., 2000)), but also the level of applied external forces required to modify the activity of the cytoskeletal and transmembrane adhesion compounds. Indeed, forces as low as 0.4-4 pN have been predicted to be sufficient to induce changes in intracellular biochemical signalings (Huang et al., 2004). These findings suggested that cell mechanics can not be considered as a simple response of an elastic polymer gel, as it also involves a finely tuned biological transduction and amplification pathway of the external stimulus. In particular, external mechanical perturbations have been shown to induce changes in cellular adhesion (Bischofs and Schwarz, 2003), and motility (Lo et al., 2000).

In experiments using micropipettes (1-30 nN) or microplates (30-200 nN) to stress the cell, the applied forces are probably too intense to study such sensitive cell signaling mechanotransduction phenomenon. In addition, these manipulations are often “invasive”, in that they can damage the cell.

Therefore, we used in this study, non invasive, low-intensity and well-controlled forces generated by magnetic tweezers (Bausch et al., 1999) to analyze in more details the processes underlying mechanotransduction and cell directional sensing. To this end, we applied forces in the 10-100 pN range to precise locations of the cell, both inside the cytoplasm and externally at the rear pole of polarized cells. The model we chose was *Entamoeba histolytica*, a protozoan parasite causing human amoebic dysentery, which is characterized by acute tissue invasion and destruction (Stanley, 2003). The invasive trophozoite is a highly motile cell suited to motion analysis (Coudrier et al., 2005). The intracellular organization of *E. histolytica* is simpler than in metazoan cells, because no well-defined endoplasmic reticulum network, and no stable cytoplasmic microtubule network has been yet described. During locomotion the nucleus and intracellular vesicles are dragged along by cytoplasmic fluxes. Furthermore, *E.*

histolytica cells readily engulf human serum-coated magnetic microbeads (Marion et al., 2004a), allowing forces to be applied inside the cell cytoplasm. Alternatively, after coating the beads with human IgG, the binding of the beads at the cell surface can trigger IgG receptor capping and clustering of the beads at the uropod (Guillen, 1996). The latter case allowed us to apply magnetic forces externally at the rear pole of the cell. In absence of the magnetic field, none of these two different labeling methods disturbed normal cell movement.

In this paper, we investigate the effect of an intracellular magnetic force and of a magnetic force applied on the membrane of the uropod, on *E. histolytica* motility in terms of directional sensing and cell polarization. We then try to identify an active mechanotransduction pathway involving the PI3-Kinase, which could allow such low intensity force to be amplified inside the cell. Indeed, as already shown in chemotaxis, PI3K activity is crucial for the transduction of external stimuli into biochemical signals. In this study, we established for the first time an experimental system that allows to study in a more physiologic and dynamic manner, the mechanotransduction process and the molecular mechanisms involved in directional sensing.

Materials and Methods

Cell culture

Entamoeba histolytica strain HM1:IMSS was cultured axenically in TYI-S-33 medium (Diamond et al., 1961) at 37°C. Pre-incubation of cells with 100 nM Wortmanin (Wm) for 20 min was used to inhibit phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-Kinase) activity.

Magnetic labeling

Intracellular magnetic labeling (INTRA experiments) was obtained by incubating *E. histolytica* with 2.8- μm magnetic beads (Dynabeads M-280 tosyl activated; Dynal) coated with total human serum proteins (to activate phagocytosis), for 3 hours at a ratio of 10 beads per ameba.

External magnetic labeling of the cell rear (REAR group) was obtained by triggering *E. histolytica* receptor capping (Arhets et al., 1995; Calderon and Avila, 1986). Cells were incubated for 10 minutes with Dynal magnetic beads (10 beads/ameba) covalently coated with human IgG, which causes the beads to bind to specific cell surface receptors and trigger receptor capping. The beads thereby become concentrated at the rear end of the cell.

As shown in Fig. 1, two different groups were studied depending on the localization of the applied force: (F_{intra} , Fig. 1C, and F_{rear} , Fig. 1E). Each group includes the case when the force is not applied ($F_{\text{intra}}=0$, Fig. 1B and

$F_{\text{rear}}=0$, Fig. 1D) e.g. with no external magnetic field application.

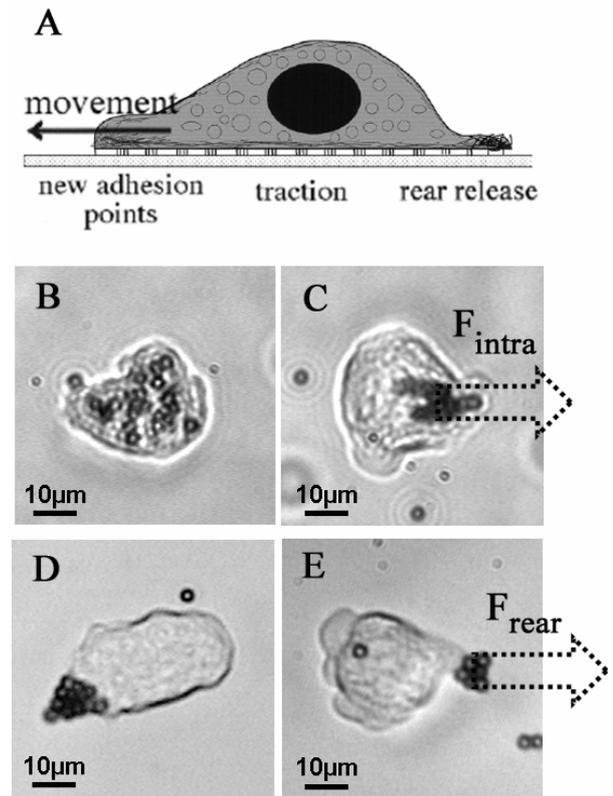


FIG. 1: MAGNETIC LABELING

(A) A schematic view of a polarized ameba cell, with a pseudopod at the leading edge and a uropod at the rear. (B) Typical intracellular magnetic labeling (2.8- μm magnetic beads) with no applied force ($F_{\text{intra}}=0$) and (C) under force application ($F_{\text{intra}}= 50\text{pN}$, dotted arrow). (D) Typical examples of magnetic labeling of the uropod (2.8- μm magnetic beads) with no applied force ($F_{\text{rear}}=0$) and (E) under force application ($F_{\text{rear}}= 50\text{pN}$, dotted arrow).

Incubation chamber and image acquisition

Magnetically labeled amebas were allowed to adhere for 15 minutes at 37°C to home-made anaerobic glass observation chambers consisting of 2 coverslips separated by a 200- μm -thick plastic spacer and filled with culture medium.

Observations were carried out with an inverted microscope equipped with a 37°C thermostated platform. Cell motion was recorded with a CCD camera connected to a video-tape recorder. The films were then digitized and processed with NIH software (Scion Corporation, Maryland, USA) as described below.

Magnetic force application

A thin magnetic tip, creating a strong magnetic gradient was mounted on a micromanipulator. To precisely

calibrate the force experienced by the beads attached to or inside the amebas, within the chamber (and in the horizontal plane observable through microscope), we measured the velocity (V_x) of the magnetic beads as they moved towards the magnetic tip in 80% glycerol/20%water (viscosity $\eta=0.06$ Poiseuille). In the observation window (a 200 μm square), the beads moved with constant velocity and in a direction parallel to the x axis. The magnetic force F_m was thus precisely counterbalanced by the viscous one:

$$(1) \quad F_D = 3\pi\eta DV_x = F_m,$$

showing that the magnetic force experienced by each bead was 5 pN. This magnetic force is created by the magnetic gradient acting on the superparamagnetic beads: $F_m = m(\text{grad}B)_x$, where m is the magnetic moment of the beads. We could thus directly derive the precise magnetic field gradient along the x axis in the observation window, as follows: $(\text{grad}B)_x = 58\text{T/m}$. This gradient is referred below as $\text{grad}B$. About 10 beads are attached to each cell, resulting in a global magnetic force of about 50 pN in both labeling conditions (F_{intra} and F_{Rear}). This local force is of the same order as physiological cellular forces such as the ones developed by molecular motors (5 pN) (Ashkin et al., 1990), or the fibronectin/integrin bond strength (30-100pN) (Lehenkari and Horton, 1999). It is far lower than the integrated traction and contraction forces developed by the cell during migration (nN range) (Galbraith and Sheetz, 1997; Guilford et al., 1995) as well as the adhesion forces concentrated on focal adhesion sites (nN range (Balaban et al., 2001)).

Image analysis

The trajectories and deformations of individual cells during magnetic force application were tracked every 1 s for 500 s, using an in-house NIH image algorithm. Individual amebas were tracked in each condition: when the force is applied: F_{intra} (n=14), F_{Rear} (n=14), $F_{\text{Rear+Wm}}$ (n=12) and with no force application: $F_{\text{intra}}=0$ (n=12), $F_{\text{Rear}}=0$ (n=14), $F_{\text{Rear+Wm}}=0$ (n=6). As illustrated in Fig. 2, for each time (index i), the following parameters were recorded:

- the position $A_i(x_i, y_i)$ of the cell centroid
 - the major axis a_i and the minor axis b_i of the "best equivalent ellipse", which approximates the cell shape.
- To analyze intracellular bead movements, the instantaneous displacement of the barycenter of the group of beads was tracked (x_i, y_i , origin = centroid). The mean displacement ($\langle \Delta x \rangle$) of this bead barycenter relative to the direction of the applied force was computed for several amebas.

Data analysis

For each individual cell, we average over time (index i) instantaneous values, leading to average parameters indicated with brackets ($\langle \rangle_i$).

1- Cell locomotion parameters:

Four parameters were used to describe locomotion (Fig. 2A):

- The average instantaneous velocity $\langle V^{\text{inst}} \rangle$ (time interval: 1 s).
- The coefficient of movement efficiency (CME), defined

as $CME = \frac{L}{L_t}$, where L , the net cell displacement, is

the distance, "as the crow flies", covered by the cell during 500 seconds, and L_t is the total distance covered by the cell, calculated as the sum of the one-second distances.

CME is a normalized measure of the straightness of the trajectories (Korohoda et al., 1997). CME ranges from 0 (no displacement) to 1 (straight displacement in the same direction).

- The average of cosine γ , $\langle \cos \gamma \rangle = \langle \cos \gamma_i \rangle_i$, where γ_i $[0, 360^\circ]$ is the directional angle between the x axis

(parallel to the force) and a vector $\overrightarrow{A_0 A_i}$, A_0 and A_i

being the initial position and each subsequent position, respectively. This average cosine describes the global direction of motion (from starting point A_0) and has a value of +1 for a cell moving towards the force, -1 for a cell moving away from the force, and 0 for random movement (Djamgoz et al., 2001; Korohoda et al., 1997).

- The average of cosine α , $\langle \cos \alpha \rangle = \langle \cos \alpha_i \rangle_i$, where α_i is the instantaneous directional angle $[0, 360^\circ]$, defined as the directional angle between the x axis (parallel to the

force) and a vector $\overrightarrow{A_i A_{i+1}}$, A_i and A_{i+1} being two

successive positions of the cell centroid. This average cosine describes the instantaneous direction of the cell and is +1 for a cell moving towards the magnetic gradient, -1 for a cell moving against the magnetic gradient, and 0 for random movement (Djamgoz et al., 2001; Korohoda et al., 1997).

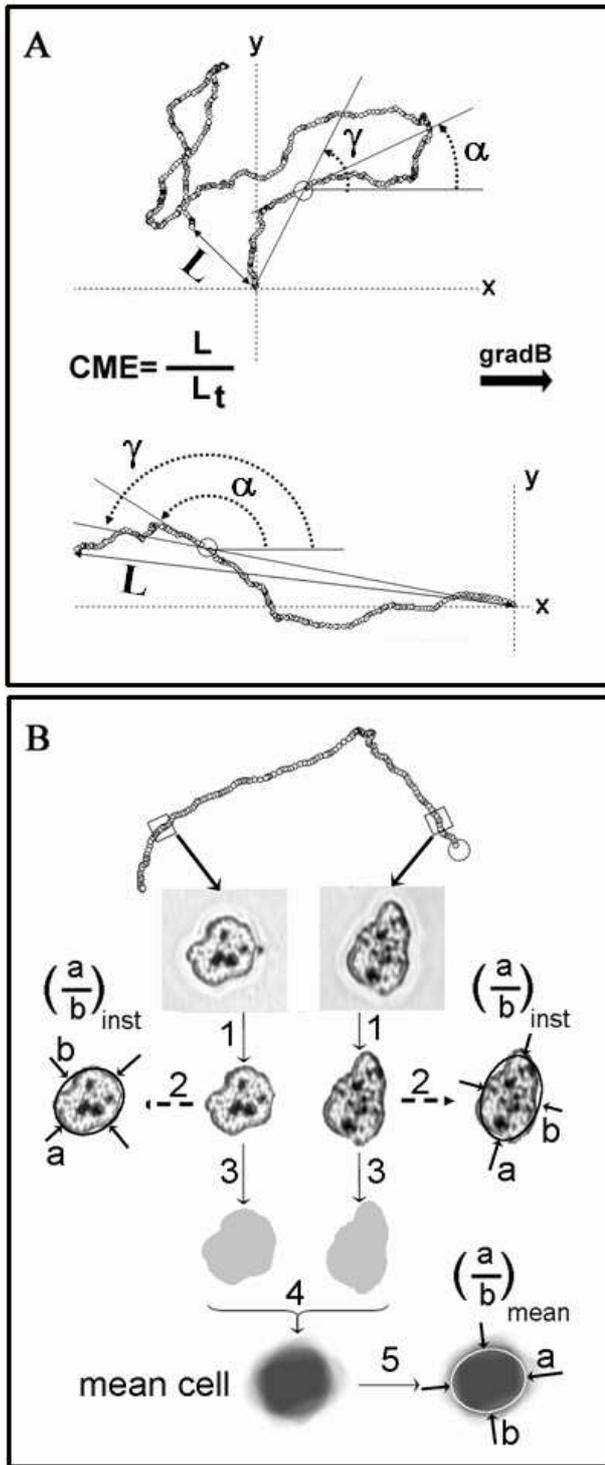


FIG. 2: LOCOMOTION AND POLARIZATION ANALYSIS

Image analysis of amebic cell migration. The movement of individual cells was tracked every second for 500 s. The images were then analyzed to compute locomotion parameters (A) and polarization parameters (B). (A) Two cell trajectories are represented. For each, the net distance covered by the cell between the first and last point (L) and total length of the cell trajectory (L_t) were calculated. The Coefficient of Movement Efficiency (CME) was calculated directly as the ratio between the net displacement L and the

total distance L_t covered by the cell. At each point the angles γ and α were computed. Angle γ is the angle between the direction of the force ($\text{grad}B$) and a vector, A_0 and A_i being the initial position and each subsequent position, respectively. Angle α is the directional angle between the axis parallel to the force and a vector, A_i and A_{i+1} being two successive positions of the cell centroid. (B) Cell polarization analysis is illustrated for a given cell movement. For each position of the cell, the extracellular medium was cleared (1), the instantaneous aspect ratio a/b_{inst} of the ellipse equivalent was measured (2), the cell cross-sectional surface area was normalized to $\pi(14 \mu\text{m})^2$ and was filled with gray levels 256/500 (3). The 500 filled surfaces were then fused (4). The center of the mean cell thus obtained is black (gray level 256) and the shades of gray reveal shape fluctuations. The aspect ratio a/b_{mean} of the equivalent ellipse (white line) was finally calculated (5).

2- Cell polarization parameters

Image analysis (Fig. 2B) was used to compute polarization parameters for individual ameba.

First, the external medium was removed (Fig. 2B, stage 1) and the instantaneous aspect ratio $(a_i/b_i)_{\text{inst}}$ of the equivalent ellipse was measured (Fig. 2B, stage 2). The cell surface was then normalized to $a_0 = \pi(14 \mu\text{m})^2$ and filled with gray level 256/500 (Fig. 2B, stage 3). The 500 filled surfaces were then fused, giving an image of the mean cell shape (Fig. 2B, stage 4). The center of the mean cell thus obtained is black (gray level 256), with decreasing gray values corresponding to changes in cell shape and orientation. This mean shape was used to calculate the mean aspect ratio a/b_{mean} of the equivalent ellipse (Fig. 2B, stage 5).

The polarization of individual ameba was then described by the two following parameters:

- The average value $\langle a/b_{\text{inst}} \rangle = \langle (a_i/b_i)_{\text{inst}} \rangle_i$ of the instantaneous aspect ratio major/minor axis (Fig. 2, stage 2) calculated at each time interval. This parameter is a measure of the cell's instantaneous deformation capacity and is related to pseudopod extensions. The higher the value of $\langle a/b_{\text{inst}} \rangle$, the more extended the pseudopods are.

- The mean aspect ratio a/b_{mean} , corresponding to the mean cell contour (Fig. 2, stage 5). A sphere has a ratio a/b of 1, while an elongated shape has a ratio larger than 1. This parameter reflects the persistence of the orientation of polarization. Indeed, if the cell extends pseudopods in several directions, the mean cell contour (averaged from the 500 frames) would be close to that of a sphere. In contrast, this value increases when the cell remains polarized in the same orientation; in other words, the higher the a/b_{mean} ratio, the more persistent the orientation of polarization (during the time interval of the experiment: 500s).

Results

The *E. histolytica* trophozoites are highly motile and adherent cells that explore their environment, extending frequently pseudopods in nearly random directions (Coudrier et al., 2005). First we examined whether the labeling technique consisting on magnetic beads present inside the cytoplasm or at the rear pole of the cell induced change in cell motility. To this end, we calculated the polarization and migration parameters of the magnetic labeled ameba compared to non-labeled ones. We observed that in the absence of the magnetic gradient application, none of the two different magnetic labeling approaches affected cell locomotion or polarization parameters (data not shown). This result demonstrates that the labeling method used in this study is non-invasive for the cell, a parameter that appeared to us as a crucial prerequisite to study the mechanotransduction mechanisms after application of the magnetic force to the amebas.

Intracellular force application does not affect cell movement

We observed that amebas intracellularly labeled with the beads did not migrate up the magnetic gradient generated by the external magnetic tip (Fig. 3). Fig. 3A and Fig. 3B show representative trajectories of two amebas, in the absence and in the presence of the applied magnetic field, respectively. No qualitative differences were observed. We confirmed this observation by computing the locomotion and polarization parameters for 12 different labeled amebas in control conditions ($Fintra=0$) and for 14 labeled amebas submitted to a magnetic field gradient ($Fintra$). The coefficient of movement efficiency (CME, Fig.3C) displayed a value of 0.2 in both conditions, corresponding to a weak cell directionality. Similarly, the near-zero values of both directional parameters $\langle \cos \gamma \rangle$ and $\langle \cos \alpha \rangle$, (Fig. 3D and 3E respectively), and the lack of correlation between angles γ and α (Fig. 3F), confirmed the stochastic nature of the trajectories. Therefore, the

application of a force inside the ameba cytoplasm did not induce changes in cell motility.

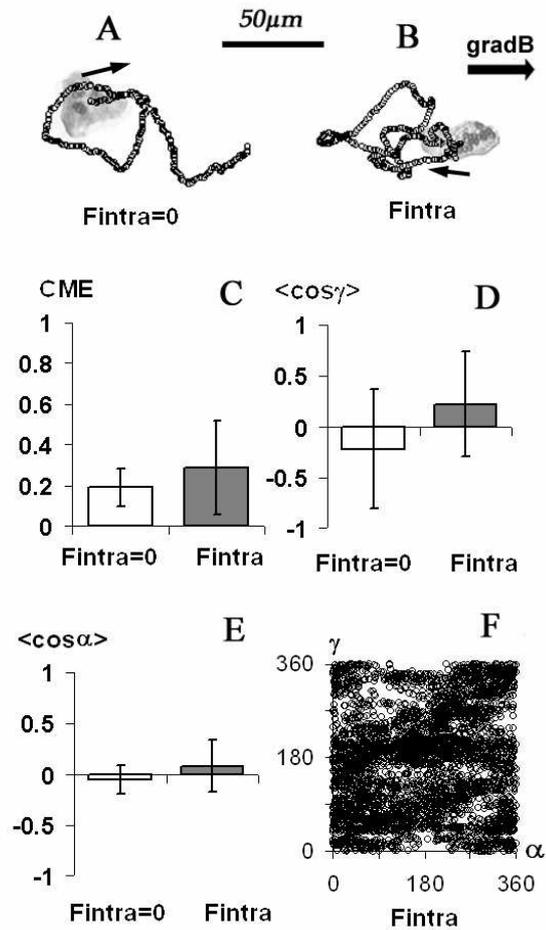


FIG. 3: INTRACELLULAR MAGNETIC LABELING, LOCOMOTION ANALYSIS

Examples of cell trajectories for intracellular labeling without an applied force ($Fintra=0$ (A)) and under force application ($Fintra$ (B)) are given. The direction of the magnetic field gradient ($gradB$) is indicated. The first image of each corresponding cell is superimposed with the trajectory, indicating the starting position. Arrows indicates initial trajectory direction. (C-E): Mean parameters describing the movement of individual cells under intracellular force application ($Fintra$), with its respective control ($Fintra=0$). Error bars represent amebas intra-group standard deviation. (C): Mean value for the Coefficient of Movement efficiency (CME). (D) Mean value for $\langle \cos \gamma \rangle$ and (E) Mean value for $\langle \cos \alpha \rangle$. (F): At each point of cell trajectory and for each analyzed cell, the angles (α, γ) are plotted.

Regarding cell polarization, we examined changes in cell shape calculating the value $(a_i/b_i)_{inst}$ corresponding to the instantaneous cell shape of one individual ameba at the instant i , and the mean shape of the same ameba, obtained by averaging all the instantaneous shapes during 500 s (Fig. 4A, left : control condition and Fig. 4B, right:

ameba submitted to a magnetic field gradient). For all the ameba examined within the INTRA group, we obtained a similar degree of instantaneous deformability: $\langle a/b_{inst}(F_{intra}) \rangle = 1.44 \pm 0.16$ versus $\langle a/b_{inst}(F_{intra}=0) \rangle = 1.49 \pm 0.07$ (Fig. 4C). This indicated that instantaneous deformation (e.g. pseudopod extension) was not affected when the magnetic force is applied inside the cytoplasm of the cell. Similarly, the mean cell deformability value examined over time (a/b_{mean}) was close to 1 for all the examined amebas (see Fig. 4B for typical examples and Fig. 4D for the mean values: $a/b_{mean}(F_{intra}) = 1.20 \pm 0.16$ versus $a/b_{mean}(F_{intra}=0) = 1.18 \pm 0.10$). This value defines that the mean cell shape corresponds to a sphere. This implies that the orientations of the extended pseudopods during the 500-s observation period canceled one another out, and that the amebas therefore showed no persistent in one particular orientation for its polarization.

To confirm that the intracellular force was indeed operative despite the lack of effect, we tracked the cytoplasmic displacement of the magnetic beads inside several amebas under application of the magnetic force. The magnetic bead barycenter inside control amebas showed a diffuse motion and was located close to the cell centroid ($\langle \Delta x \rangle = 0.3 \pm 0.7 \mu\text{m}$). When the magnetic force was applied, this diffuse group of beads moved significantly towards the magnetic source ($\langle \Delta x \rangle = 2.1 \pm 0.5 \mu\text{m}$). Although this deviation did not exceed the bead diameter ($2.8 \mu\text{m}$), it demonstrated that the force was active inside the cell. This low deviation and the lack of effect on ameba migration could be explained by the fact that the low intensity applied magnetic force (50 pN) is efficiently counterbalanced by mechanical forces generated by the cytoplasm fluxes occurring during ameba random movement. The importance of these cytoplasm fluxes was further illustrated by the observation that a doublet of phagosomes can spontaneously be separated inside a motile ameba. To separate such a pair of magnetic phagosomes, the active force F_{active} acting on each phagosome must overcome the cohesive magnetic dipolar force $F_{dipolar}$. We calculated this force, for magnetic phagosomes submitted to a 0.1-T magnetic field, as:

$$(2) \quad F_{active} \geq F_{dipolar} = \frac{\mu_o}{4\pi} \frac{6m^2}{d^4} = 63 \text{ pN},$$

where m is the phagosome magnetic moment $m(0.1\text{T}) = 8.10^{-14} \text{ A}\cdot\text{m}^2$ and $d = 2.8 \mu\text{m}$ is the phagosome diameter. The traction exerted by the external magnetic field, which did not exceed 50 pN, was thus not sufficient to stress the cell and to influence cell movements.

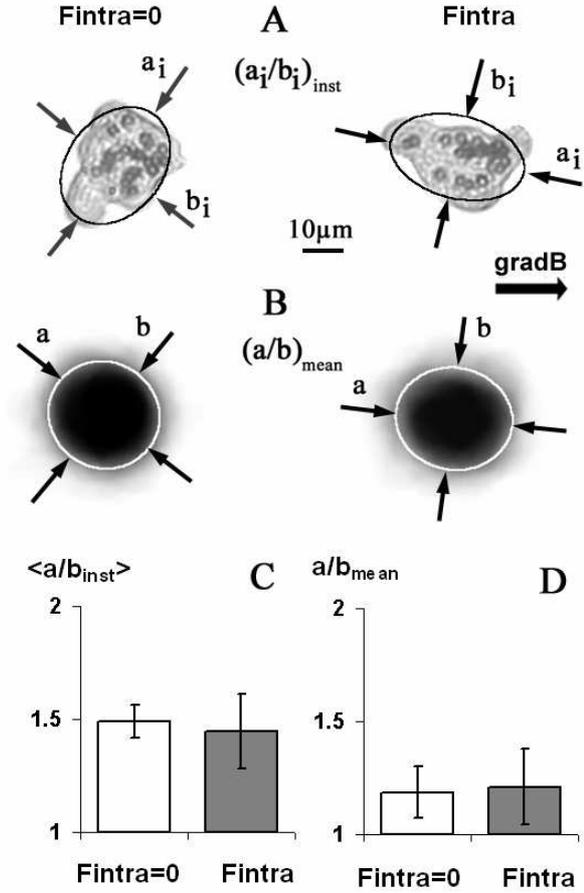


FIG. 4: INTRACELLULAR MAGNETIC LABELING, POLARIZATION ANALYSIS

(A) Illustrations of instantaneous polarization analysis of cells at time i (stage 2 in Fig.2). A typical cell example is given for intracellular labeling without an applied force ($F_{intra}=0$, left image) and under force application (F_{intra} , right image). $(a_i/b_i)_{inst}$ is calculated from the shape of the cell at each position during tracking (stage 2 in Fig.2) – a_i and b_i being the major and minor axes, respectively-. (B) Illustrations of mean polarization analysis of cells $(a/b)_{mean}$, which was obtained by fusing all the instantaneous shapes. A typical cell example is given for intracellular labeling without an applied force ($F_{intra}=0$, left image) an under force application (F_{intra} , right image). The shape of the equivalent ellipse is superimposed (white line) on the fused mean cell. The corresponding major and minor axes, a and b , give parameter $(a/b)_{mean}$. This parameter gives a measure of the persistence of the orientation of cell polarization. (C-D): Average parameters describing the polarization of individual cells under intracellular force application (F_{intra}), with its respective control ($F_{intra}=0$). Error bars represent amebas intra-group standard deviation. (C) Average instantaneous cell polarization $\langle a/b_{inst} \rangle$. (B) Mean aspect ratio a/b_{mean} .

Extracellular force application at the rear pole induces repulsive mechanotaxis

Incubation of amebas with human immunoglobulin-coated magnetic beads triggers a receptor capping phenomenon, leading to the adhesion of roughly 10 beads per cell at the uropod. Subsequent application of the magnetic field gradient markedly modified both cell directionality and polarity. As illustrated in Fig. 5A, amebas which were not submitted to the magnetic field, displayed stochastic trajectories, confirming that magnetic labeling of the uropod did not itself perturb cell motility. By contrast, amebas submitted to the local magnetic force at their rear pole displayed highly directed linear displacement (Fig. 5B). This effect was quantified by calculating locomotion and polarization parameters (14 cells in each group). When the force was applied, the net displacement of the cell increased nearly three-fold, leading to a marked increase in movement efficiency: $CME (F_{Rear})=0.77\pm 0.16$ versus $CME (F_{Rear}=0)=0.3\pm 0.2$ (Fig. 5C).

Intriguingly, the calculated parameters average cosine γ and average cosine α displayed both a value close to -1 ($\langle \cos \gamma \rangle = -0.9 \pm 0.1$, $\langle \cos \alpha \rangle = -0.7 \pm 0.1$), demonstrating that the cells moved away from the magnetic source (Fig. 5D and 5E, respectively). Even if the cells still occasionally changed the direction of their displacement (disparity of α , Fig. 5F), the overall direction remained opposite to the applied force (γ value around 180° , Fig. 5F). Importantly, although the application of the force induced a preferential direction of cell migration, the cell velocity by contrast was not modified: $\langle V^{inst}(1s)(F_{Rear}) \rangle = 0.7 \pm 0.2 \mu\text{m/s}$, versus $\langle V^{inst}(1s)(F_{Rear}=0) \rangle = 0.6 \pm 0.1 \mu\text{m/s}$.

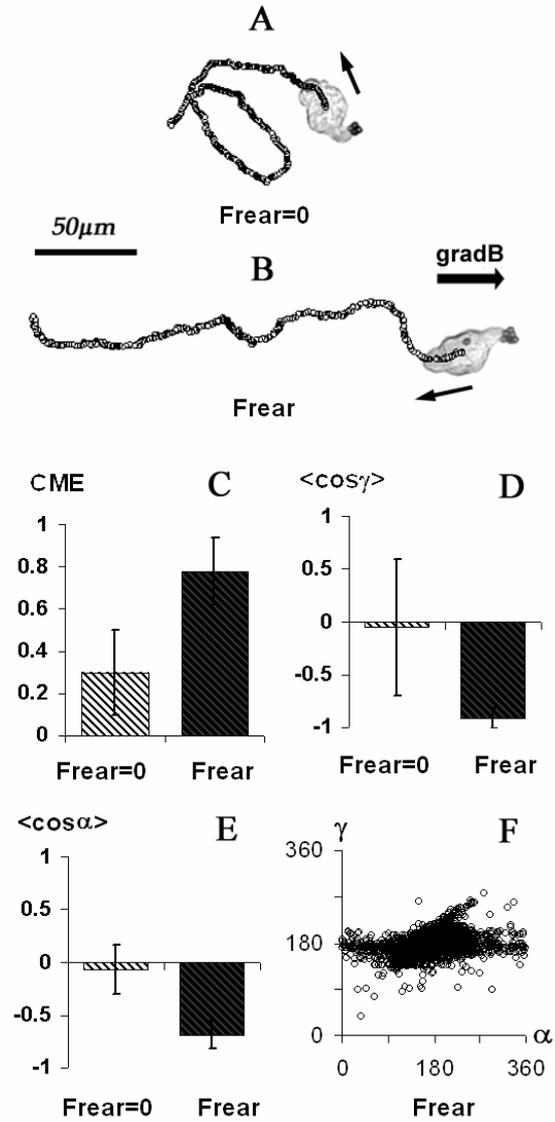


FIG. 5: EXTRACELLULAR MAGNETIC LABELING, LOCOMOTION ANALYSIS

Examples of cell trajectories for uropod labeling without an applied force ($F_{Rear}=0$ (A)) and under force application (F_{Rear} (B)) are given. The direction of the magnetic field gradient ($gradB$) is indicated. The first image of each corresponding cell is superimposed with the trajectory, indicating the starting position. Arrows indicates initial trajectory direction. (C-E): Mean parameters describing the movement of individual cells when force is applied at the rear pole of the cell (F_{Rear}), with its respective control ($F_{Rear}=0$). Error bars represent amebas intra-group standard deviation. (C): Mean value for the Coefficient of Movement efficiency (CME). (D) Mean value for $\langle \cos \gamma \rangle$ and (E) Mean value for $\langle \cos \alpha \rangle$. (F): At each point of cell trajectory and for each analyzed cell, the angles (α, γ) are plotted.

Interestingly, the application of the force to the rear pole of the cell did not modify the instantaneous deformation capacity of the ameba. Fig. 6A shows an example of one

instantaneous shape in the presence and absence of the applied magnetic force. This result was confirmed by calculating the averaged values for 14 ameba in the REAR group: $\langle a/b_{inst}(F_{Rear}) \rangle = 1.58 \pm 0.2$ versus $\langle a/b_{inst}(F_{Rear}=0) \rangle = 1.47 \pm 0.14$ (Fig. 6C). By contrast, the mean aspect ratio value calculated over time was increased after application of the magnetic force at the rear pole of the ameba (see Fig. 6B for an example of the mean shape of one ameba tracked during 500 s, in the presence and absence of the applied magnetic force): $a/b_{mean}(F_{Rear}) = 1.38 \pm 0.19$ versus $a/b_{mean}(F_{Rear}=0) = 1.17 \pm 0.10$ (Fig. 6D). Under force application at the rear pole of the cell, the mean cell shape no longer corresponds to a sphere but to an ellipse and therefore demonstrate that the application of a force at the uropod induced a preferential direction in the orientation of cell polarization. Furthermore, pseudopods are permanently extended in the direction opposite to the magnetic source.

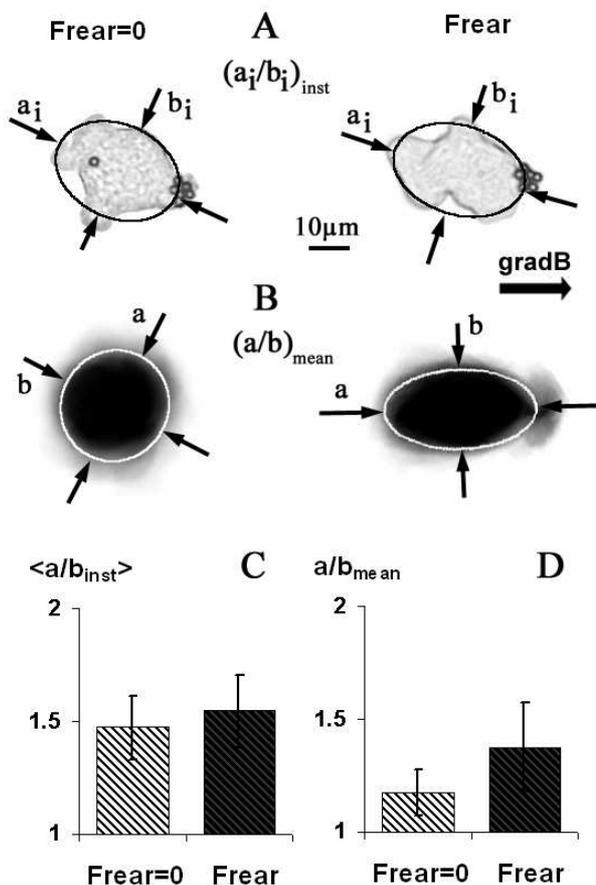


FIG. 6: EXTRACELLULAR MAGNETIC LABELING, POLARIZATION ANALYSIS

(A) Illustrations of instantaneous polarization analysis of cells at time i (stage 2 in Fig. 2). A typical cell example is given for uropod labeling without an applied force ($F_{Rear}=0$, left image) and under force application (F_{Rear} , right image). $(a_i/b_i)_{inst}$ is calculated from the shape of the cell at each position during tracking (stage 2 in Fig. 2) — a_i and b_i being the major and minor axes, respectively—. (B) Illustrations of mean polarization analysis of cells $(a/b)_{mean}$, which was

obtained by fusing all the instantaneous shapes. A typical cell example is given for uropod labeling without an applied force ($F_{Rear}=0$, left image) and under force application (F_{Rear} , right image). The shape of the equivalent ellipse is superimposed (white line) on the fused mean cell. The corresponding major and minor axes, a and b , give parameter $(a/b)_{mean}$. This parameter gives a measure of the persistence of the orientation of cell polarization. (C-D): Average parameters describing the polarization of individual cells when the force is applied at the rear pole of the cell (F_{Rear}), with its respective control ($F_{Rear}=0$). Error bars represent amebas intra-group standard deviation. (C) Average instantaneous cell polarization $\langle a/b_{inst} \rangle$. (B) Mean aspect ratio a/b_{mean} .

Mechanotransduction of the force applied at the cell rear pole depends on PI3K activity

In view of this marked cellular response to the weak applied magnetic force, we hypothesized that the mechanical stress was likely transduced and amplified intracellularly into a biological signaling cascade. This signaling cascade induces the observed persistent orientation of the dominant pseudopod (Fig. 6D, a/b_{mean}) and thus the directional sensing phenomenon. During chemotactic motility, the PI3-Kinase (PI3K) has been described as a crucial compound for cell directional sensing by translating the external chemical gradient into a steep intracellular gradient resulting in cell polarization (Merlot and Firtel, 2003; Sadhu et al., 2003). We therefore used wortmanin, a drug that inhibits PI3K activity, to test its potential role in the mechanotaxis phenomenon we observed. The movements of 6 amebas without applied magnetic force, and of 12 amebas under the application of the magnetic force to their uropod, were tracked after pre-incubation with wortmanin (Wm) of cells magnetically labeled at the uropod.

As shown in Fig. 7, when the magnetic force was applied in the presence of Wm, the three major locomotion parameters calculated previously (CME (Fig. 7A), $\langle \cos \alpha \rangle$ (Fig. 7B) and $\langle \cos \gamma \rangle$ (data not shown)) became similar to control values. Interestingly, even in the presence of Wm, pseudopod extension (represented by average instantaneous cell deformability $\langle a/b_{inst} \rangle$, in the presence or in the absence of the magnetic field was comparable to non treated cell: $\langle a/b_{inst}(F_{Rear+Wm}) \rangle = 1.36 \pm 0.17$, versus $\langle a/b_{inst}(F_{Rear+Wm}=0) \rangle = 1.36 \pm 0.27$ in the absence of the magnetic field, and $\langle a/b_{inst}(F_{Rear}) \rangle = 1.58 \pm 0.2$ in the absence of Wm (Fig. 7C). This demonstrates that the ameba exhibited the same migrating behavior as previously observed, extending pseudopods frequently in random directions.

By contrast, Wm abrogated the persistence in the orientation of polarization observed when the magnetic force was applied to the cell rear as the mean aspect ratio a/b_{mean} fell to a value close to 1 (Fig. 7D, $a/b_{mean}(F_{Rear+Wm}) = 1.07 \pm 0.03$ compared to $a/b_{mean}(F_{Rear}) =$

1.38 ± 0.19 measured in the absence of Wm). This data show that the presence of Wm inhibited the preferential direction of cell polarization induced by a magnetic force applied to the cell rear. These results also demonstrate that a low, local mechanical stress applied to the ameba is translated intracellularly into a biochemical signal. In addition, we can conclude that the observed mechanotransduction requires the PI3Kinase activity to allow directional sensing in *E. histolytica*.

Discussion

The main purpose of this study was to investigate in the ameba *E. histolytica*, the cellular polarization and locomotion responses to weak (50 pN), well-defined locally applied forces. By quantitative analysis of cell motility parameters, we found that a magnetic force applied inside the cytoplasm did not affect cell migration, whereas the same force applied externally to the rear pole of the cell induced a persistent orientation of polarization and, consequently, a sustained directional displacement resembling chemotaxis.

Cytoplasmic fluxes overcome intracellular magnetic force: no evidence of intracellular mechanosensing

Theoretical predictions of cell motion have been previously made based on a model of an adhesive elastic gel moving on a solid substrate (Joanny et al., 2003). In this model, the gel polymerizes at the leading front and depolymerizes at the rear. The motion results then from the competition between a self-generated swelling gradient and the adhesion to the substrate. This model predicts that the effect of an external force applied on the moving gel depends on where precisely the force is applied. Inside the adherent gel, representing the cytoplasm of a living cell, no effect occurs until the applied force is sufficient to break the adhesive links between the gel and the substrate. In our assay, the exogenous magnetic force that we applied inside the cell is low (about 50 pN) and had no effect on cell motility or cell polarization. Notably, the force is three orders of magnitude weaker than intracellular forces generated by contractile mechanisms involved in cellular adhesion (1-20 nN) (Tan et al., 2003). Those cellular adhesion forces are governed mainly through focal adhesion sites, where transmembrane protein complexes "sense" the physical properties of the local external environment (Bershadsky et al., 2003; Chen et al., 2004; Nicolas et al., 2004; Wozniak et al., 2004). This theoretical model can partly explain our findings. Indeed, the force that we applied inside the cell appears too low to break cellular adhesion links with the substrate and thereby should not have any effect on the migration of *E. histolytica*.

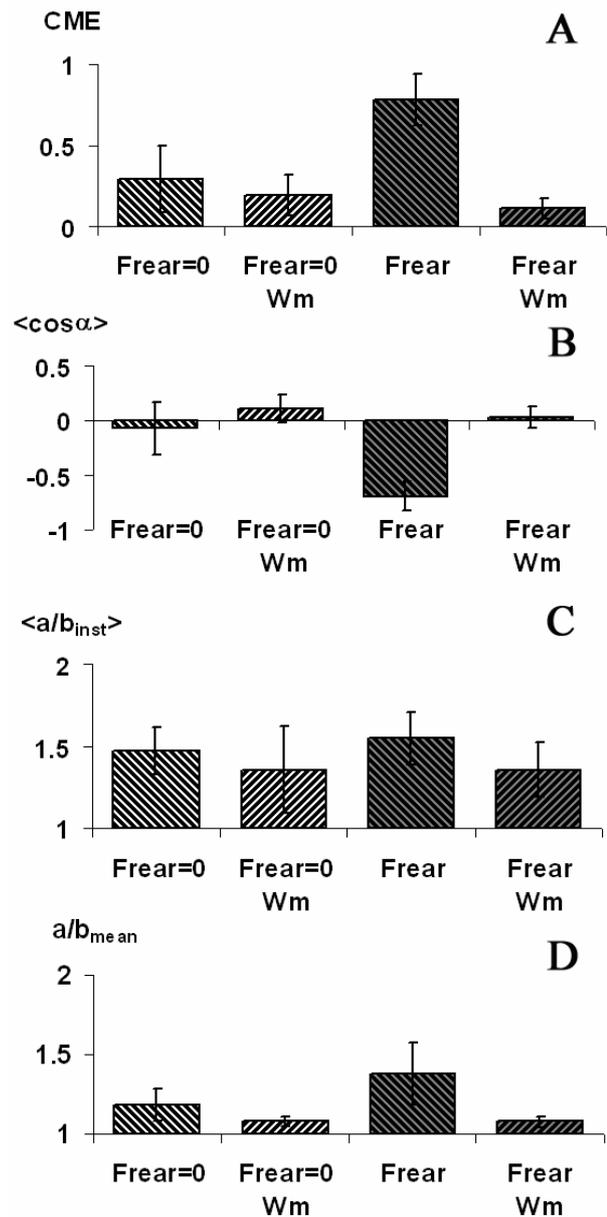


FIG. 7: EXTRACELLULAR MAGNETIC LABELING, LOCOMOTION AND POLARIZATION ANALYSIS UNDER THE EFFECT OF THE DRUG WORTMANNIN.

(A) Comparison of cell movement and cell polarization when the force was applied to the uropod without wortmannin (F_{rear}) and with wortmannin ($F_{rear+Wm}$), and the respective controls ($F_{rear}=0$ and $F_{rear+Wm}=0$). **(A-B)**: Parameters describing directionality (CME **(A)**, and $\langle \cos \alpha \rangle$ **(B)**, as described in Fig. 5). **(C-D)**: Parameters describing polarization (instantaneous aspect ratio $\langle a/b_{inst} \rangle$ **(C)** and mean aspect ratio a/b_{mean} **(D)** as described in Fig.6). Error bars represent amebas intra-group standard deviation.

An alternative explanation could be that the low magnetic force we applied is efficiently counterbalanced by the forces generated by cytoplasm fluxes during ameba random migration. This hypothesis is emphasized by the

observation of the spontaneous disruption of phagosome pairs during cell movement. In conclusion, although we demonstrated that the intracellular magnetic force we applied inside the cell was effective, it did not trigger any effect on ameba migration. Moreover, even if extracellular physical forces have been shown to trigger intracellular signaling cascades, to our knowledge, there is no evidence of intracellular mechanosensing. This is also our finding with our intracellular magnetic force.

Mechanorepelling effect after the application of an extracellular force

By contrast, we observed marked changes in *E. histolytica* migration when the magnetic force was applied externally to the rear pole of the cell. The ameba exhibited a persistent polarization and a strongly directional movement away from the magnetic source.

By opposition to the case when the force is applied inside the gel, the theoretical model of (Joanny et al., 2003) predicts that if the external force is applied to the rear of the gel and particularly opposing the direction of gel motion, it should increase the actin filament depolymerization rate and thus increase the gel velocity, creating a so called “negative” motility. In a similar way, part of the results regarding the induction of directed motion of *Dictyostelium discoideum* under shear-flow have also been interpreted by a physical model where the plasma membrane suffers a “peeling process” above a force threshold application related to cell adhesion forces (Garrivier et al., 2002). Our experimental findings could be partly explained by these physical models, because we also found that *E. histolytica* response to the application of a magnetic force strongly depended on where the force was applied, and was effective only after application at the rear pole of the cell.

However, the force applied in our experiments (50 pN) is far lower than the integrated force developed by the migrating cells, which are in the nanoNewton range (Galbraith and Sheetz, 1997). Other evidence of such high intensity force generated by the cell during migration is given by the observation of cells capable to move over long distances against a flow applying forces in the 10-100pN range (Decave et al., 2003). Therefore, we hypothesized that the “negative” effect of the force on the direction of ameba migration cannot be explained without a mechanism where the external mechanical stimulus is transduced and amplified into an intracellular biochemical signal, which in turn stimulates a persistent cell polarization.

Extracellular mechanosensing of low force intensity (50pN) at the rear pole of the cell: implication of PI3K

We focused our analysis on the implication of the PI-3 Kinase in the putative mechanotransduction phenomenon as this compound has been shown to play a fundamental role in directional sensing and cell polarization (Devreotes and Janetopoulos, 2003) from the ameba *D. discoideum* to the neutrophils (Servant et al., 2000) or fibroblasts (Haugh et al., 2000).

During chemotaxis, the local amount of PIP₃, synthesized by PI3K, has indeed been reported to be the first signaling agent creating a steep intracellular gradient allowing F-actin polymerization to be activated locally at the pole of the cell facing the chemoattractant gradient. PI3K has also been shown to play an essential role to maintain the direction of cell migration, e.g. the persistence of polarization, towards the external gradient in *D. discoideum* and in leukocytes (Sadhu et al., 2003). Therefore, PI3K and its lipid product PIP₃ appear to be the cell’s compass that identify and determine the orientation of cell asymmetry that create directed movement (Rickert et al., 2000; Weiner, 2002). Furthermore, the evidence that PI3K activity is involved in mechanotransduction has also been highlighted in shear-flow studies on *D. discoideum* (Decave et al., 2003) and on endothelial cells (Urbich et al., 2002). Its role in cardiovascular physiology, where mechanical deformation is a key issue, and in related diseases, has also been reported (see (Oudit et al., 2004) for a review).

We therefore tracked the migration of *E. histolytica* trophozoites labeled with magnetic beads at their rear pole in the presence of wortmanin, a well-known compound that inhibits PI3K activity. We observed that wortmanin completely inhibited both the persistent polarization and directed movement in response to the applied magnetic force. The cells still move as if no force were applied, exploring the surrounding environment extending pseudopods in random directions. Therefore, the sensing of the external magnetic force was completely lost. This data demonstrated that PI3K appears also crucial for the intracellular transduction of the external mechanical stimulus. The initial mechanosensors as well as the signaling pathway involved in this PI3K-mediated mechanotransduction are still unknown. Nevertheless, our experimental system appears as a unique tool to investigate upstream effectors of the PI3K involved in the observed directional sensing as well as in the mechanisms involved in the persistence of pseudopod extension.

Mechanotaxis: distinctions between directional sensing and cell polarization

During chemotaxis, the chemo-attractant receptors are uniformly localized around the cells. Preferential receptor

occupancy at the pole of the cell facing the gradient triggers locally the activation and amplification of signaling pathways involved in directional sensing and cell polarization. First, directional sensing of the gradient is mediated by activation of PI3K that allows the creation of a steep intracellular gradient of PIP3. Directional sensing of the external stimulus is followed by cell polarization characterized by the local activation of F-actin nucleation at the pole of the cell facing the gradient, resulting in faster movement. This pathway involved key molecules such as the Rho-family GTPases Cdc 42 that relay the signal to the cytoskeleton, through the Wasp/Scar-Arp2/3 pathway activation. Several feed-backs loops are then involved to amplify and maintain the local Rho-GTPase activation and subsequent membrane protrusion at one pole of the cell (see (Merlot and Firtel, 2003; Van Haastert and Devreotes, 2004) for a review). More importantly, directional sensing is a process independent of cell polarization, as it was shown that cell are able to sense the external chemoattractant gradient even in the presence of drugs that inhibit F-actin polymerization.

During chemotaxis, changes in the instantaneous cell shape can be used as a read-out for the activity of the actin polymerization dynamics. Indeed, for motile cells such as the amoeba *D. discoideum*, which extend spontaneously frequent pseudopods without activation by an external stimulus, the presence of a chemoattractant gradient induces the formation of longer and persistent pseudopods, together with an increase in cell speed.

Surprisingly, in our mechanotaxis assay, the external magnetic force induced drastic changes in direction of migration, without any increase in cell velocity, or changes in instantaneous cell shape. Therefore, as proposed both for mechanotaxis (Decave et al., 2003) and chemotaxis (Hannigan et al., 2002) studies, cell speed, determined by the F-actin polymerization/depolymerization rates and direction of migration appeared in this study controlled by independent mechanisms.

More importantly, it was proposed that PI3K is involved in directional sensing but is also crucial to relay the signal to the cytoskeleton, activating locally F-actin polymerization at the pole facing the external chemical gradient. By contrast, in this study, it appeared that PI3K is indeed crucial for directional sensing and persistent orientation of the dominant pseudopod, whereas this signaling pathway does not seem to induce changes in the activity of the F-actin cytoskeleton as cell speed and instantaneous cell shape (pseudopod extension) are not modified.

Therefore, this data showed that our experimental system allows to strictly “uncoupled” these two distinct processes, and for the first time allows to study the molecular mechanisms upstream of the PI3 K involved in directional sensing in a more dynamic and physiological manner than after F-actin depolymerisation drug treatment.

We can conclude that the magnetic force application act as a compass leading to pseudopod extension in a unique direction. The persistent pseudopod formed is oriented in the direction precisely opposite to the applied force, while the formation of secondary pseudopods is completely inhibited on lateral sides of the cell. This observation is similar to what was found during chemotaxis in other cells where PTEN, the phosphatase responsible for PIP3 dephosphorylation, is localized to the lateral sides of the cell and inhibits pseudopod extension. It would be now interesting to localize PTEN and PI3K during the mechanotransduction assay to investigate if the molecular mechanosensing mechanisms are similar or different from the ones involved in chemical sensing.

Conclusion

Application of a magnetic force to migrating *E. histolytica* cells revealed the importance of the site at which the force is applied. We found that a local and low intensity mechanical stimulus applied at the rear pole of the cell triggered an intracellular biochemical signaling response, or so-called "mechanotransduction" phenomenon. We recently developed a new microrheology setup that allows the measurement of the visco-elastic parameters of living motile *E. histolytica* cells (Marion et al., 2005; Marion et al., 2004b). It will be of interest to probe the changes in viscoelasticity associated with the cytoskeleton reorganization that we observed during the persistent cell polarization phenomenon in the present study. The system we developed in this study could offer the possibility to discover new detailed insights into the physical and biochemical processes involved in cell migration in vitro and can be correlated to the *in vivo* complex cell migration behaviour. Related to *E. histolytica*, it was shown that chemotaxis is involved in the switch to virulence of the parasite and is crucial for human tissue invasion. Therefore, by using mutant strains and drug treatments, the system developed in this study would allow to gain insights into the virulent factors involved in amoebiasis.

Acknowledgments:

This work was supported by the Ministère de l'Éducation Nationale de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (ACI nanosciences, nanotechnologie), and the French Direction Générale de l'Armement (DGA).

5.6 Conclusion sur le mouvement à l'échelle de la cellule individuelle

Grâce au dispositif expérimental décrit précédemment, nous avons mis en évidence un phénomène de magnétotaxie particulièrement important. L'amibe subissant une force magnétique à l'arrière change radicalement de comportement migratoire. Nous avons montré que cette force mécanique à l'arrière de la cellule activait une voie de mécanotransduction médiée par la PI3Kinase. Nous supposons alors que ce sont les produits lipidiques de cette kinase (PIP3) qui modifient la direction de polymérisation de l'actine et induisent au final une migration dirigée à l'opposée de cette force (Figure 59).

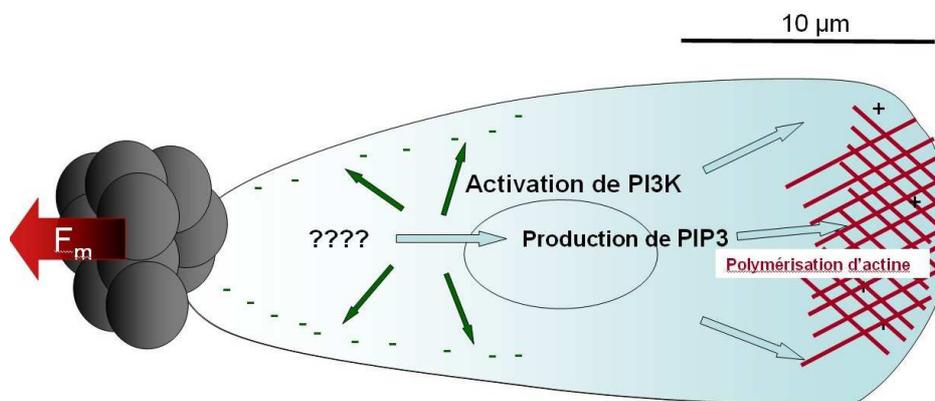


Figure 59 Modèle naïf du phénomène de mécanotransduction lorsqu'une force est appliquée à l'arrière de la cellule.

La force locale active, par une voie de signalisation inconnue, la PI3K, PI3K qui permet la production de PIP3 préférentiellement du côté opposé à la force. PIP3 favorisent ensuite l'orientation de la polymérisation d'actine et préservent cette direction. La migration est ainsi dirigée à l'opposée de la force. Des cascades biochimiques permettant d'inhiber la formation de pseudopodes latéraux, en jouant sur le nombre et l'activité des myosines II par exemple, sont également probablement impliquées.

Il est évident que de nombreuses analyses complémentaires sont nécessaires pour arriver à une meilleure compréhension du phénomène observé. En particulier, la PI3K, dans les études de chimiotaxie est distribuée préférentiellement à l'avant de la cellule. Or, nous appliquons une force à l'arrière de la cellule. L'activation de la PI3K est donc vraisemblablement un événement assez tardif dans cette mécanotransduction. Il existe donc toute une cascade de signalisation biochimique à l'amont de cette PI3K qui reste à déterminer.

La détection de ce stimulus mécanique pourrait entre autres impliquer les intégrines et/ou les canaux ioniques. Le rôle central des molécules d'adhésion dans la mécanotransduction est décrit dans l'annexe 2. Dans notre cas, de nombreux récepteurs sont impliqués dans le rejet vers l'uroïde. Parmi ces récepteurs, on retrouve une des molécules également impliquée dans

l'adhésion cellulaire : la lectine Gal/GalNAc (Arhets et al., 1995; Guillen, 1996). Il est donc possible que la mécanotransduction soit activée via ces molécules d'adhésion.

Il a également été montré que des forces locales pouvaient augmenter le transport de calcium à travers les canaux ioniques (Glogauer et al., 1995). Cette modification du niveau de calcium à l'intérieur de la cellule peut alors, à travers toute une cascade biochimique, activer la myosine II et ainsi influencer sur les filaments d'actines (Glogauer et al., 1997). Étant donné que l'on retrouve dans l'uroïde trois fois plus de myosines II que dans le reste de la cellule, cette voie de signalisation biochimique semble tout à fait envisageable (Arhets et al., 1995; Guillen, 1996). Ces canaux ioniques peuvent donc aussi être impliqués dans la mise en place d'une direction privilégiée de polymérisation de l'actine.

Enfin, l'induction de ce mouvement dirigé implique certainement des signaux d'inhibition, qui travaillent de concert avec les signaux d'activation et sont intégrés spatialement et temporellement. En particulier, on peut supposer que la PTEN, la phosphatase responsable de l'inhibition des pseudopodes latéraux est également impliquée dans cette voie de mécanotransduction. Elle est d'ailleurs répertoriée à l'arrière de la cellule dans les études de chimiotaxie.

Il faut noter que l'étude de la migration sur *Entamoeba histolytica* n'a été faite que sur le substrat synthétique le plus classique : des lames de verre. Il aurait été également intéressant de conduire les mêmes séries d'expériences sur des substrats plus évolués (enrobées avec du collagène ou de la fibronectine par exemple), de façon à moduler l'adhésion cellulaire. Les résultats devraient en effet être modulés en fonction de l'adhésion des cellules sur leur substrat.

On peut par ailleurs se poser la question de savoir qu'elle serait la réponse à une telle force pour des cellules migrant au sein d'un tissu. Le stimulus mécanique serait alors en compétition avec des signaux de contact donnés par le tissu lui-même, voire avec des signaux chimiques envoyés par les cellules composant ce tissu. *In vivo*, la cellule est ainsi soumise à un certain nombre de signaux d'origines différentes et qui peuvent être contradictoires. C'est l'intégration de tous ces signaux qui donnera lieu à une réponse cellulaire appropriée et éventuellement à une migration dirigée. Cette migration dirigée ne se fera pas de façon individuelle, mais aura pris en compte les signaux de toutes les cellules avoisinantes.

Pour mettre en évidence les différences entre le comportement migratoire des amibes sur divers substrats *in vitro* et *in vivo*, une méthode intéressante est d'analyser le mouvement cellulaire par une approche physique : l'analyse du mouvement quadratique moyen. Cette méthode a été récemment appliquée pour l'analyse du mouvement d'*Entamoeba histolytica* *in vitro* et *in vivo* (Coudrier et al., 2005). Nous avons également utilisé ce type d'analyse pour notre étude *in vitro*.

5.7 Analyse complémentaire sur le mouvement de cette amibe

5.7.1 Modélisation du mouvement cellulaire

Une autre approche simple pour représenter le mouvement cellulaire est de parler de marche aléatoire : une séquence de vecteurs dont la direction est aléatoire (Figure 60). Une cellule se déplaçant en suivant une marche aléatoire ne se déplacera pas systématiquement dans une direction bien précise, puisque les déplacements dans toutes les directions de l'espace ont la même probabilité de se produire. Néanmoins, plus le temps passera, plus la cellule s'éloignera de sa position de départ. En suivant le déplacement d'une cellule pendant un temps suffisamment long, on peut mesurer ce que l'on appelle le mouvement quadratique moyen $\langle r^2(t) \rangle$ (mean square displacement en anglais -MSD-) de la cellule.

Le déplacement quadratique moyen $\langle r^2(t) \rangle$ est calculé à partir des positions instantanées comme décrit par (Abney et al., 1999). La position du centre de masse de l'amibe est relevée tous les $\delta t = 1s$. Pour chaque $p\delta t$ (p étant un entier variant de 1 à n , le nombre total de mesure), en moyennant toutes les distances au carré entre deux points espacés temporellement de $p\delta t$:

$$\langle r^2(t) \rangle = \frac{1}{n-p+1} \sum_{i=0}^{n-p} |\vec{r}(i\delta t + n\delta t) - \vec{r}(i\delta t)|^2 \quad \text{Eq. 5.1}$$

Pour une cellule se déplaçant en 2D d'une façon assimilable à un mouvement de diffusion, le déplacement quadratique moyen suivra la loi : $\langle r^2(t) \rangle = Dt$, où D peut être assimilé à un coefficient de diffusion (souvent exprimé en $\mu m^2 \cdot s^{-1}$)⁴⁴. Plus D sera important, plus la diffusion sera rapide (plus la cellule s'éloignera rapidement de son point de départ).

Le mouvement cellulaire n'est néanmoins généralement pas purement diffusif et est ajusté par une loi de puissance $\langle r^2(t) \rangle = Dt^\alpha$, où l'exposant α permet de classer le mouvement en différentes catégories :

- si $\alpha = 1$, le mouvement est diffusif
- si $0 < \alpha < 1$, le mouvement est qualifié de sous-diffusif
- si $1 < \alpha < 2$, le mouvement est qualifié de sur-diffusif

⁴⁴ Si la cellule ne prenait aucune part active dans son mouvement, elle se déplacerait, en solution aqueuse par un processus de diffusion. Elle serait poussée d'un côté puis de l'autre par le mouvement thermique des molécules d'eau. Ces mouvements thermiques, aussi connus sous le nom de mouvements browniens ou mouvements diffusifs sont aléatoires et quantifiés par un coefficient de diffusion D (m^2/s).

- si $\alpha=2$, le mouvement est qualifié de balistique (purement dirigé) et $D^{1/2}$ est alors analogue à une vitesse ($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$)

5.7.2 Résultats et interprétations de ce mouvement

De façon à quantifier le type de locomotion des amibes, le déplacement quadratique moyen a donc été calculé. Le mouvement des amibes pour les deux types de marquage (INTRA B=0, URO B =0) et leur modification en présence d'un gradient de champ magnétique (INTRA B, URO B) a été analysé et un exemple est représenté sur la Figure 61.A. Il est intéressant de remarquer que ce déplacement quadratique moyen est bien ajusté par le modèle développé par (Wu and Libchaber, 2000) :

$$\langle r^2(t) \rangle = 4Dt \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{tc}\right) \right] \quad \text{Eq. 5.2}$$

Ce modèle prend en compte deux régimes différents pour le mouvement cellulaire. Aux temps courts, le mouvement est proche d'un régime balistique avec $\langle r^2(t) \rangle \propto \frac{D}{tc} t^2$, jusqu'à un temps de « crossover » t_c , où l'on retrouve un régime brownien : $\langle r^2(t) \rangle \propto Dt$.

Pour les amibes témoins (INTRA=0, URO=0), ainsi que lorsque l'amibe est soumise à une force intracellulaire (INTRA), nous trouvons **un temps de crossover t_c de l'ordre de 55 s, correspondant à un rayon ($r_c = \langle r^2(t_c) \rangle^{1/2}$) de l'ordre de 26 μm** (Figure 61.B). Ce rayon peut être assimilé à une longueur de persistance (Figure 60) et nous renseigne sur la fréquence spatiale à laquelle l'amibe change de direction du mouvement (ici, à chaque fois que tout le corps cellulaire s'est déplacé).

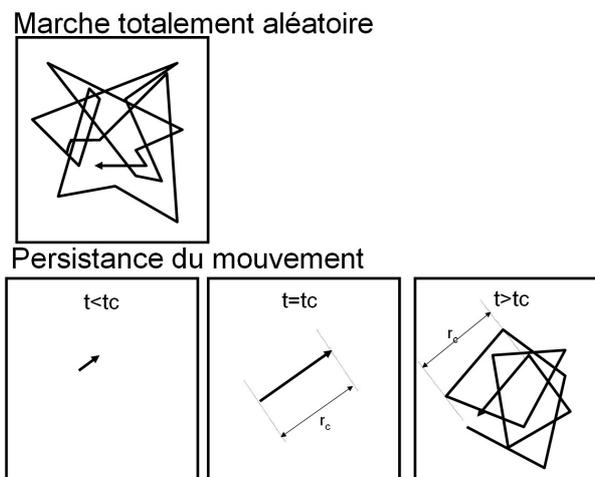


Figure 60. Mouvement aléatoire versus persistance du mouvement.

La qualité de l'ajustement a été vérifiée en représentant $\langle r^2(t) \rangle / 4Dt_c$ en fonction de t/t_c pour toutes les amibes analysées. Dans ce cas, tous les points se retrouvent sur une courbe universelle $f(x) = x(1 - e^{-x})$, comme montré dans l'encart de la Figure 61.B.

Ce temps de "cross-over" est largement augmenté pour les amibes soumises à une force magnétique à leur pôle arrière **et se rapproche du temps d'observation (133 < t_c < 477s), correspondant à une longueur de persistance de 2 à 10 fois le diamètre de l'amibe (60 < r_c < 290 μ m).** La largeur de la distribution de t_c reflète une correspondance moins bonne avec le modèle de (Wu and Libchaber, 2000). En effet, dans les échelles de temps et d'espace de notre expérience, les amibes se déplacent avec un régime pratiquement balistique et le $\langle r^2(t) \rangle$ est mieux ajusté par une loi de puissance classique : $\langle r^2(t) \rangle = Dt^\alpha$, avec une valeur de $\alpha = 1.8 \pm 0.05$ ($r^2 = 0.999$).

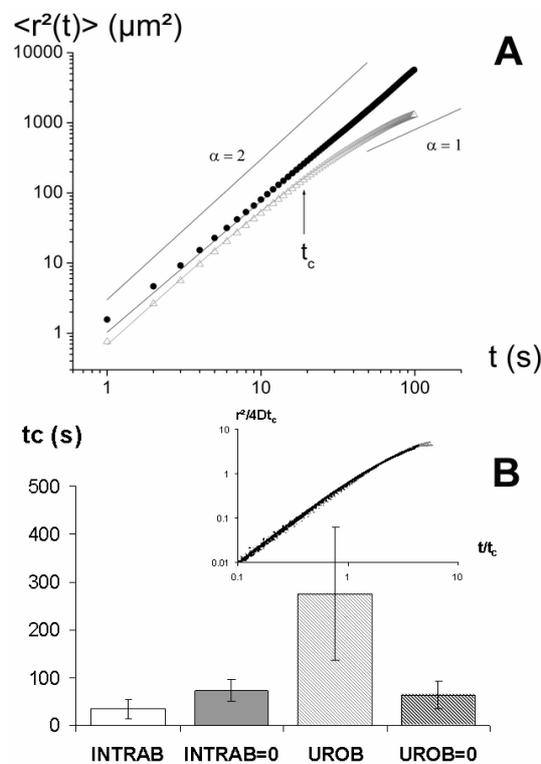


Figure 61.

(A) Exemple typique du mouvement quadratique moyen $\langle r^2(t) \rangle$ obtenu pour une amibe contrôle (triangle blanc - Δ -) et pour une amibe soumise à une force magnétique appliquée à son pôle arrière (uroïde, cercle noir - \bullet -). Pour les amibes contrôles (INTRA B=0 et URO B=0) ainsi que lorsque les amibes sont soumises à force intracellulaire (INTRA B), le mouvement est balistique aux temps courts, jusqu'à un temps de "cross-over" t_c au-delà duquel on retrouve une diffusion brownienne (indiqué par la flèche). $\langle r^2(t) \rangle$ peut être décrit par le modèle de (Wu and Libchaber, 2000) (voir texte). L'ajustement avec ce modèle est montré par les lignes pleines sur les 2 exemples choisis. Des droites de pente 2 et 1 ont été rajoutées pour guider le lecteur. (B) Valeurs moyennes et écarts types des t_c obtenus en ajustant les $\langle r^2(t) \rangle$ obtenus pour chaque amibe par ce modèle. Lorsque la force est appliquée à l'arrière de l'amibe, le $\langle r^2(t) \rangle$ est moins bien décrit par le modèle de (Wu and Libchaber, 2000) et le temps de "cross-over" t_c diverge vers des valeurs proches du temps d'observation. Encart : Courbe pour vérifier l'ajustement des courbes (voir texte).

Les résultats obtenus par cette analyse physique nous ont ainsi permis de quantifier d'une part la marche pseudo-aléatoire des amibes et d'autre part la longueur de persistance caractéristique de leur mouvement. Les différences de comportement migratoire entre les amibes contrôles et les amibes soumises à une force magnétique à leur pôle arrière ont ainsi pu être une fois de plus clairement mises en évidence. Dans notre cas, cette étude n'apporte en soi aucun élément complémentaire dans l'analyse des différences de comportements migratoires en fonction du point d'application de la force (déjà démontrées par les paramètres « classiques » utilisés dans les méthodes de chimiotaxie et détaillés dans l'article présenté au paragraphe 5.5). Ce type d'analyse peut néanmoins s'avérer intéressant pour mettre en évidence des modifications subtiles dans le mouvement cellulaire, sans qu'un mouvement dirigé soit clairement mis en place. C'est le cas de l'étude de (Coudrier et al., 2005) sur le mouvement *in vitro* et *in vivo* de différentes souches d'*Entamoeba histolytica*. En ajustant le mouvement des amibes à une loi de puissance ($\langle r^2(t) \rangle = Dt^\alpha$), cette équipe a ainsi pu mettre en évidence des différences dans la migration des amibes en fonction de l'environnement dans lequel les cellules évoluent (sur verre, sur cellule, dans le foie) et en fonction de leur phénotype (souches sauvages, souches sans myosine II, souches avec un défaut d'adhésion). Cette analyse a notamment permis de montrer le rôle de la myosine II ainsi que de la molécule d'adhésion lectine Gal-Gal-Nac pour la mise en place d'un mouvement non-brownien ($\alpha > 1$). Les différences marquées entre le comportement *in vitro* 2D et *in vivo* 3D dans le foie ont également été rapportées : la migration des amibes dans le foie apparaît être plus proche d'un mouvement dirigé ($\alpha = 1.6$) qu'*in vitro* ($\alpha = 1.25$). Ce résultat peut être relié aux différents signaux rencontrés par les amibes *in vivo*, qui peuvent dans ce cas déclencher une réponse chimiotactique. Ce type d'analyse, associé à une méthode d'imagerie adaptée, pourrait dans ce contexte être utile pour étudier les interactions des amibes avec leur environnement, ainsi qu'avec les cellules de l'hôte.

Une comparaison directe entre notre étude et l'étude de (Coudrier et al., 2005) n'est malheureusement pas possible car les intervalles de temps et la durée des analyses ne sont pas les mêmes ($\Delta t = 1s$ sur 500s dans notre cas, contre $\Delta t = 5.4s$ sur 300s dans l'autre étude). Le Δt étant plus grand, il n'ont en effet pas accès dans leur cas aux premiers points du régime balistique et trouve de ce fait un comportement migratoire beaucoup plus proche du mouvement brownien que le nôtre.

5.8 De l'échelle de la cellule individuelle à l'échelle multicellulaire

L'amibe *Entamoeba histolytica* migre donc suivant un mouvement pratiquement balistique lorsque une force magnétique est appliquée à son pôle arrière. Qu'en est-il si les cellules interagissent plus fortement entre elles ?

En parallèle à la migration de cellules individuelles, il est en effet également important de développer une meilleure compréhension des mouvements cellulaires à **des densités de « niveau tissulaire », où les cellules interagissent fortement entre elles et se comportent plus collectivement (Palsson and Othmer, 2000).**

Pour étudier le comportement collectif des cellules et la modification de leur comportement lorsqu'elles sont soumises à des forces mécaniques, nous avons mis au point le même type d'expérience pour un autre modèle cellulaire : l'amibe sociale *Dictyostelium discoideum*. Même si ces résultats ne sont que préliminaires, ils permettent ici de replacer dans un contexte plus large les résultats obtenus chez *Entamoeba histolytica*.

5.9 À l'échelle d'une population de cellules : modèle de l'amibe *Dictyostelium Discoideum*

5.9.1 Choix du modèle

Pour étudier un comportement collectif, l'amibe *Dictyostelium discoideum*⁴⁵ est un modèle particulièrement intéressant. En effet, cette amibe, au cours de son cycle de vie, peut exister en cellule individuelle mais également en agrégat multicellulaire structuré de plus de 100 000 cellules. La formation de l'agrégat se fait grâce à une molécule chimiotactique sécrétée par les cellules elles-mêmes : le cAMP. On observe alors la formation de « lignes de courant » cellulaires qui se dirigent de manière centripète vers un centre d'agrégation.

Nous avons analysé le comportement de ce modèle cellulaire en compétition avec une force magnétique lors de la formation de l'agrégat.

5.9.2 Présentation de *Dictyostelium discoideum*

Comme l'illustre le cycle de vie de *Dictyostelium discoideum* (Figure 62), l'interaction cellules-cellules chez cette amibe donne lieu à un comportement « social » complexe. Ces amibes vivent dans la

⁴⁵ collaboration Irène Tatischeff, BioMoCeTi (UPMC, Evry)

terre, se nourrissant de bactéries et de levures, et se divisant au bout de quelques heures. Dans ces conditions, elles montrent une réponse chimiotactique à certains produits des bactéries tels que l'acide folique (Korohoda et al., 2002; Sroka et al., 2002), ce qui lui permet de migrer vers les sources de nourriture. De façon à se disperser autant que possible, elles montrent également une chimiotaxie négative aux produits rejetés par les autres amibes.

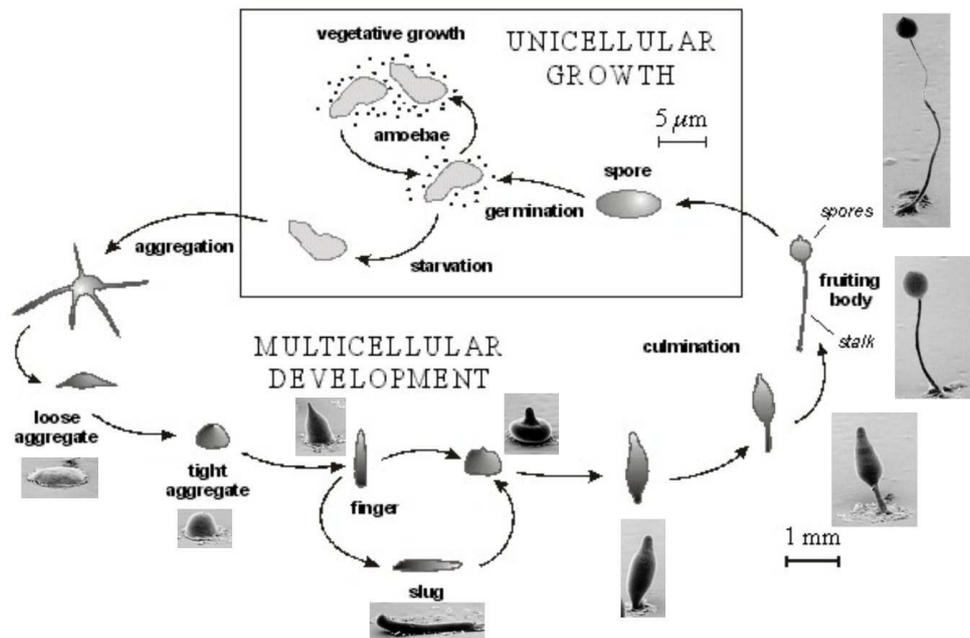


Figure 62 Cycle de vie de *Dictyostelium discoideum*

D'après <http://www.biologydaily.com/biology/Dictyostelid>. Cliché de microscopie électronique à transmission : Biological Sciences Electron Microscopy Laboratory, Texas Tech University. Copyright, M.J. Grimson & R.L. Blanton

Si la nourriture vient à s'épuiser, les amibes arrêtent de se diviser et se regroupent entre elles autour d'un centre d'agrégation, attirées cette fois-ci par des molécules chimiotactiques qu'elles sécrètent elles-même (Figure 63). C'est cette partie de la vie de *Dictyostelium discoideum* que nous étudions. Au sein de chaque agrégat, les cellules adhèrent par l'intermédiaire de molécules de surfaces.

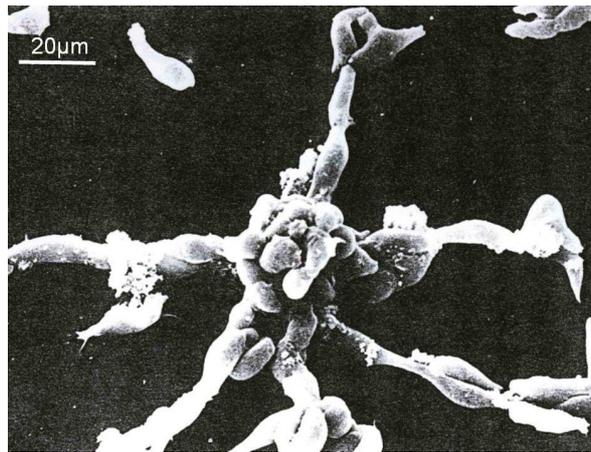


Figure 63

Cliché de microscopie électronique d'un centre d'agrégation cellulaire chez *Dictyostelium discoideum*. D'après (Bray, 1992).

Une structure longue et très fine (1-2 μm) ressemblant à un ver est ensuite générée. Ce ver est capable de ramper et peut migrer ainsi pendant plus de 20 jours. Dans ces conditions, il est attiré par les sources de chaleur et de lumière (Miura and Siegert, 2000).

Lorsqu'il s'arrête de migrer, il commence une série de changements morphologiques complexes jusqu'à la formation de spores, qui ensuite germent et explosent pour reformer des amibes individuelles. Le cycle peut alors recommencer.

Nous ne nous intéresserons ici qu'à l'étape d'agrégation en condition de carence alimentaire. Durant ce stade, les cellules commencent à répondre et à sécréter de façon pulsée du cAMP (Chen et al., 1996). Pour des raisons encore peu connues, certaines de ces cellules deviennent des centres d'agrégation et attirent les autres cellules en carence en modulant leur direction de migration dans la direction du cAMP. Ceci s'observe de façon immédiate en injectant à l'aide d'une micropipette un peu de cAMP à proximité des cellules (Futrelle et al., 1982 ; Swanson and Taylor, 1982) (Figure 64) : les cellules s'allongent immédiatement en direction de la micropipette et commencent une migration dirigée vers la source de cAMP.

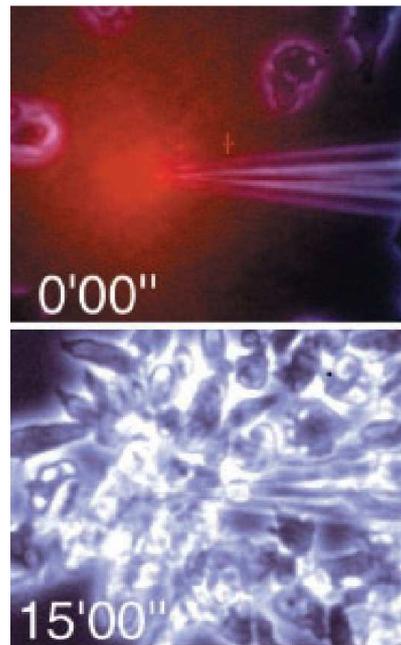


Figure 64

Réponse chimiotactique des amibes Dicty à une molécule de cAMP fluorescente. L'essai chimiotactique a été réalisé avec une micropipette contenant 1mM d'une solution de cAMP. Le gradient du cAMP fluorescent créé est observé par microscopie d'épifluorescence à t_0 . Après 15 minutes de stimulation avec le cAMP, les cellules s'accablent au niveau de la micropipette. D'après (Ueda et al., 2001).

Une fois le centre d'agrégation amorcée, le signal de cAMP va être relayé de cellules en cellules au sein de l'agrégat, délivrant des ondes de cAMP de façon régulière pour attirer des cellules plus éloignées. Ces cellules migrent alors en formant des lignes de courant concentriques ou parfois des spirales (Figure 65). Tout en migrant en lignes de courant vers le centre d'agrégation en sécrétant du cAMP, les amibes commencent également à synthétiser de nouvelles molécules, dont celles qui permettent l'adhésion cellules-cellules.

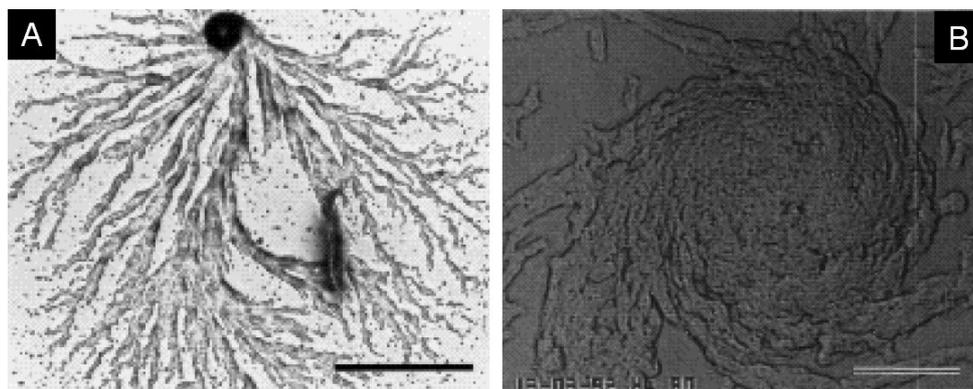


Figure 65

Agrégation de Dicty en lignes de courant concentrique (a) et spirales (b). Barre = 50 μ m. D'après (Eliott et al., 1993).

Contrairement au modèle d'*Entamoeba histolytica*, dans lequel la migration était à l'origine aléatoire et la force mécanique le seul stimulus auquel était soumise la cellule, la force mécanique est ici opposée à une force d'origine chimiotactique puissante (le cAMP). La migration est donc déjà dirigée et la persistance de la polarisation imposée par le gradient de cAMP. Le but est cette fois-ci d'analyser si une force mécanique peut influencer non pas sur le mode de migration, mais uniquement sur la direction de migration.

5.9.3 Démarche expérimentale

Culture des cellules *Dictyostelium* et marquage magnétique

Les cellules (souches Ax2) sont cultivées en suspension dans un milieu HL5⁴⁶ sous agitation constante (120 rpm), sur un plateau à la température régulée à 22°C. Ces cellules végétatives sont récoltées à la fin de la phase exponentielle de leur croissance, lorsqu'elles ont atteint une densité cellulaire de 5 à 15 x10⁶cellules/mL. Le culot est alors centrifugé (1000g, 4 min) et les cellules dispersées dans la même solution de HL5, dans laquelle les nanoparticules magnétiques ont été ajoutées ([Fe]_{final}=174 mM). Après 5h d'incubation, les cellules sont ensuite lavées 3 fois avec le tampon de carence (tampon G⁴⁷) puis dispersées dans ce même tampon à 5x10⁶/mL dans des boîtes de pétri de 2.5 cm de diamètre (2 mL/ boîtes). De façon à maintenir la stérilité, pendant l'observation sous microscope, 1 mL d'huile (paraffine GPR, VWR international) est ajouté.

Observation pendant la phase d'agrégation

Ici encore, une pointe magnétique nous permet d'appliquer un gradient de champ magnétique intense. Les cellules marquées magnétiquement (7 pg de fer/cellules) subissent alors en moyenne dans le champ de vue, une force variant en fonction de la position des cellules par rapport à la pointe de plusieurs dizaines de pN jusqu'à avoisiner le nN près de la pointe.

La formation d'agrégats sous gradient de champ magnétique est observée par vidéomicroscopie (objectif x4) pendant 60 à 75 h, en enregistrant une image toutes les 60 secondes.

5.9.4 Premiers résultats

L'application d'un gradient de champ magnétique pendant la phase d'agrégation a pour effet de dévier les « lignes de courant cellulaire », c'est à dire de contrer les signaux chimiotactiques

⁴⁶ Le HL5 est un milieu spécifique pour le développement de *Dictyostellium*. Il est préparé à partir de poudre commerciale (Formédium) et autoclavé 20min à 120°C.

⁴⁷ Le tampon G est un tampon phosphate (8.7 mM de K₂HPO₄ et 13.3 mM de KH₂PO₄, pH 6.4)

envoyés par les cellules (Figure 66). Les résultats n'ont pour l'instant pas été quantifiés et l'analyse reste purement qualitative. Il est néanmoins intéressant de noter que la force mécanique imposée aux cellules semble avoir d'effet seulement lorsque les cellules ont atteint un niveau de densité tissulaire (Figure 67).

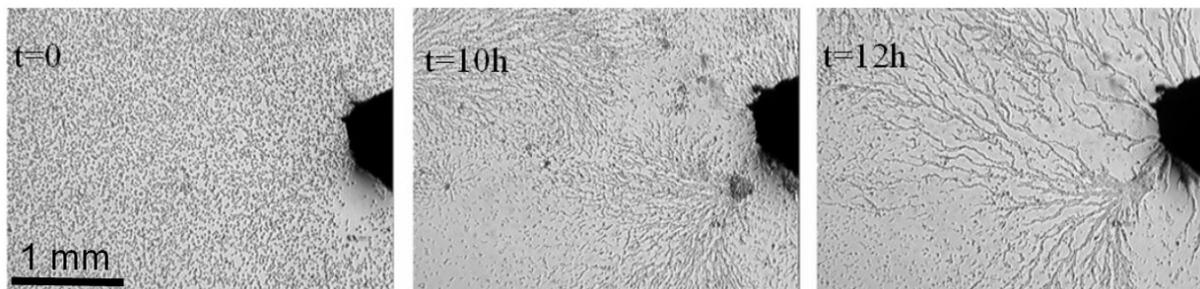


Figure 66.

Formation d'un agrégat de *Dictyostelium discoideum* sous gradient de champ magnétique (créé par la pointe noire). Environ dix heures après le début de la mise en carence alimentaire des amibes, des courants cellulaires se forment et sont massivement attirés par la pointe.

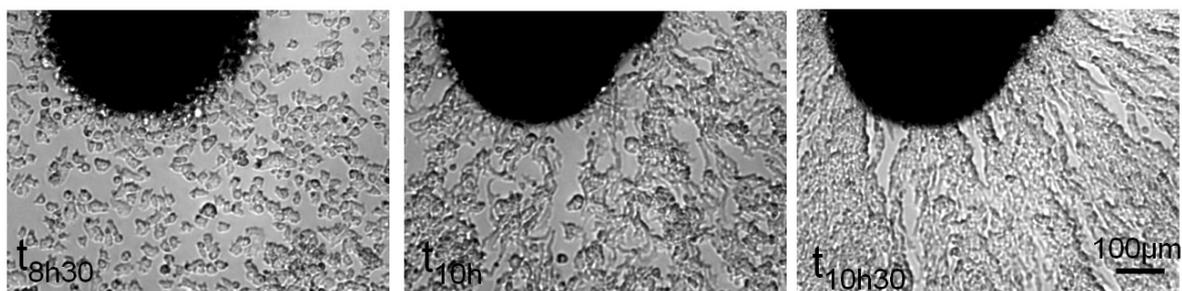


Figure 67

Séquences d'images montrant la formation d'un agrégat de *Dictyostelium discoideum* sous gradient de champ magnétique (créé par la pointe noire) à plus fort grossissement. Les amibes migrent vers la pointe seulement lorsqu'elles sont organisées en véritable « tissu ».

5.9.5 Premières interprétations

Ici encore, les cellules se déplacent de façon aléatoire en l'absence de signaux chimiotactiques. Cette observation laisse supposer que **le cAMP contrôle non pas la polymérisation de l'actine, mais plutôt la direction de cette polymérisation** (Williams and Harwood, 2003). La cascade biochimique qui contrôle la direction de polymérisation d'actine (Figure 68) est d'ailleurs tout à fait similaire à celle trouvée pour d'autres cellules répondant à un signal chimiotactique et dans le cas de la mécanotransduction mise en évidence chez *Entamoeba histolytica*.

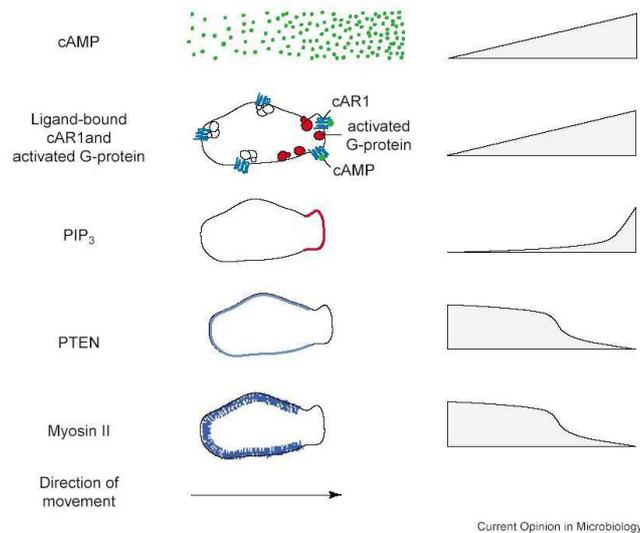


Figure 68. Amplification du signal chimiotactique par *Dictyostelium discoideum* .

Les récepteurs membranaires cAR1 et les protéines G détectent le gradient de cAMP, et déclenchent une cascade de signalisation pour créer un gradient de PIP3 bien plus important que le gradient de cAMP. Le signal chimiotactique est ainsi amplifié à l'intérieur de la cellule. La PTEN et la myosine II sont dans le même temps relocalisées à l'arrière et sur les côtés de l'amibe (le gradient de ces molécules est aussi important que le gradient de PIP3, mais orienté à l'opposé du gradient chimiotactique).

Dans ce modèle cellulaire, **la force magnétique a un effet sur les cellules à l'état collectif, lorsqu'elles interagissent entre elles, alors qu'il n'y a pas d'effet sur les cellules individuelles.** Le ou les mécanismes responsables de ces comportements restent entièrement à découvrir.

On peut néanmoins supposer que des modifications au niveau de l'adhésion cellulaire sont en partie responsables de ce phénomène. En effet, d'après les observations à plus fort grossissement, cette magnétotaxie collective ne se produit que lorsque les cellules migrent sous une forme de structures 3D, presque à l'état de tissu, c'est-à-dire pour des forces d'adhésion a priori plus faibles. La force d'adhésion entre deux cellules adjacentes dans le stade multicellulaire a été quantifiée comme une somme d'interactions discrètes d'une vingtaine de pN seulement (Benoit et al., 2000b). La force magnétique est donc du même ordre de grandeur et peut favoriser localement la rupture de certains points d'adhésion, sans toutefois détacher totalement les cellules.

De plus, le modèle d'adhésion développé par (Bruckert et al., 2002) montre un seuil au dessus duquel un processus de « peeling » commence et diminue la force d'adhésion entre le substrat et la cellule. Ce seuil a été déterminé expérimentalement autour de 300 pN (Decave et al., 2002b) pour des cellules sur un substrat de verre. La force magnétique que nous imposons se trouve donc être dans cette gamme de force. La valeur de ce seuil est modifiée dès que les cellules

commencent à s'organiser en structure 3D, et il est possible que l'on passe au-dessus de ce seuil au début de la phase d'agrégation.

De plus, les interactions dipôle-dipôle dans les structures formées par le gradient de cAMP (les lignes de courant) sont ici bien plus importantes que lorsque les cellules sont à l'état individuel⁴⁸. Tout comme il est possible de former une chaîne d'endosomes magnétiques sous l'action d'un champ magnétique uniforme puis de l'orienter par un couple d'origine magnétique (Wilhelm et al., 2003b), on peut donc penser qu'il est possible d'orienter une chaîne de cellules sous l'action des forces dipolaires entre cellules. En revanche, alors que la seule force s'opposant à la rotation des chaînes d'endosomes est la force visqueuse du matériau au sein duquel elle se trouve, il faut tenir compte ici à la fois :

- (1) des forces d'adhésion cellules/cellules
- (2) des forces générées par la cellule elle-même pour se déplacer (qui est à relier ici principalement au signal chimiotactique du cAMP des cellules voisines)
- (3) des forces d'attraction générées par les cellules voisines (par l'intermédiaire des pulses de cAMP).
- (4) des forces de compression exercées par les cellules voisines.

Pour que la chaîne de cellules s'oriente le long des lignes de forces, il faut donc que les interactions dipôle-dipôle surpassent la somme de toutes ces forces en compétition.

Une dernière hypothèse envisagée est encore une fois un phénomène de mécanotransduction.

Le comportement de *Dictyostelium discoideum* vis-à-vis d'une force mécanique semble être similaire à celui trouvé chez *Entamoeba histolytica* (Decave et al., 2002a; Decave et al., 2003) : lorsqu'elles sont soumises à un flux laminaire, les cellules initient une migration dirigée. Ce comportement migratoire est là encore le résultat d'une mécanotransduction médiée par les actions complémentaires de la PI3Kinase et de la PTEN, permettant d'orienter la direction de polymérisation d'actine et donc la direction de migration. Cette étude met donc en évidence la sensibilité de *Dictyostelium discoideum* à une force mécanique. Le mouvement d'agrégation vers la pointe magnétique lors de la phase multicellulaire de *Dictyostelium discoideum* peut donc également être dû à une mécanotransduction à l'état collectif en réponse à la force magnétique imposée. Ce pourrait être le cas si la cascade de signalisation n'est déclenchée qu'au-delà d'un certain seuil,

⁴⁸ La force magnétique dipolaire $F_{dd} = \frac{6\mu_0 m_e(B)^2}{4\pi r^4}$, où $m_e(B)$ est le moment magnétique porté par la cellule pour le champ B correspondant et r, la distance entre 2 cellules. La force dipolaire agit donc très localement.

seuil qui serait franchi grâce à la communication entre cellules à l'état collectif qui amplifie le signal.

5.10 Conclusion et perspectives : guidage magnétique de cellules

La réponse de cellules marquées magnétiquement à l'application d'une force magnétique semble donc bien plus complexe que ce que l'on imaginait au départ. Néanmoins, il est possible grâce à ces premiers résultats d'imaginer quelques applications de ce type de guidage pour l'ingénierie tissulaire et la thérapie cellulaire.

5.10.1 Pour l'ingénierie tissulaire

Un domaine émergent pour lequel le contrôle de la migration cellulaire pourrait être important est l'ingénierie tissulaire ou l'ingénierie des organes artificiels. Il a déjà été démontré que des surfaces nanostructurées, sur lesquelles la migration cellulaire était dirigée, pouvaient être utilisées dans la réparation de tendons (Wilkinson et al., 1998). Utiliser le guidage magnétique pour promouvoir la migration puis l'adhésion de cellules marquées magnétiquement au sein d'un implant pourrait également s'avérer une aide intéressante pour faciliter l'intégration des cellules au sein du biomatériau implantable. Les applications pour le guidage magnétique *in vitro* dans de telles structures semblent néanmoins encore difficiles pour des cellules adhérentes sur un substrat. En effet, même si les forces magnétiques que l'on est actuellement capable d'appliquer nous ont permis de mettre en évidence un phénomène de mécanotransduction, un énorme effort de compréhension et d'expérimentation est nécessaire avant de comprendre suffisamment ce phénomène pour s'en servir dans le guidage magnétique de cellules migrant au sein d'une structure artificielle 3D.

En revanche, le guidage magnétique peut s'avérer intéressant pour des cellules marquées magnétiquement en suspension. La faisabilité d'une telle approche a d'ailleurs été récemment démontrée sur un stent magnétique sur lequel l'adhésion cellulaire a ainsi pu être renforcée, permettant ainsi une réendothélisation plus rapide (Sandhu et al. 2005, répertorié dans (Circulation, 2005)).

5.10.2 Pour la thérapie cellulaire *in vivo*

Les applications *in vivo* sont encore plus problématiques. Il semble en effet difficile d'arriver à des forces suffisantes pour induire un magnétotaxie positive globale au sein de l'organisme, dans une zone bien déterminée.

En revanche ce qui reste envisageable, notamment pour des cellules circulantes, serait de forcer la résidence des cellules à un endroit précis de l'organisme. Les études préliminaires faites *in vitro* sur le guidage magnétique de cellules et brièvement présentées dans le chapitre 4 montrent qu'il est à priori possible de contrer le flux sanguin et stopper les cellules marquées magnétiquement au sein d'une zone de l'organisme (Arbab et al., 2004).

Si cet endroit présente les caractéristiques d'une lésion, on peut alors penser que les cellules vont déclencher toute une cascade d'évènements pour d'une part (1) émettre des signaux chimiotactiques pour attirer les cellules nécessaires à la réparation de cette lésion et d'autre part, si les cellules injectées ont des capacités souches, (2) se différencier en cellules « manquantes » pour régénérer le tissu ou l'organe lésé.

En effet, même si les nombreux essais *in vivo* sur l'utilisation des cellules souches à finalité thérapeutique s'avèrent prometteurs, seul un petit nombre des cellules réellement implantées arrivent et participent à la régénération tissulaire. Utiliser un guidage magnétique en complément pourrait donc permettre d'amplifier le signal chimiotactique de base et améliorer d'autant l'efficacité d'une telle thérapie.

Conclusion générale

Conclusion générale

Cette thèse montre l'intérêt de l'utilisation de particules magnétiques pour détecter, suivre, voire même guider magnétiquement des cellules à finalités thérapeutiques et ce aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

L'utilisation de systèmes particuliers pour les sciences du vivant est actuellement en pleine expansion et de nombreuses particules sont maintenant disponibles. Parmi celles-ci, cette thèse s'est principalement centrée sur l'utilisation de deux types de particules : (1) des nanoparticules magnétiques anioniques synthétisées au Laboratoire des Liquides Ioniques et Interfaces chargées (LI2C) et (2) des microparticules magnétiques commercialisées par la société Dynal.

L'intérêt des premières vient de leur interaction non spécifique avec la membrane cellulaire qui permet leur internalisation spontanée, et efficace au sein de vésicules intracellulaires, sans altération de la viabilité et du phénotype cellulaire.

A l'opposé, le deuxième type de particules nous a permis de cibler, cette fois-ci de façon spécifique, différentes régions du corps cellulaire (dans notre cas, cytoplasme versus uroïd) dans un modèle cellulaire précis (l'amibe *Entamoeba histolytica*).

En guise de conclusion je reviendrai sur les principaux résultats obtenus au cours de cette thèse, en ouvrant le débat sur des sujets plus vastes dans lesquels cette étude pourrait s'intégrer.

Premièrement, les charges négatives de surface des nanoparticules magnétiques utilisées, de part une forte interaction non spécifique avec la membrane plasmique des cellules, leur confèrent un atout indéniable pour marquer magnétiquement de façon efficace et à long terme un grand nombre de types cellulaires. Cette interaction aspécifique avec la membrane cellulaire permet l'adsorption et l'agrégation de ces nanoparticules au sein de vésicules intracellulaires. Nous avons vu dans le chapitre 2, qu'en utilisant les propriétés magnétiques et optiques de ces particules, il est possible de détecter cette interaction particules/cellules sur cellules vivantes. Le développement de cette méthode magnéto-optique pourrait alors permettre la mise au point d'une méthode d'immunodétection peu coûteuse, rapide et simple d'utilisation.

En dehors de cette application à long terme, les nanoparticules magnétique anioniques se sont révélées de puissants marqueurs cellulaires pour détecter *in vivo* la présence de cellules par IRM avec une grande sensibilité⁴⁹

Les études d'imagerie cellulaire par IRM présentées dans le chapitre 3 ont montré l'intérêt de cette technique pour le suivi à long terme de cellules transplantées localement. Cette technique pourrait notamment être un outil de choix pour valider le succès d'une thérapie cellulaire et aider le chirurgien dans ses décisions. Il ne faut pas non plus perdre de vue que l'IRM, utilisée dans cette thèse pour l'imagerie cellulaire, est avant tout un outil puissant pour l'imagerie anatomique, mais également fonctionnelle. Il est ainsi possible de suivre de manière non invasive de nombreux processus physiologiques comme par exemple la modification des flux sanguins ou cartographier la distribution de température, au sein d'un organe. De plus, la résolution à laquelle il est possible de travailler avec cette technique (de l'ordre de $40 \mu\text{m}^3$) permet de suivre de manière longitudinale, au sein de l'organisme vivant, des processus aussi complexes que la migration cellulaire.

En couplant l'IRM avec des techniques d'imagerie complémentaires et des marqueurs multifonctionnels, ce nouveau domaine qu'est l'imagerie cellulaire ou l'imagerie moléculaire pourrait notamment permettre de comprendre des mécanismes de migration cellulaire *in vivo*. Ce « trafficking cellulaire », responsable de nombreuses pathologies mais également source d'espoir pour la génération de thérapies plus efficaces, pourrait alors être contrôlé plus précisément.

Même si les traitements thérapeutiques favorisent aujourd'hui les stimuli d'origine biochimique, l'émergence de nouvelles techniques de micromécaniques soulève maintenant l'importance des stimuli mécaniques. Les nanoparticules magnétiques offrent l'opportunité d'appliquer à distance, de manière non-invasive des forces mécaniques locales et contrôlées et peuvent donc s'avérer un outil de choix pour des applications thérapeutiques et également pour des études fondamentales.

L'utilisation de nanoparticules magnétiques pour moduler la réaction cellulaire rentre dans ce cadre dans le domaine de l'ingénierie cellulaire : une nouvelle génération de thérapies dans lesquelles la position et le mouvement cellulaire sont contrôlés. Les magnétoliposomes utilisés dans le chapitre 4 peuvent être inclus dans cette catégorie puisque ces vecteurs de médicaments peuvent permettre la libération contrôlée de molécules thérapeutiques tels que des anticancéreux mais pourquoi pas également des molécules chimiotactiques permettant le contrôle de la motilité cellulaire.

⁴⁹ La sensibilité pouvant être atteinte aujourd'hui est de l'ordre de quelques cellules marquées magnétiquement.

Même s'il n'a pour l'instant pas été possible de moduler la réponse cellulaire *in vivo* par l'intermédiaire d'une force magnétique, les essais *in vitro* montrent que la cellule est bien sensible à ce stimulus mécanique et que cette sensibilité dépend du point d'application de la force. Il est ainsi possible d'induire une mécanotaxie négative en appliquant une force magnétique à l'arrière de la cellule. Pour approfondir et mieux comprendre ce processus de mécanotransduction, l'utilisation du même type de dispositif expérimental sur différents types cellulaires pourrait permettre une meilleure compréhension des réactions cellulaires à des forces mécaniques faibles et localisées ainsi qu'une analyse des cascades biochimiques qu'elles déclenchent.

Nous ne sommes aujourd'hui encore qu'au tout début de cette exploration de la migration cellulaire, pourtant étudiée *in vitro* depuis les années 1970 avec Abercrombie. Cela ne fait par exemple que quelques années qu'il est réellement possible de suivre en temps réel la migration cellulaire aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. C'est grâce au rapprochement de disciplines différentes que de nouvelles techniques ont émergé. Ceci a non seulement permis une meilleure compréhension de la communication cellulaire, de son organisation, ainsi que des processus physiologiques qui en découlent, mais a également ouvert de nouvelles perspectives thérapeutiques. C'est grâce à ce type de rapprochements qu'il devient maintenant possible d'analyser non seulement la motilité cellulaire en temps réel, mais également les processus moléculaires. Ceci ouvre les portes de la caractérisation quantitative, à l'échelle moléculaire, de la nanomachinerie de la cellule vivante. Cette prise de conscience a permis de faire naître de nouvelles disciplines : la nanomédecine et les nanobiotechnologies.

C'est entre autres l'utilisation des nanotechnologies dans les sciences du vivant qui a permis de découvrir à quel point la cellule est un capteur multisignal sensible : elle est capable de détecter aussi bien des signaux biochimiques (à une sensibilité de l'ordre de la picomole), que des signaux mécaniques (à des échelles de l'ordre du piconewton) ou des signaux topographiques (à des échelles de l'ordre du nanomètre). Il est d'ailleurs intéressant de voir que même s'il existe de nombreuses propriétés spécifiques à chaque type cellulaire, différentes cellules peuvent réagir de la même façon à un stimulus mécanique ou topographique, mais à des degrés différents. La cellule est donc bien un véritable capteur, capable de sécréter au moment adéquat des molécules médicamenteuses (telles que des hormones de croissance par exemple) ou au contraire des molécules de signalisation extracellulaire (telles que les chimiokines). Il paraît donc primordial de comprendre ses mécanismes pour arriver à utiliser ses propriétés à bon escient.

Je veux à nouveau rappeler ici le caractère pluridisciplinaire de ce domaine, qui nécessite non seulement les compétences des biologistes cellulaires et moléculaires, mais également des

chimistes, des physiciens et biophysiciens, et bien entendu des radiologues, chirurgiens et médecins. Ce n'est qu'en confrontant nos différents points de vues que l'on arrivera à réellement contrôler la cellule et son mouvement.

Annexe 1

Traitement des spectres de DNPA

Annexe 1 : Traitement des spectres de DNPA⁵⁰

Principe de la diffusion de neutrons aux petits angles⁵¹ :

La diffusion de rayonnement statique aux petits angles permet de déterminer la structure d'une suspension, c'est-à-dire les interactions entre objets ainsi que la forme et la taille de ces objets.

Quand des ondes (neutrons, X, lumière...) se propagent dans un milieu, rencontrent des hétérogénéités de densité de diffusion, elles sont diffusées. **Cette diffusion peut être soit cohérente, soit incohérente. Ce sont les ondes diffusées cohérentes qui vont nous permettre de reconstruire l'image de ces hétérogénéités de densité, et donc du milieu.**

Le faisceau incident est représenté par une onde plane $a_0 e^{-ik_i \cdot \vec{r}}$, de vecteur d'onde \vec{K}_i et de longueur d'onde λ ($|\vec{K}_i| = \frac{2\pi}{\lambda}$). Si l'on considère une assemblée de N diffuseurs identiques discrets, l'amplitude diffusée loin de l'échantillon est égale à :

$$A(\vec{q}) = \sum_i^N b_{diff} e^{i\vec{q} \cdot \vec{r}} \quad \text{Eq. A1.1}$$

où b_{diff} est le pouvoir de diffusion du diffuseur (qui dépend de la nature de l'onde incidente) et \vec{q} le vecteur de diffusion $\vec{q} = (\vec{K}_d - \vec{K}_i)$ de module $|\vec{q}| = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2}$, avec θ , l'angle entre l'onde incidente et l'onde diffusée (Figure A1.1).

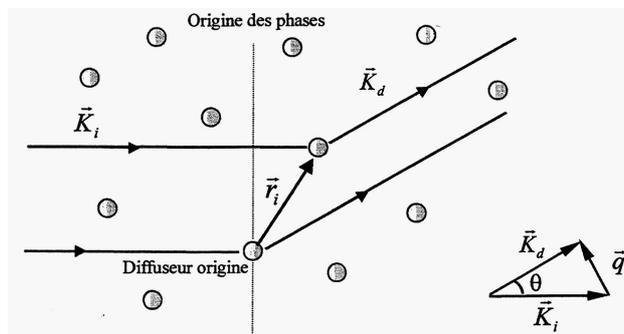


Figure A.1.1. Principe d'une expérience de diffusion statique de rayonnement (Cousin, 2000).

⁵⁰Le traitement des spectres a été réalisé par Fabrice Cousin (CEA, Saclay).

⁵¹ Basé sur **Cousin, F.** (2000). Comportement de phase de colloïdes sphériques et plaquettaires. In *Thèse spécialité Matière condensée : Chimie et Organisation*. Paris: Paris 6..

L'intensité diffusée (grandeur accessible à la mesure) est la moyenne sur toutes les configurations du carré du module de l'amplitude $I(q) = \langle A(q) \cdot A^*(q) \rangle$.

Lorsque le vecteur d'onde \vec{K}_d de l'onde diffusée est important, on sonde l'espace sur de faibles distances : **l'intensité diffusée aux grands q (petits λ) permet donc de remonter à la taille et à la forme des objets.**

Au contraire, lorsque le vecteur d'onde \vec{K}_d de l'onde diffusée est faible, on sonde l'espace sur des distances importantes : **l'intensité diffusée aux petits q (grands λ) permet de remonter à l'organisation spatiale des objets dans l'échantillon.**

L'intensité diffusée est alors proportionnelle au produit de convolution du facteur de forme et du facteur de structure des objets. Pour des objets centrosymétriques, tels que les nanoparticules magnétiques, il est possible de décorrélérer le facteur de forme et le facteur de structure. L'intensité diffusée $I(q)$ (cm^{-1}) par une suspension colloïdale (particules dispersées dans un solvant) prend alors la forme suivante (Figure A1.2). :

$$I(q) = \Phi(\rho_{\text{objets}} - \rho_{\text{solvant}})^2 P(q)S(q) \quad \text{Eq. A1.2}$$

où Φ est la fraction volumique en objets, $(\rho_{\text{objets}} - \rho_{\text{solvant}})^2$ est le contraste (en cm^{-4} car les densités de longueur de diffusion des atomes ρ sont en cm^{-2}), **$P(q)$ (en cm^3) est le facteur de forme caractéristique de la forme et de la taille des particules diffusantes** et **$S(q)$ est le facteur de structure des échantillons.**

Dans notre cas, c'est le facteur de structure qui nous intéresse (l'organisation spatiale des particules).

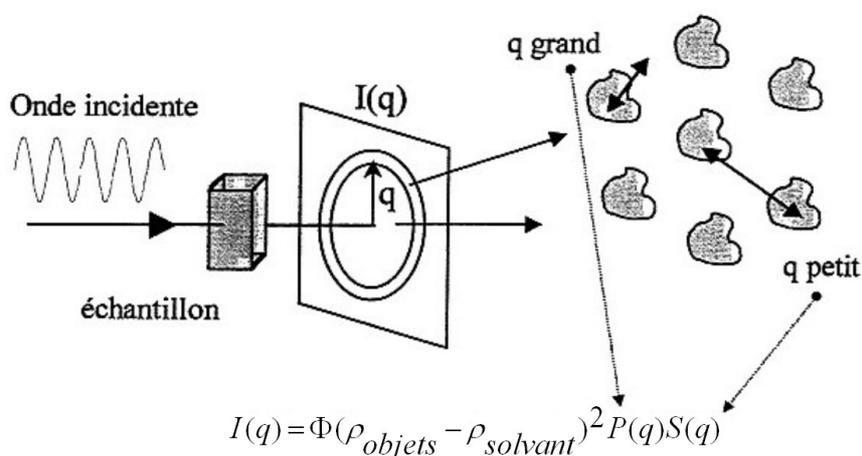


Figure A.1.2. Diffusion par un ensemble d'objets. D'après (Cousin, 2000).

Suspension diluée et facteur de forme

Dans le cas d'une suspension de colloïdes très diluée (cas de la solution de nanoparticules de maghémite utilisées avant l'internalisation cellulaire), les interactions entre particules sont négligeables et le facteur de structure devient uniformément égal à 1. **L'intensité mesurée permet alors de remonter au facteur de forme $P(q)$ des particules.**

Suspension concentrée et facteur de structure

Dans une suspension concentrée (comme dans les cas des nanoparticules de maghémite adsorbées sur les membranes ou internalisées au sein des endosomes), **les interactions ne sont plus négligeables et l'intensité diffusée va dépendre de l'organisation spatiale des particules dans l'échantillon, c'est-à-dire du facteur de structure $S(q)$.**

Préambules au traitement :

Au cours des expériences, les données expérimentales sont recueillies par un détecteur à deux dimensions. Elles sont ensuite regroupées de façon isotrope pour obtenir le signal en fonction du vecteur de diffusion. Les échantillons sont placés dans des cellules en quartz, d'épaisseurs variables. Il faut donc corriger le signal de la contribution de la cellule vide, puis le normaliser en utilisant le signal de la diffusion de l'eau. L'intensité de l'échantillon en cm^{-1} s'écrit alors :

$$I_{ech}(cm^{-1}) = \left(\frac{\frac{I_{ech+CV}}{T_{ech+CV} * E_{ech}} - \frac{I_{CV}}{T_{CV} * E_{ech}}}{\frac{I_{eau+CV}}{T_{eau+CV}} - \frac{I_{CV}}{T_{CV}}} \right) \quad \text{Eq. A1.3}$$

où ech signifie échantillon, cv cellule vide, T est la transmission, E l'épaisseur de la cuve et I est l'intensité.

A l'issue de cette première étape, **le signal contient l'intensité cohérente de l'échantillon mais également son intensité incohérente, plus l'intensité (purement incohérente) du solvant. Il faut alors éliminer le signal du solvant en soustrayant $(1-\Phi).I_{solvant}$, avec Φ la fraction volumique en objets :**

$$I_{objets}(cm^{-1}) = \left(\frac{\frac{I_{ech+CV}}{T_{ech+CV} * E_{ech}} - \frac{I_{CV}}{T_{CV} * E_{ech}}}{\frac{I_{eau+CV}}{T_{eau+CV}} - \frac{I_{CV}}{T_{CV}}} - (1-\Phi) \frac{\frac{I_{sol+CV}}{T_{sol+CV} * E_{sol}} - \frac{I_{CV}}{T_{CV} * E_{sol}}}{\frac{I_{eau+CV}}{T_{eau+CV}} - \frac{I_{CV}}{T_{CV}}} \right)$$

qui se réduit à la formule suivante si la mesure est faite dans l'eau légère (H_2O) :

$$I_{objets} (cm^{-1}) = \left(\frac{\frac{I_{ech+CV}}{T_{ech+CV} * E_{ech}} - \frac{I_{CV}}{T_{CV} * E_{ech}}}{\frac{I_{eau+CV}}{T_{eau+CV}} - \frac{I_{CV}}{T_{CV}}} - \frac{(1-\Phi)}{E_{sol}} \right) \text{ Eq. A1.4}$$

Variation de contraste

L'intensité des échantillons que nous voulons analyser (nanoparticules magnétiques adsorbées sur des fragments de membranes plasmiques et nanoparticules magnétiques internalisées au sein des endosomes) est en grande partie due au signal de diffusion provenant des membranes. **De façon à garder seulement le signal qui nous intéresse : le signal des nanoparticules magnétiques au sein de ces objets, il est intéressant de réaliser une extinction du signal des membranes.**

Le PNS de cellules Hela en culture, contenant entre autres des fragments de membranes plasmiques et des endosomes (non magnétiques, bien sûr), a donc été également préparé. Pour éteindre le contraste dû aux membranes, l'échantillon de PNS, contenant des membranes dispersées dans un solution aqueuse (H_2O) de sucrose a donc été progressivement dilué dans une solution de sucrose dans l'eau lourde (D_2O). L'intensité de chaque échantillon est analysée et le rapport H_2O/D_2O correspondant à un minum d'intensité sera retenu dans la suite de nos expériences. C'est ce qu'on appelle la variation de contraste.

Soustraction du bruit de fond incohérent

Pour tous les échantillons contenant une fraction volumique Φ_{memb} de membranes, l'intensité peut être écrite de la façon suivante :

$$I(q) (cm^{-1}) = \Phi_{memb} I_{memb,co} + \Phi_{memb} I_{memb,inc} + (1-\Phi) I_{Solvent,inc} \text{ Eq. A1.5}$$

Où $I_{memb,co}$ est la partie cohérente du signal des membranes, $I_{memb,inc}$ est la partie incohérente du signal des membranes et $I_{Solvent,inc}$ est l'intensité de diffusion du solvant, purement incohérente. Les deux parties incohérentes du signal doivent être soustraites au signal pour ne conserver que la partie cohérente $I_{memb,co}$.

La partie incohérente du signal des membranes est difficile à évaluer puisque ces dernières sont composées de différents éléments tels que des phospholipides et des protéines. La soustraction peut néanmoins être faite pour l'échantillon de membranes dispersées dans la solution aqueuse

(H₂O) de sucre. En effet, dans ce cas : (i) $\Phi_{\text{memb}} \ll 1$, (ii) les densités de longueur de diffusion des éléments hydrogénés sont proches des densités de longueur de diffusion de l'eau légère (H₂O). L'intensité recueillie se réduit alors à :

$$I(q) \text{ (cm}^{-1}\text{)} = \Phi_{\text{memb}} I_{\text{memb,co}} + I_{\text{H}_2\text{O,inc}} \quad \text{Eq. A1.6}$$

Après soustraction du signal de l'eau, la partie cohérente de l'intensité des membranes $I_{\text{memb,co}}$ est proportionnelle à q^{-2} à grands q (Figure A.1.3), loi de puissance attendue pour les facteurs de forme d'objets 2D, comme la membrane cellulaire (les protéines et autres éléments contenus dans le PNS donnent donc un signal négligeable).

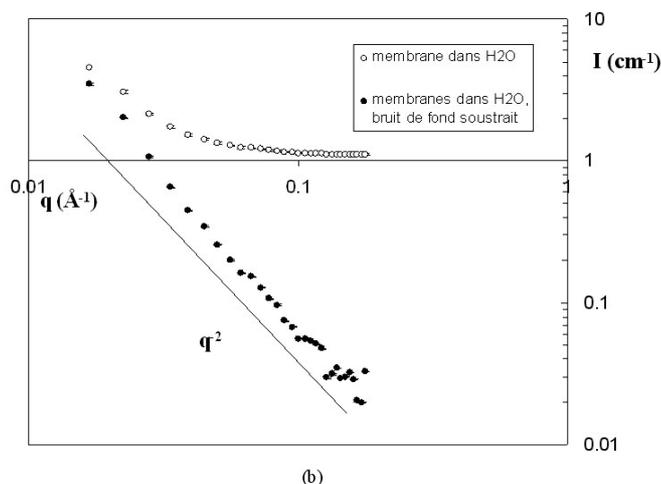


Figure A.1.3

Spectres obtenues pour les membranes avec et sans soustraction du signal incohérent de l'eau.

La pente en q^{-2} à grand q de l'échantillon de membranes non magnétiques dans H₂O nous permet alors de soustraire la partie incohérente du signal sur les autres échantillons de membranes ; quelle que soit la fraction H₂O/D₂O utilisée. La partie incohérente du signal, indépendante de q , est soustraite sur chaque échantillon de façon à retrouver $I \propto q^{-2}$ à grand q .

La partie cohérente de l'intensité est alors :

$$I(q) \text{ (cm}^{-1}\text{)} = \Phi(\rho_{\text{solvant}} - \rho_{\text{objets}})^2 K(q) \quad \text{Eq. A1.7}$$

avec Φ la fraction volumique d'objets, $(\rho_{\text{solvant}} - \rho_{\text{objets}})^2$ le contraste entre le solvant et les objets et $K(q)$ le terme d'information structurale (forme et structure $K(q) = P(q) S(q)$). A grand q , c'est-à-dire dans un domaine où l'on sonde l'espace sur de faibles distances, $K(q)$ n'est pas affecté par la dilution.

Variation du rapport D₂O/H₂O

La longueur de diffusion du solvant s'écrit :

$$\rho_{\text{solvent}}(x) = x \rho_{\text{D}_2\text{O}} + (1 - x) \rho_{\text{H}_2\text{O}} \quad \text{Eq. A1.8}$$

où x est la fraction volumique de D₂O dans la solution H₂O/D₂O.

Des équations A1.7 et A1.8 on obtient :

$$\rho_{\text{solvent}}(x) - \rho_{\text{memb}} \propto \sqrt{\frac{\int I_{\text{memb}}(x, q) dq}{\Phi_{\text{memb}}}} \quad \text{Eq. A1.9}$$

La figure A1.4 représente $\sqrt{\frac{\int I_{\text{memb}}(x, q) dq}{\Phi_{\text{memb}}}}$ en fonction de x . L'intégration de la diffusion a été faite entre $q = 0.017 \text{ \AA}^{-1}$ and $q = 0.17 \text{ \AA}^{-1}$.

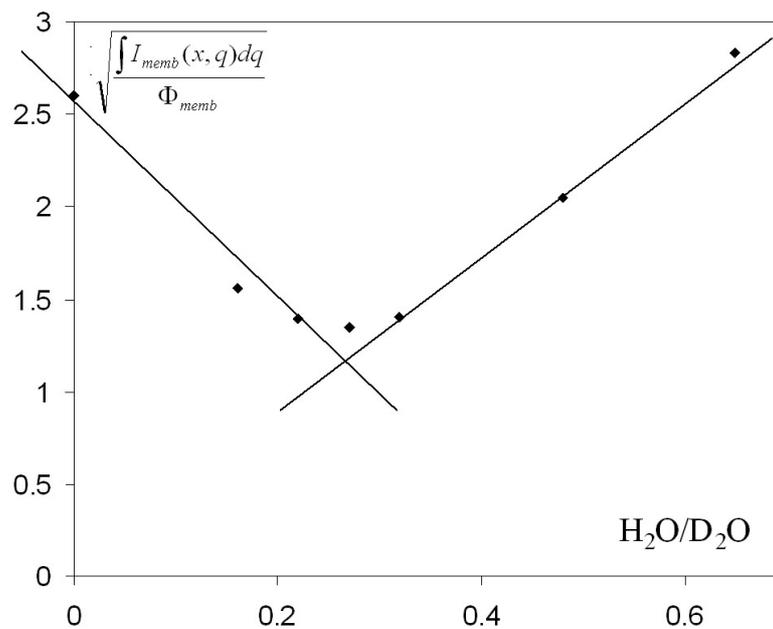


Figure A1.4

Intensité des membranes en fonction de la fraction H₂O/D₂O

$\sqrt{\frac{\int I_{\text{memb}}(x, q) dq}{\Phi_{\text{memb}}}}$ devrait descendre jusqu'à 0 lorsque $\rho_{\text{solvent}}(x) = \rho_{\text{memb}}$. En réalité, il passe par un minimum pour $x = 0.27$. Ce n'est donc pas possible d'éteindre complètement le signal des membranes. Ceci vient du fait que les membranes biologiques sont des objets complexes, composées d'un grand nombre de molécules différentes, qui ont des longueurs de diffusion

différentes. Il reste donc toujours une partie de l'intensité cohérente des membranes. Elle est minimale à 27%/73% D₂O/H₂O, pourcentage qui a été utilisé dans la suite des expériences.

Nanoparticules de maghémite en solution diluée

De façon à déterminer l'organisation structurale des nanoparticules magnétiques dans les systèmes hybrides, le ferrofluide seul a été mesuré à une fraction volumique $\Phi = 0.01$ dans l'eau légère H₂O. La soustraction du bruit de fond se fait facilement à partir des formules du préambule (le ferrofluide n'a pas d'intensité incohérente car le fer et l'oxygène ont des sections efficaces de diffusion incohérente nulles). **Les particules sont ici en suspension diluée et le facteur de structure $S(q)$ des particules est égal à 1 quelqusoit q .** Il est donc aisé de remonter au facteur de forme des particules (voir Equation A1.2). Le facteur de forme obtenu est présenté sur la figure A.1.5. On observe un plateau à petits q et une **décroissance en q^{-4} à grands q , caractéristique du facteur de forme d'objets 3 D du à la diffusion par la surface.**

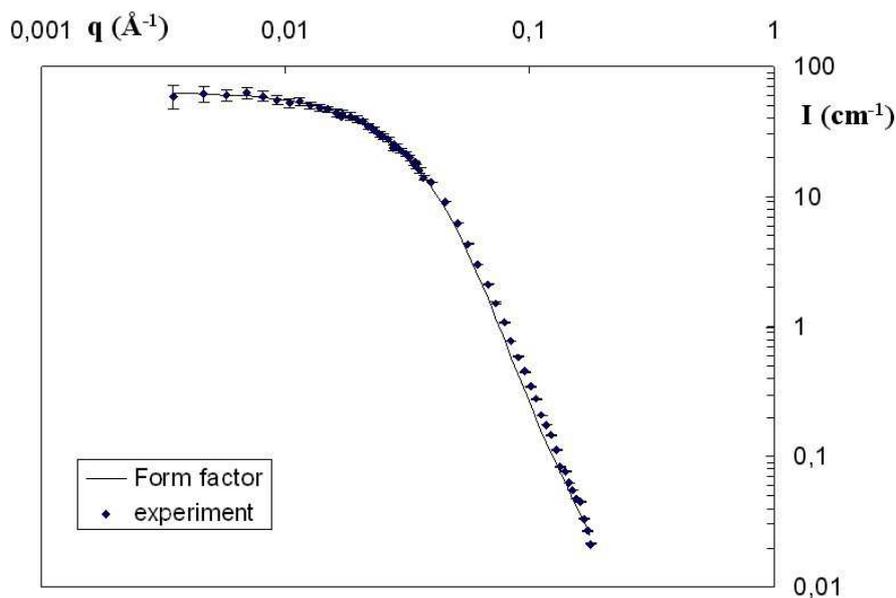


Figure A1.5

Facteur de forme des nanoparticules magnétiques individuelles dispersées en solution aqueuse, montrant un plateau à petits q , permettant de calculer la taille des particules, et une pente $I \propto q^{-4}$ à grands q , caractéristique d'objets denses 3D.

Membranes magnétiques et endosomes magnétiques : soustraction du bruit de fond

Dans les échantillons contenant les membranes magnétiques et les endosomes magnétiques, il est difficile de déterminer avec précision la fraction volumique Φ_{memb} et la fraction volumique Φ_{part} . Nous pouvons néanmoins dire, à partir d'un comptage à fort grossissement en microscopie optique, que les fractions volumiques Φ_{memb} sont du même ordre de grandeur dans les 3 échantillons (membranes seules, membranes magnétiques, endosomes magnétiques). Le dosage du fer total contenu dans les échantillons par spectroscopie de flamme montrent que $\Phi_{\text{part}} < 10^{-4}$. Le dosage du fer par spectroscopie de flamme ne nous indique qu'une limite supérieure car nous sommes en dessous du seuil de détection de l'appareil. Ces deux estimations nous permettent néanmoins de soustraire l'intensité incohérente du signal. A grands q , la diffusion provient des facteurs de forme des différents objets (membranes et nanoparticules). On peut estimer que dans cette gamme de q , il n'y a pas d'interaction entre les membranes et les nanoparticules. L'intensité cohérente peut donc être décrite comme la somme des intensités cohérentes des deux objets (nanoparticules et membranes). L'intensité totale s'écrit alors :

$$I(q) \text{ (cm}^{-1}\text{)} = \Phi_{\text{part}}(\rho_{\text{part}} - \rho_{\text{solvent}})^2 P_{\text{part}}(q) + \Phi_{\text{memb}}(\rho_{\text{memb}} - \rho_{\text{solvent}})^2 P(q)_{\text{memb,co}} + I_{\text{inc}} \quad \text{Eq. A1.9}$$

La partie incohérente est la somme des diffusions incohérentes des différents composés du système :

$$I_{\text{inc}} = \Phi_{\text{memb}} I_{\text{memb,inc}} + (1 - \Phi_{\text{memb}} - \Phi_{\text{part}}) I_{\text{Solvent,inc}} \quad \text{Eq. A1.10}$$

La contribution de ces deux parties incohérentes sur le signal peut être comparée en analysant les spectres obtenus sur les systèmes isolés. La diffusion des nanoparticules magnétiques est obtenue à partir du facteur de forme obtenu (figure A1.5), en prenant une fraction volumique $\Phi_{\text{part}} = 10^{-4}$ et $\Delta\rho^2 = 3.2 \cdot 10^{21} \text{ cm}^{-4}$, correspondant à $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ dans la solution tampon 27%/73% $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$. Autour de 0.15 \AA^{-1} , la diffusion des membranes est dix fois plus grande que celle des nanoparticules magnétiques. En effet, **le facteur de forme des particules magnétiques décroît beaucoup plus rapidement que celui des membranes (q^{-2} vs q^{-4})**. Comme la fraction volumique réelle en nanoparticules magnétiques dans nos échantillons membranes magnétiques et endosomes magnétiques est inférieure à 10^{-4} , nous obtenons à grands q :

$$\Phi_{\text{part}}(\rho_{\text{part}} - \rho_{\text{solvent}})^2 P_{\text{part}}(q) \ll \Phi_{\text{memb}}(\rho_{\text{memb}} - \rho_{\text{solvent}})^2 P(q)_{\text{memb,co}} \quad \text{Eq. A1.11}$$

$$\text{et } I(q) \text{ (cm}^{-1}\text{)} \sim \Phi_{\text{memb}}(\rho_{\text{memb}} - \rho_{\text{solvent}})^2 P(q)_{\text{memb,co}} + I_{\text{inc}} \quad \text{Eq. A1.12}$$

On peut donc supposer que le signal cohérent à très grands q est dominé par le signal dû aux membranes. Un signal incohérent est donc soustrait à l'intensité de façon à retrouver une pente en q^{-2} , caractéristique des membranes (figure A1.6).

En zoomant sur la partie à petit q (figure A1.6, b), **il apparaît nettement que le signal des endosomes magnétiques et des membranes magnétiques est plus élevé que les membranes seules et que la remontée à petits q est plus forte dans les endosomes magnétiques que dans les membranes magnétiques (les spectres se croisent).**

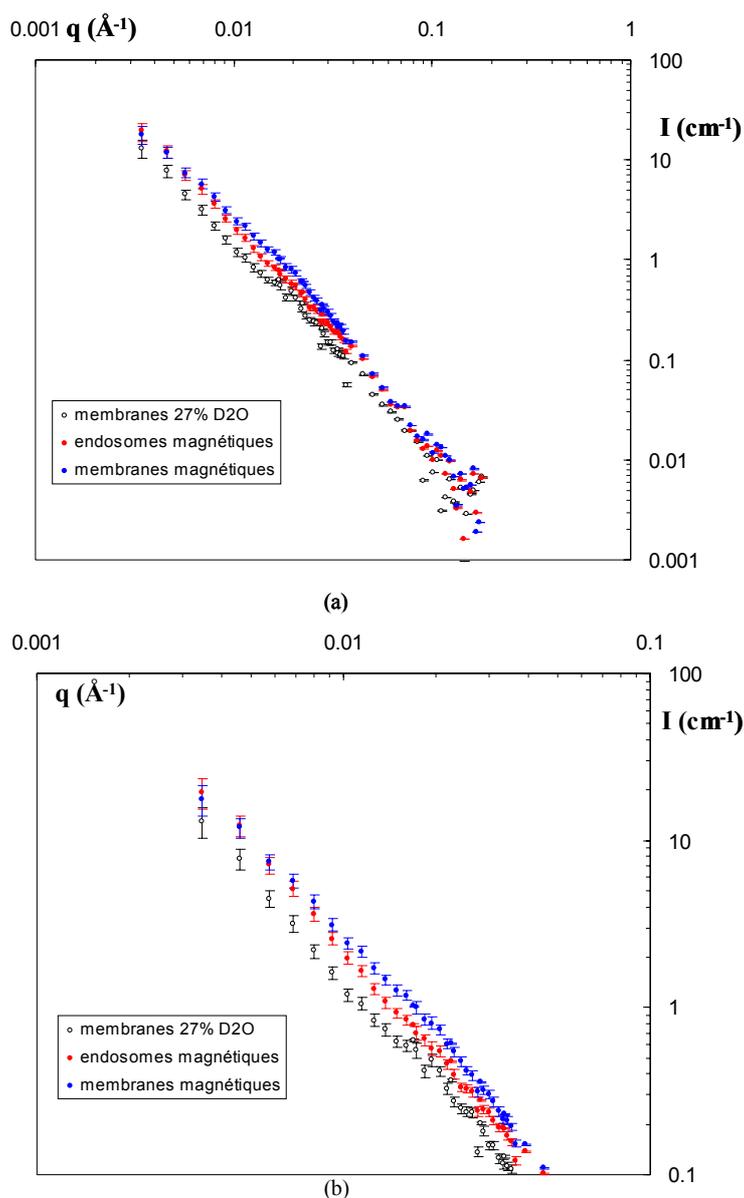


Figure A1.6. Spectre des membranes seules (noir), ainsi que des endosomes magnétiques (rouges) et des membranes magnétiques (bleu).

Membranes magnétiques et endosomes magnétiques : soustraction du signal cohérent des membranes

Après soustraction du signal incohérent, l'intensité cohérente s'écrit :

$$I(q) \text{ (cm}^{-1}\text{)} = (\rho_{\text{part}} - \rho_{\text{solvant}})^2 I_{\text{part}}(q) + (\rho_{\text{memb}} - \rho_{\text{solvant}})^2 I_{\text{memb}}(q) + (\rho_{\text{part}} - \rho_{\text{solvant}})(\rho_{\text{memb}} - \rho_{\text{solvant}}) I_{\text{part_memb}}(q)$$

Eq. A1.13

En supposant que le signal de corrélation entre les particules et les membranes est négligeables (*hypothèse forte*), le signal se réduit à :

$$I(q) \text{ (cm}^{-1}\text{)} = (\rho_{\text{part}} - \rho_{\text{solvant}})^2 I_{\text{part}}(q) + (\rho_{\text{memb}} - \rho_{\text{solvant}})^2 I_{\text{memb}}(q) \quad \text{Eq. A1.14}$$

En analysant l'intensité du signal à grand q , la fraction volumique des membranes peut être évaluée. Le signal des membranes est alors soustrait de l'intensité cohérente totale (Figure A1.7) :

$$I(q) \text{ (cm}^{-1}\text{)} = (\rho_{\text{part}} - \rho_{\text{solvant}})^2 I_{\text{part}}(q) \quad \text{Eq. A1.15}$$

$$I(q) \text{ (cm}^{-1}\text{)} = \Phi_{\text{part}} (\rho_{\text{part}} - \rho_{\text{solvant}})^2 P_{\text{part}}(q) S_{\text{part}}(q) \quad \text{Eq. A1.16}$$

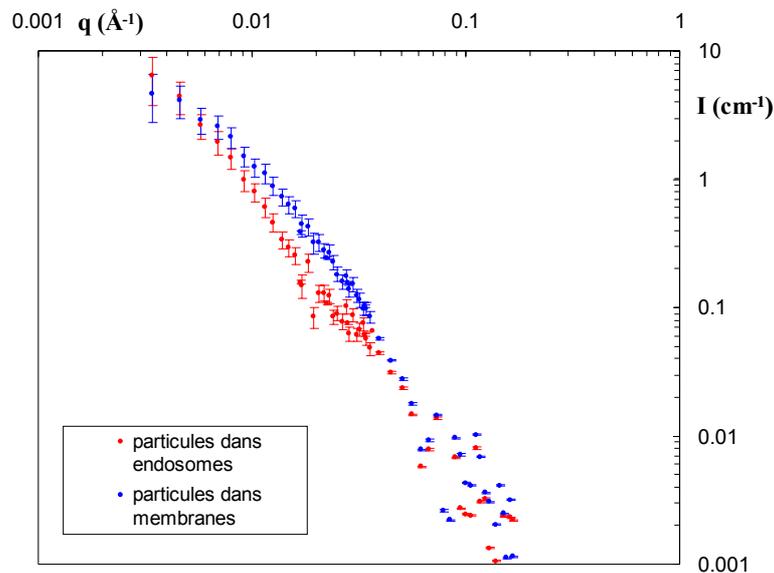


Figure A1.7.

Spectre des particules au sein des endosomes (rouge), ainsi qu'au sein des membranes (bleu).

Au-delà de 0.04 \AA^{-1} , le signal se réduit au facteur de forme des nanoparticules, pondéré par leur fraction volumique Φ_{part} au sein des échantillons de membranes et d'endosomes magnétiques

(Figure A1.5). Le facteur de structure est égal à 1. On détermine Φ_{part} par un ajustement de l'intensité diffusée au facteur de forme des particules trouvé précédemment.

On trouve de cette façon : $\Phi_{\text{part}} \sim 6 \cdot 10^{-5}$ dans l'échantillon d'endosomes magnétiques et $\Phi_{\text{part}} \sim 9 \cdot 10^{-5}$ dans l'échantillon de membranes magnétiques. Ceci est en accord avec l'hypothèse de départ : $\Phi_{\text{part}} < 10^{-4}$ (estimation obtenu grâce au spectre de flamme).

Facteur de structure des nanoparticules magnétiques au sein des objets biologiques

On peut donc finalement obtenir le facteur de structure à petits q (Figure A1.8):

$$S_{\text{part}}(q) = I(q) / (\Phi_{\text{part}}(\rho_{\text{part}} - \rho_{\text{solvent}})^2 P_{\text{part}}(q)) \quad \text{Eq. A1.17}$$

C'est ce facteur de structure qui est discuté dans le chapitre 2.

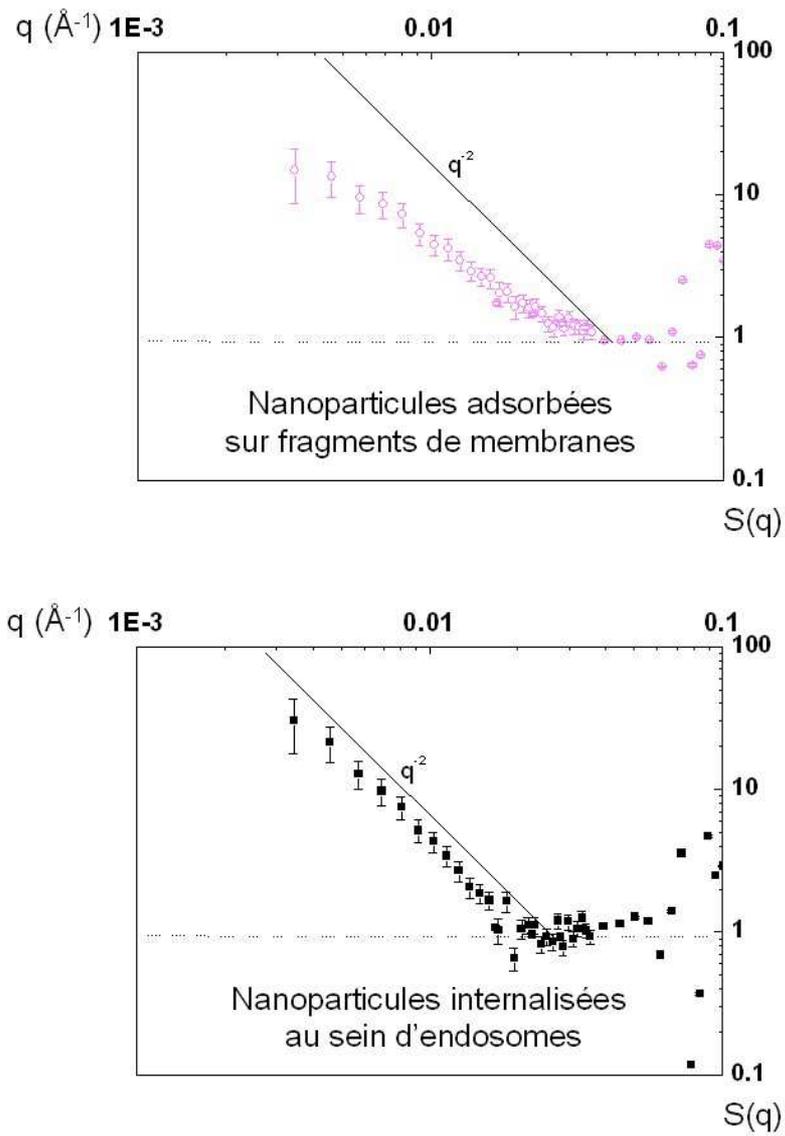


Figure A1.8. Facteur de structure des particules adsorbées sur des fragments de membranes (haut) et des particules au sein des endosomes (bas).

Annexe 2

Architecture de la cellule et adhésion

Annexe 2 : Architecture de la cellule et adhésion

Il est évident que la cellule n'est pas un organisme se déplaçant dans un système isolé. Bien au contraire, elle interagit sans cesse avec le substrat sur lequel elle migre et modifie son comportement migratoire en fonction. Dans les organismes multicellulaires, l'intégration par chaque cellule des signaux biochimiques, mais également des propriétés physico-chimiques de son environnement est cruciale pour maintenir les fonctions vitales de l'organisme. Ainsi, toutes les cellules interagissent non seulement avec leurs voisines (par des liaisons cadhérines notamment, comme nous le verrons plus loin), mais également avec les composants de ce que l'on appelle la matrice extracellulaire.

Ce type d'interaction se retrouve dès l'embryogenèse. Une fois l'organisme formé, les interactions cellule/cellule et cellule/matrice sont ensuite primordiales dans de nombreuses fonctions physiologiques (Gumbiner, 1996 ; Yap et al., 1997) telles que le maintien de l'intégrité de l'épithélium⁵², ou la mise en place de la réponse immunitaire. Il a été montré qu'une déficience au niveau de ces contacts cellulaires est à l'origine de nombreuses pathologies. On peut citer notamment la mise en place de certains cancers (Sobel et al., 2005) et l'angiogénèse qui l'accompagne (Naldini and Carraro, 2005) ou des problèmes d'immunodéficience (Guo et al., 2005; Scimone et al., 2005; Stein et al., 2003).

L'adhésion cellulaire, en dehors de son rôle premier, a également un rôle majeur dans de nombreux comportements cellulaires : elle peut moduler la forme (Parker et al., 2002) et la polarisation cellulaire (Cox et al., 2001), ainsi que l'organisation du cytosquelette, la motilité (Cox and Huttenlocher, 1998), la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire.

Rôle de l'adhésion dans la migration

Nous nous limiterons ici à son rôle dans la mise en place de la migration cellulaire. En effet, pour que la cellule puisse progresser, l'adhésion entre la cellule et son substrat doit être dynamique, avec des points d'ancrage capables de se former et de se dissocier rapidement. De plus, les forces d'adhésion doivent être suffisantes pour générer des forces de traction et tirer la cellule vers

⁵² Un exemple classique est la cicatrisation d'une plaie, qui nécessite la prolifération et la migration de fibroblastes du tissu environnant, ainsi que la prolifération de cellules épithéliales pour réparer localement la lésion.

l'avant. A l'inverse, à l'arrière de la cellule, les forces adhésives doivent être plus faibles pour permettre à la cellule de se détacher de son substrat. **Il est donc nécessaire pour comprendre la migration cellulaire non seulement d'identifier les facteurs contrôlant les processus d'adhésion et de détachement, mais également d'apprécier comment ils peuvent être modulés de façon spatio-temporelle.**

Les acteurs impliqués dans les deux processus⁵³

De nombreux éléments cellulaires sont ainsi impliqués dans ces deux processus intimement liés : la migration cellulaire résulte de changements coordonnés dans l'architecture du cytosquelette et dans l'association et la dissociation des sites d'adhésion cellules-substrats (Wehrle-Haller and Imhof, 2003). **Alors que le réseau d'actine procure la force de propulsion à l'avant, les myosines assurent un rôle de régulation dans la rétraction de l'arrière de la cellule.** Ce sont également ces deux réseaux qui contrôlent le comportement des points focaux d'adhésion. Des échanges continuels ont donc lieu entre ces différents partenaires, qui sont présentés succinctement dans ce paragraphe.

La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) désigne l'ensemble des macromolécules sécrétées localement dans l'espace extracellulaire de la plupart des tissus. Elle est organisée en réseaux plus ou moins compacts et ordonnés et forme parfois des structures hautement spécialisées et minéralisées, comme dans l'os.

Trois grands types de macromolécules sont synthétisés par les cellules de la MEC (Figure A2.1) :

1. **Des fibres protéiques** formant des édifices rigides ou élastiques : **le collagène et l'élastine**
2. **Des protéines (glycoprotéines) impliquées dans l'adhésion cellulaire comme la fibronectine**, la laminine et la vitronectine.
3. **Des polysaccharides, constituant des gels hydratés** : les glycosaminoglycanes (GAG) et les protéoglycanes.

C'est la présence d'une MEC qui permet l'association de cellules en tissus, et de tissus en organes. La MEC confère également des propriétés de résistance et de rigidité aux tissus présents à l'interface avec le milieu extérieur et joue un rôle de protection. De manière plus générale, la

⁵³ Basé sur **Tracqui, P. and Demongot, J.** (2003). Elements de biologie à l'usage d'autres disciplines.

MEC participe aux propriétés mécaniques des tissus. Le collagène assure ainsi une résistance aux forces de traction et les GAG une résistance aux forces de compression.

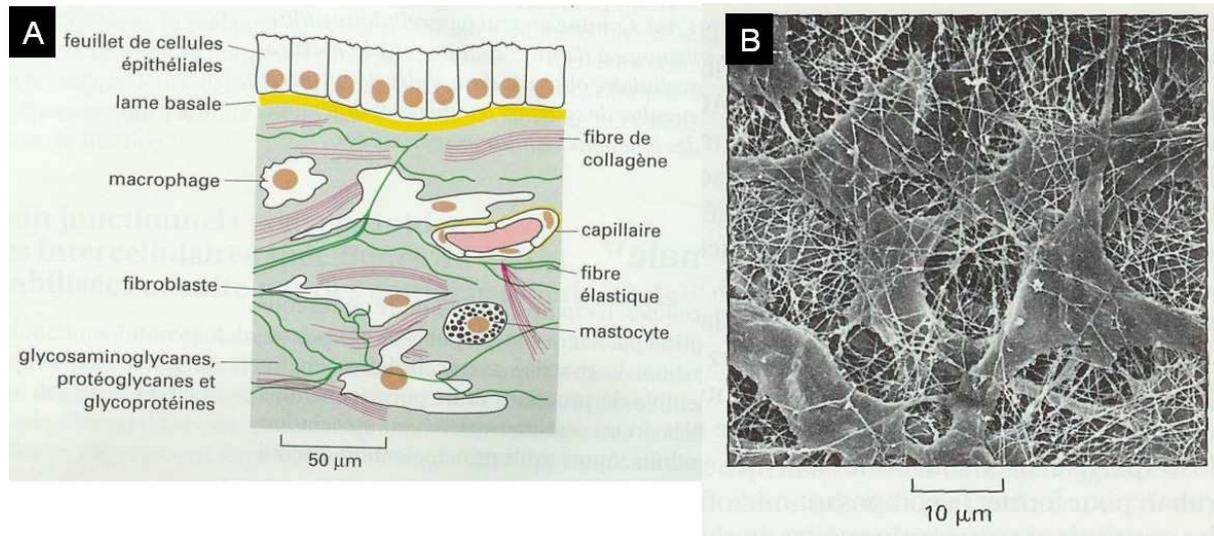


Figure A2.1.

(A) La matrice extracellulaire, ainsi que les différentes cellules qui la compose. L'ensemble forme ce que l'on appelle tissu conjonctif. (B) cliché de microscopie électronique à balayage de fibroblastes du tissu conjonctif de la cornée d'un rat. Seul les fibrilles de collagènes sont visibles (les glycoprotéines glycosaminoglycane et protéoglycane, qui forment normalement un gel hydraté remplissant les interstices du réseau fibreux ont été éliminés). D'après (Alberts et al., 1990).

Les fibres protéiques

Les collagènes, principales protéines de la MEC, jouent un rôle structural essentiel à l'échelle des tissus et des organes. Le collagène de type I, le plus abondant, est le constituant principal de la peau, des os, des tendons et de la cornée. La synthèse du collagène est faite par les fibroblastes. Le collagène est renouvelé en permanence dans les tissus. Il est dégradé par les collagénases, également sécrétées par les fibroblastes présents dans la MEC, mais aussi par les macrophages et les polynucléaires d'origine sanguine.

Les fibres élastiques permettent aux tissus de retrouver leur forme après un étirement transitoire. Elles sont principalement constituées d'une protéine très hydrophobe : l'élastine.

Synthétisées par les fibroblastes, les fibres élastiques établissent des liaisons avec le collagène et les polysaccharides de la MEC. Cet entrelacement limite l'étirement du réseau élastique, évitant les déchirures des tissus très déformables. Elles peuvent, comme le collagène, être dégradées par un enzyme, l'élastase, sécrété par les macrophages et les polynucléaires présents dans la MEC.

Les glycoprotéines

Ces protéines interviennent dans l'adhésion et donc également dans la migration cellulaire. Les mieux connues sont la fibronectine, qui assure l'adhésion des fibroblastes à la MEC et la laminine, spécifique des tissus de revêtement, qui permet l'adhésion des cellules épithéliales à la lame basale.

Dans le cas de la fibronectine, des sites de liaison avec le collagène sont présents sur cette protéine dimérique de 100 nm de long. **L'adhésion cellulaire est possible grâce à la présence des séquences spécifiques** des 3 acides aminés (arginine, glycine, acide aspartique), **dites séquences RGD, reconnus spécifiquement par des molécules d'adhésion cellulaire présentes sur la membrane cellulaire, les intégrines** (voir page suivante). En établissant des liaisons faibles mais multiples, le collagène, la fibronectine et la laminine permettent aux cellules d'explorer leur environnement tout en maintenant des sites d'adhérences à la matrice.

Les polysaccharides

Les glycosaminoglycans (GAG) sont constitués de chaînes non ramifiées de polysaccharides. Le plus simple des GAG est l'acide hyaluronique, abondant dans les tissus embryonnaires, il facilite la migration des cellules au cours du développement.

Les GAG, en raison de l'importance de leurs charges négatives, piègent les molécules d'eau en **formant des gels gonflés et visqueux remplissant la plus grande partie de l'espace extracellulaire**. Ce sont entre autre, ces gels hydratés qui fournissent un support mécanique aux tissus et qui permettent la diffusion rapide de molécules hydrosolubles.

Les molécules d'adhésion cellulaire

Les études biochimiques sur les molécules d'adhérence cellulaire ont permis d'identifier et d'analyser un grand nombre de ces protéines. En particulier, les techniques de clonage ont permis de connaître leurs séquences en acides aminés et de les regrouper en 4 grandes familles, en fonction de leurs homologies structurales et fonctionnelles : **les sélectines, la superfamille des immunoglobulines, les intégrines et les cadhérines** (Figure A2.2). **Ces protéines sont ancrées dans la membrane et possèdent un domaine cytoplasmique, un domaine membranaire et un domaine extracellulaire. On les appelle également protéines transmembranaires**. Ce sont elles qui établissent les liens entre l'extérieur (les protéines formant la matrice extracellulaire ou d'autres protéines transmembranaires) et l'intérieur de la cellule (les protéines formant le cytosquelette).

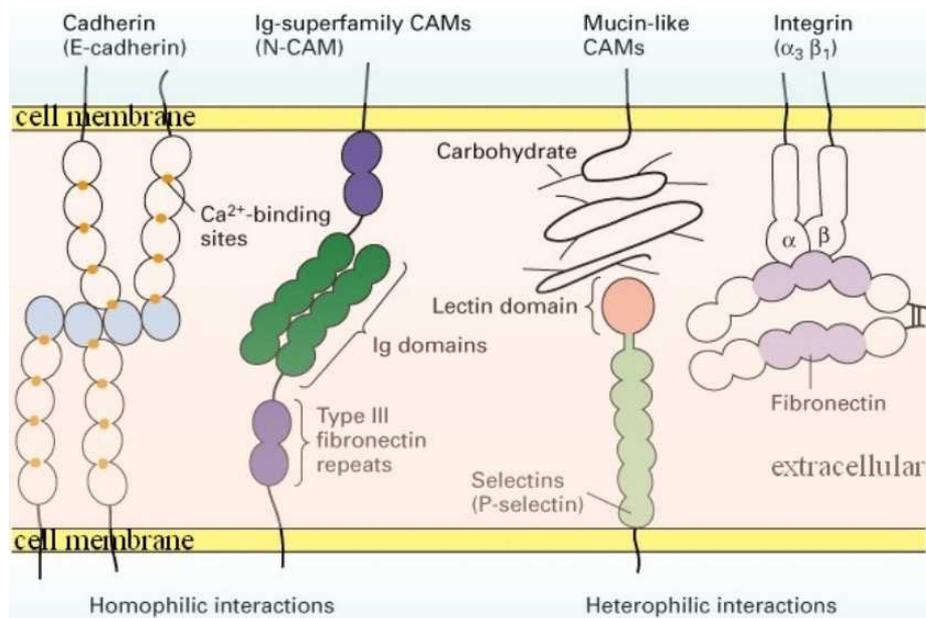


Figure A2.2. Les quatre grandes familles de molécules d'adhésion.

Les sélectines

Les sélectines sont exprimées uniquement par les cellules du système vasculaire des vertébrés. Trois types de sélectines ont été identifiées jusqu'à présent et leur nom dérive du type cellulaire où elles sont exprimées : la L-sélectine, exprimée par les leucocytes, la P-sélectine exprimée par les plaquettes et les cellules endothéliales, et la E-sélectine, exprimée uniquement sur les cellules endothéliales.

Les sélectines et leurs ligands jouent un rôle primordial dans les processus d'adhésion des leucocytes sur l'endothélium vasculaire et de transmigration en vue de s'infiltrer au sein du tissu lésé.

Les intégrines

Les intégrines sont les principaux récepteurs impliqués dans l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire. Elles sont composées de 2 sous-unités : une chaîne α et une chaîne β liée de manière non covalente. À ce jour, 24 intégrines différentes sont répertoriées. Beaucoup interagissent avec la matrice extracellulaire, notamment avec les vitronectines, fibronectines, laminines et les collagènes. Certaines d'entre elles sont également impliquées, en collaborations avec les sélectines, dans l'adhérence des leucocytes aux cellules endothéliales.

Le rôle clé des intégrines dans la transmission de signaux extracellulaires vers l'intérieur de la cellule a également été mis en évidence dans de nombreux systèmes expérimentaux (Dedhar and Hannigan, 1996). Ces signaux peuvent alors initier des réponses cellulaires aussi

variées que l'adhésion (Koo et al., 2002), la différenciation (Gumbiner, 1996 ; Keselowsky et al., 2005; Rosner et al., 2005), la prolifération (Dalby et al., 2003), ou encore et surtout dans le cas qui nous intéresse, la migration cellulaire (Friedl and Brocker, 2000; Maheshwari et al., 2000).

Les intégrines apparaissent donc comme des protéines clés dans l'interaction cellule/matrice extracellulaire.

La superfamille des immunoglobulines (Ig)

Cette famille représente en nombre la plus importante des familles de molécules de surface membranaire, avec plus d'une centaine de molécules différentes. Ces molécules sont impliquées dans les mécanismes de reconnaissance cellule-cellule et lors du développement embryonnaire. Elles regroupent entre autre toutes les molécules de type CAM (Cell adhesion Molecule). Certaines d'entre elles se lient aux intégrines, comme les ICAMs par exemple, (Intercellular CAM) qui sont exprimées à la surface des cellules endothéliales et qui reconnaissent des intégrines spécifiques aux leucocytes.

Les cadhérines

Les cadhérines sont des protéines adhésives de communication entre cellules. Ces protéines adhésives calcium-dépendantes sont localisées au niveau de jonctions dites adhérentes. Les cadhérines semblent jouer un rôle fondamental dans de nombreux processus normaux et pathologiques et la recherche sur cette famille de protéine est en pleine expansion actuellement.

Si la partie extracellulaire des cadhérines interagit avec d'autres cadhérines de cellules voisines, la partie intracellulaire communique avec des protéines cytoplasmiques appelées les caténines, qui assurent l'ancrage des cadhérines aux microfilaments d'actine du cytosquelette.

Le cytosquelette

Le cytosquelette est une structure tridimensionnelle dynamique à l'intérieur du cytoplasme et qui forme l'armature fibreuse de la cellule. Impliqué dans le maintien de la forme de la cellule, mais également dans le transport d'organites, et dans la division, l'adhésion et la migration cellulaire, c'est un des composants clés de la cellule. **Dans une cellule eucaryote, le cytosquelette est constitué de 3 réseaux de filaments (Figure A2.3) : (1) les filaments d'actines, (2) les microtubules et (3) les filaments intermédiaires.** Ces filaments diffèrent par leur taille et leur fonction à l'intérieur de la cellule.

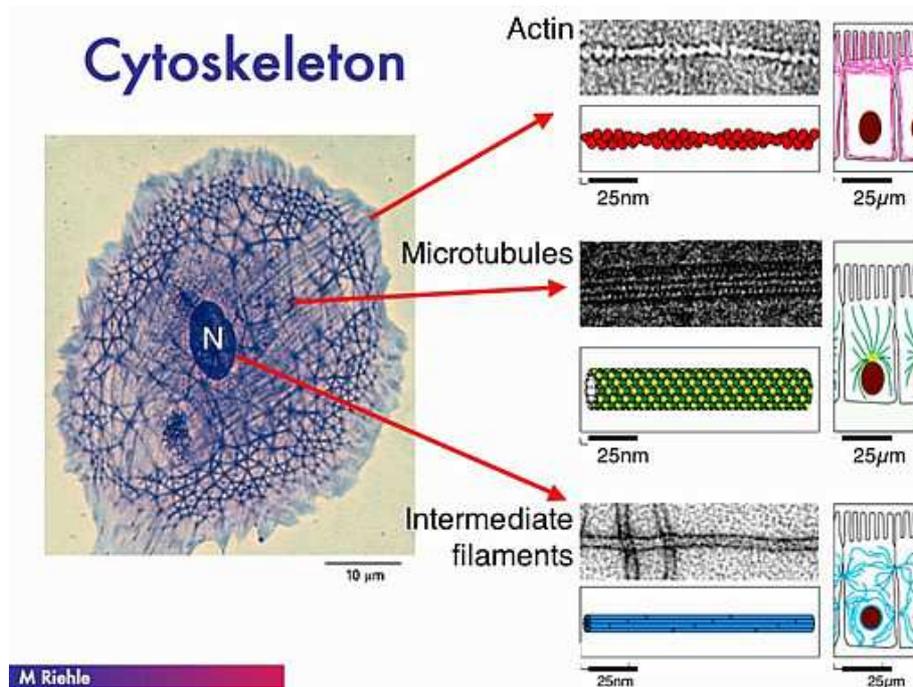


Figure A2.3 Le cytosquelette avec ces trois types de filaments. D'après M. Riehle, <http://www.gla.ac.uk/centres/cellengineering/Teaching-at-CCE>.

Les microfilaments

Les microfilaments sont des fibres de 3 à 6 nm composées principalement d'actine. L'actine existe sous deux formes : une forme monomérique (nommée actine Globulaire ou actine G) et une forme polymérique (sous forme de filaments, nommé actine F ou fibrillaire).

Dans l'état d'équilibre thermodynamique, les molécules d'actine sont sans cesse transportées de l'extrémité plus (ou extrémité « barbée ») où elles s'associent, vers l'extrémité moins où elles se dissocient. Ce processus est connu sous le nom de « tapis roulant » (treadmilling en anglais).

Ce mécanisme de polymérisation et dépolymérisation nécessite de l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP (Adénosine Tri-Phosphate). La longueur des filaments est également régulée par des protéines de « coiffe », qui viennent se fixer aux extrémités du filament et empêchent ainsi la polymérisation ou la dépolymérisation de l'actine.

L'interaction de ces filaments d'actine avec les myosines est responsable de la contraction cellulaire. Ce phénomène est particulièrement important dans la migration cellulaire. **Les filaments d'actine sont d'ailleurs concentrés dans des régions de l'espace intracellulaire où la motilité est initiée.**

Les Myosines

Même si les myosines ne sont pas considérées comme des éléments du cytosquelette, ces moteurs moléculaires sont très importants pour le fonctionnement de l'actine et la génération de forces.

C'est pourquoi elles doivent également être considérées ici. Il existe plusieurs types de myosines, parmi lesquelles la myosine II, qui est la myosine responsable de la contraction des filaments d'actine (Figure A2.4). Le meilleur exemple d'interaction myosine II/actine est dans les cellules musculaires. Les têtes de myosine globulaires s'attachent aux filaments d'actine et hydrolysent de l'ATP. Chaque molécule d'actine dans un filament d'actine est capable de se lier à une tête de myosine II pour former un complexe. Les têtes de myosines « marchent » alors le long du filament d'actine. Cette « marche » ne se fait que dans une direction : vers l'extrémité plus et permet une action contractile. Ces moteurs moléculaires convertissent ainsi l'énergie chimique issue de l'hydrolyse de l'ATP en travail mécanique.

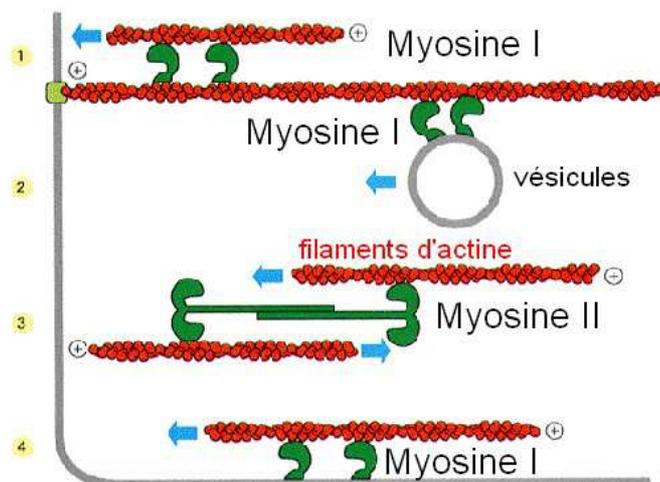


Figure A2.4. Rôle possible de la myosine I et II dans une cellule eucaryote. D'après (Alberts et al., 1990).

La courte queue d'une myosine I contient des sites qui peuvent lier soit d'autres filaments d'actines (1 et 4), soit des membranes (2 et 4). Cela permet au domaine de tête de déplacer un filament d'actine par rapport à l'autre (1), ou un filament d'actine et une membrane l'un par rapport à l'autre (4). **La myosine II a double tête peut s'assembler de façon antiparallèle (3) pour faire glisser des filaments d'actines l'un par rapport à l'autre, provoquant ainsi des contractions locales dans un faisceau de filaments d'actine.**

Les filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires sont des filaments polymériques légèrement plus gros, avec un diamètre d'environ 10 nm. La structure de ces filaments est stable et ne nécessite donc pas d'énergie supplémentaire. Ils sont formés de plusieurs types de protéines comme la kératine, la desmine ou la vimentine et sont impliqués entre autres dans la connexion intercellulaire.

Les microtubules

Les microtubules sont des tubes cylindriques de 24 nm de diamètre formés de tubuline qui peuvent atteindre des longueurs de plusieurs micromètres. Le réseau de microtubules est organisé autour d'un centrosome. Comme les filaments d'actine, les microtubules sont

instables et leur polymérisation nécessite l'énergie de l'hydrolyse du GTP (Guanosine Tri-Phosphate). Les microtubules sont particulièrement importants dans le maintien de la forme cellulaire et dans le transport intracellulaire. Ils forment également le fuseau mitotique nécessaire à la séparation des chromosomes lors de la mitose.

Jonctions cellule/matrice extracellulaire : points focaux d'adhésion

Pour s'attacher sur un support, que ce soit de façon transitoire (migration) ou persistante, la cellule a besoin de points d'ancrage sur la matrice extracellulaire. Ces points d'ancrage, constitués d'un échafaudage de protéines sont appelés **points focaux d'adhésion** ou plaque d'adhérence. Parmi ces protéines de liaisons entre les filaments d'actine et la matrice extracellulaire, on retrouve bien évidemment les intégrines, mais également des protéines cytoplasmiques telles que la taline, l' α -actinine et la vinculine.

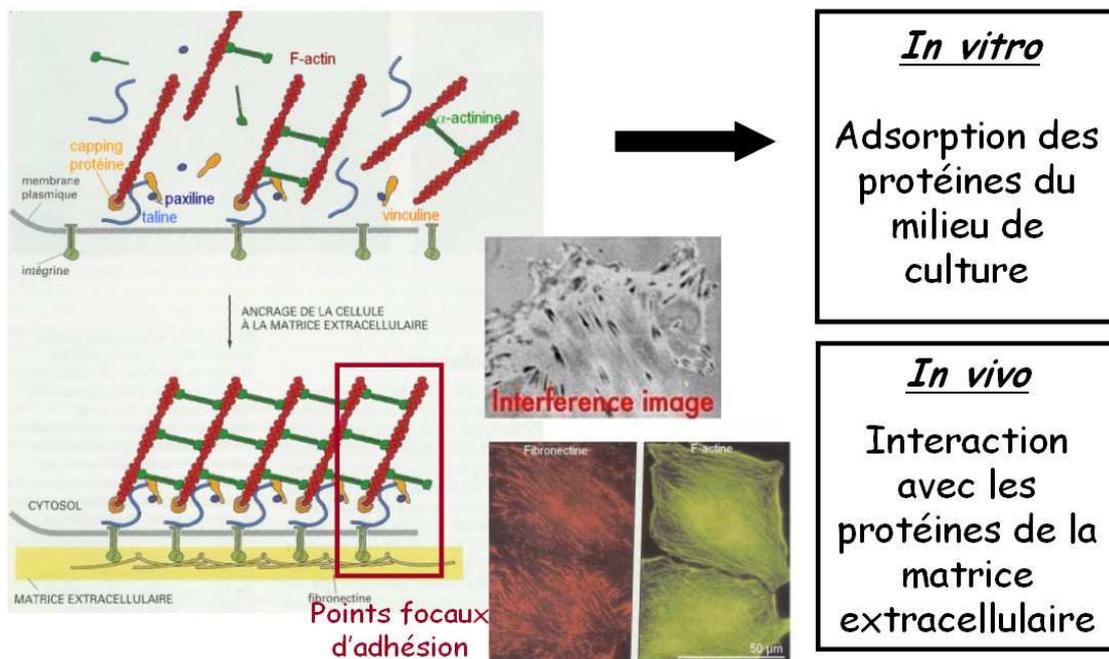


Figure A2.5

Mise en place des points focaux d'adhésion et modifications de l'architecture du cytosquelette qui s'en suit (réorganisation des filaments d'actines). D'après (Alberts et al., 1990).

La formation d'un contact focal se produit lorsque des glycoprotéines matricielles telles que les fibronectines se lient aux intégrines et provoquent leur regroupement au niveau de ces contacts. La liaison fibronectine/intégrine provoque ainsi le réarrangement de nombreuses protéines intracellulaires, qui s'organisent autour des filaments d'actine. Le réseau de fibronectine module

ainsi l'architecture intracellulaire. Il est possible de visualiser ces points focaux d'adhésion par microscopie interférentielle par réflexion (points noirs sur l'image).

Interactions des différents partenaires

Comme évoqué précédemment, les partenaires impliqués dans l'adhésion et la migration sont en continuel échange. Ainsi, on peut noter l'importance du réseau d'actine et de microtubules dans la régulation de la dynamique des points focaux d'adhésion (Wehrle-Haller and Imhof, 2003). Inversement, la concentration en protéines de la matrice extracellulaire ainsi que le niveau d'expression des molécules adhésives influent sur la vitesse de migration des cellules. Pour les fibroblastes par exemple, la vitesse de migration est optimale pour des concentrations intermédiaires en protéines matricielles (Palecek et al., 1996). Lorsque la concentration est trop faible, la cellule n'adhère pas suffisamment pour générer les forces de traction nécessaires à sa migration. A l'opposé, pour des concentrations trop fortes, la cellule adhère si fortement qu'elle ne peut plus se déplacer.

Annexe 3 :

Magnetohydrodynamics

Vol. 40 (2004), No. 4, pp. 321–335

**Annexe 3 : Magneto hydrodynamics, Vol. 40
(2004), No. 4, pp. 321–335**

Références

Aarum, J., Sandberg, K., Haerberlein, S. L. and Persson, M. A. (2003). Migration and differentiation of neural precursor cells can be directed by microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15983-8.

Abney, J. R., Meliza, C. D., Cutler, B., Kingma, M., Lochner, J. E. and Scalettar, B. A. (1999). Real-time imaging of the dynamics of secretory granules in growth cones. *Biophys J* **77**, 2887-95.

Adonai, N., Nguyen, K. N., Walsh, J., Iyer, M., Toyokuni, T., Phelps, M. E., McCarthy, T., McCarthy, D. W. and Gambhir, S. S. (2002). Ex vivo cell labeling with ⁶⁴Cu-pyruvaldehyde-bis(N4-methylthiosemicarbazone) for imaging cell trafficking in mice with positron-emission tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3030-5.

Alaux, A. (1992). L'image par résonance magnétique: Sauramps Medical.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, D. J. (1990). Biologie moléculaire de la cellule, troisième édition.

Alexiou, C., Arnold, W., Klein, R. J., Parak, F. G., Hulin, P., Bergemann, C., Erhardt, W., Wagenpfeil, S. and Lubbe, A. S. (2000). Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. *Cancer Res* **60**, 6641-8.

Alexiou, C., Jurgons, R., Schmid, R. J., Bergemann, C., Henke, J., Erhardt, W., Huenges, E. and Parak, F. (2003). Magnetic drug targeting--biodistribution of the magnetic carrier and the chemotherapeutic agent mitoxantrone after locoregional cancer treatment. *J Drug Target* **11**, 139-49.

Allaire, E., Dai, J., Schneider, F., Jousset, Y., Losy, F., Van Laere, O., Pages, C., Smedile, G., Guinault, A. M., Ginat, M. et al. (2004a). Local endovascular treatment of aortic aneurysms. From operating theater to lab bench. *Arch Mal Coeur Vaiss* **97**, 894-8.

Allaire, E., Forough, R., Clowes, M., Starcher, B. and Clowes, A. W. (1998). Local overexpression of TIMP-1 prevents aortic aneurysm degeneration and rupture in a rat model. *J Clin Invest* **102**, 1413-20.

Allaire, E., Guettier, C., Bruneval, P., Plissonnier, D. and Michel, J. B. (1994). Cell-free arterial grafts: morphologic characteristics of aortic isografts, allografts, and xenografts in rats. *J Vasc Surg* **19**, 446-56.

Allaire, E., Muscatelli-Groux, B., Guinault, A. M., Pages, C., Goussard, A., Mandet, C., Bruneval, P., Mellièrè, D. and Becquemin, J. P. (2004b). Vascular smooth muscle cell endovascular therapy stabilizes already developed aneurysms in a model of aortic injury elicited by inflammation and proteolysis. *Ann Surg* **239**, 417-27.

Allaire, E., Muscatelli-Groux, B., Mandet, C., Guinault, A. M., Bruneval, P., Desgranges, P., Clowes, A., Mellièrè, D. and Becquemin, J. P. (2002). Paracrine effect of vascular smooth muscle cells in the prevention of aortic aneurysm formation. *J Vasc Surg* **36**, 1018-26.

Allport, J. R. and Weissleder, R. (2001). In vivo imaging of gene and cell therapies. *Exp Hematol* **29**, 1237-46.

Anderson, S. A., Glod, J., Arbab, A. S., Noel, M., Ashari, P., Fine, H. A. and Frank, J. A. (2005). Noninvasive MR imaging of magnetically labeled stem cells to directly identify neovasculature in a glioma model. *Blood* **105**, 420-5.

Arbab, A. S., Jordan, E. K., Wilson, L. B., Yocum, G. T., Lewis, B. K. and Frank, J. A. (2004). In vivo trafficking and targeted delivery of magnetically labeled stem cells. *Hum Gene Ther* **15**, 351-60.

Arhets, P., Gounon, P., Sansonetti, P. and Guillen, N. (1995). Myosin II is involved in capping and uroid formation in the human pathogen *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* **63**, 4358-67.

Arias, J. L., Gallardo, V., Gomez-Lopera, S. A., Plaza, R. C. and Delgado, A. V. (2001). Synthesis and characterization of poly(ethyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles with a magnetic core. *J Control Release* **77**, 309-21.

Ashkin, A., Schutze, K., Dziedzic, J. M., Euteneuer, U. and Schliwa, M. (1990). Force generation of organelle transport measured in vivo by an infrared laser trap. *Nature* **348**, 346-8.

Bacri, J. C., Cabuil, V., Massart, R., Perzynski, R. and Salin, D. (1987a). Ionic ferrofluid: Optical properties. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **65**, 285-288.

Bacri, J.-C., Perzynski, R., Salin, D., Cabuil, V. and Massart, R. (1986). Magnetic colloidal properties of ionic ferrofluids. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **62**, 36-46.

Bacri, J.-C., Perzynski, R., Salin, D. and Servais, J. (1987b). *J. Phys. (Paris)* **48**, 1385.

Balaban, N. Q., Schwarz, U. S., Rivelino, D., Goichberg, P., Tzur, G., Sabanay, I., Mahalu, D., Safran, S., Bershadsky, A., Addadi, L. et al. (2001). Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat Cell Biol* **3**, 466-72.

Battle, T., Arnal, J. F., Challah, M. and Michel, J. B. (1994). Selective isolation of rat aortic wall layers and their cell types in culture--application to converting enzyme activity measurement. *Tissue Cell* **26**, 943-55.

Bausch, A. R., Moller, W. and Sackmann, E. (1999). Measurement of local viscoelasticity and forces in living cells by magnetic tweezers. *Biophys J* **76**, 573-9.

Begley, D. J. (2004). Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities. *Pharmacol Ther* **104**, 29-45.

Belousov, L. V., Dorfman, J. G. and Cherdantzev, V. G. (1975). Mechanical stresses and morphological patterns in amphibian embryos. *J Embryol Exp Morphol* **34**, 559-74.

Bendszus, M., Martin-Schrader, I., Schlake, H. P. and Solymosi, L. (2003). Embolisation of intracranial meningiomas without subsequent surgery. *Neuroradiology* **45**, 451-5.

Bendszus, M., Rao, G., Burger, R., Schaller, C., Scheinemann, K., Warmuth-Metz, M., Hofmann, E., Schramm, J., Roosen, K. and Solymosi, L. (2000). Is there a benefit of preoperative meningioma embolization? *Neurosurgery* **47**, 1306-11; discussion 1311-2.

Bendszus, M., Warmuth-Metz, M., Klein, R., Bartsch, A. J., Krone, A., Tonn, J. C. and Solymosi, L. (2002). Sequential MRI and MR spectroscopy in embolized meningiomas: correlation with surgical and histopathological findings. *Neuroradiology* **44**, 77-82.

Ben-Hur, T., Einstein, O., Mizrachi-Kol, R., Ben-Menachem, O., Reinhartz, E., Karussis, D. and Abramsky, O. (2003). Transplanted multipotential neural precursor cells migrate into the inflamed white matter in response to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia* **41**, 73-80.

Benoit, J. P., Faisant, N., Venier-Julienne, M. C. and Menei, P. (2000a). Development of microspheres for neurological disorders: from basics to clinical applications. *J Control Release* **65**, 285-96.

Benoit, M., Gabriel, D., Gerisch, G. and Gaub, H. E. (2000b). Discrete interactions in cell adhesion measured by single-molecule force spectroscopy. *Nat Cell Biol* **2**, 313-7.

Bershadsky, A. D., Balaban, N. Q. and Geiger, B. (2003). Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 677-95.

Billotey, C., Wilhelm, C., Devaud, M., Bacri, J. C., Bittoun, J. and Gazeau, F. (2003). Cell internalization of anionic maghemite nanoparticles: quantitative effect on magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med* **49**, 646-54.

Bischofs, I. B. and Schwarz, U. S. (2003). Cell organization in soft media due to active mechanosensing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9274-9.

- Bittoun, J.** (2004). L'imagerie par résonance magnétique, cours donné au PCEM2 de l'UFR médicale de kremlin Bicêtre: publié en ligne (<http://www.kb.u-psud.fr/kb/niveau2/enseignements/niveau3/etudmed/cours-irm/accueil.htm>).
- Borenstein, N., Hekmati, M., Bruneval, P. and Montarras, D.** (2004). Unambiguous identification of implanted cells after cellular cardiomyoplasty: a critical issue. *Circulation* **109**, e209-10; author reply e209-10.
- Bottino, D., Mogilner, A., Roberts, T., Stewart, M. and Oster, G.** (2002). How nematode sperm crawl. *J Cell Sci* **115**, 367-84.
- Boudghene, F. P., Sapoval, M. R., Bonneau, M., LeBlanche, A. F., Lavaste, F. C. and Michel, J. B.** (1998). Abdominal aortic aneurysms in sheep: prevention of rupture with endoluminal stent-grafts. *Radiology* **206**, 447-54.
- Bray, D.** (1992). Cell movements: Garland publishing, inc.
- Broadus, W. C., Gillies, G. T. and Kucharczyk, J.** (2001). Minimally invasive procedures. Advances in image-guided delivery of drug and cell therapies into the central nervous system. *Neuroimaging Clin N Am* **11**, 727-35.
- Bruckert, F., Decave, E., Garrivier, D., Cosson, P., Brechet, Y., Fourcade, B. and Satre, M.** (2002). Dictyostelium discoideum adhesion and motility under shear flow: experimental and theoretical approaches. *J Muscle Res Cell Motil* **23**, 651-8.
- Buehler, C., Kim, K. H., Dong, C. Y., Masters, B. R. and So, P. T.** (1999). Innovations in two-photon deep tissue microscopy. *IEEE Eng Med Biol Mag* **18**, 23-30.
- Bulte, J. W., Douglas, T., Witwer, B., Zhang, S. C., Strable, E., Lewis, B. K., Zywicke, H., Miller, B., van Gelderen, P., Moskowitz, B. M. et al.** (2001). Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells. *Nat Biotechnol* **19**, 1141-7.
- Bulte, J. W. and Kraitchman, D. L.** (2004). Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. *NMR Biomed* **17**, 484-99.
- Burton, K., Park, J. H. and Taylor, D. L.** (1999). Keratocytes generate traction forces in two phases. *Mol Biol Cell* **10**, 3745-69.
- Burton, K. and Taylor, D. L.** (1997). Traction forces of cytokinesis measured with optically modified elastic substrata. *Nature* **385**, 450-4.
- Butler, J. P., Tolic-Norrelykke, I. M., Fabry, B. and Fredberg, J. J.** (2002). Traction fields, moments, and strain energy that cells exert on their surroundings. *Am J Physiol Cell Physiol* **282**, C595-605.

Caille, N., Thoumine, O., Tardy, Y. and Meister, J. J. (2002). Contribution of the nucleus to the mechanical properties of endothelial cells. *J Biomech* **35**, 177-87.

Calderon, J. and Avila, E. E. (1986). Antibody-induced caps in *Entamoeba histolytica*: isolation and electrophoretic analysis. *J Infect Dis* **153**, 927-32.

Cameron, L. A., Giardini, P. A., Soo, F. S. and Theriot, J. A. (2000). Secrets of actin-based motility revealed by a bacterial pathogen. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 110-9.

Cannon, M. J., Santin, A. D. and O'Brien, T. J. (2004). Immunological treatment of ovarian cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol* **16**, 87-92.

Chan, W. L., Pejnovic, N., Hamilton, H., Liew, T. V., Popadic, D., Poggi, A. and Khan, S. M. (2005). Atherosclerotic abdominal aortic aneurysm and the interaction between autologous human plaque-derived vascular smooth muscle cells, type 1 NKT, and helper T cells. *Circ Res* **96**, 675-83.

Chappell, D. C., Varner, S. E., Nerem, R. M., Medford, R. M. and Alexander, R. W. (1998). Oscillatory shear stress stimulates adhesion molecule expression in cultured human endothelium. *Circ Res* **82**, 532-9.

Chekhonin, V. P., Zhirkov, Y. A., Gurina, O. I., Ryabukhin, I. A., Lebedev, S. V., Kashparov, I. A. and Dmitriyeva, T. B. (2005). PEGylated immunoliposomes directed against brain astrocytes. *Drug Deliv* **12**, 1-6.

Chemla, Y. R., Grossman, H. L., Lee, T. S., Clarke, J., Adamkiewicz, M. and Buchanan, B. B. (1999). A new study of bacterial motion: superconducting quantum interference device microscopy of magnetotactic bacteria. *Biophys J* **76**, 3323-30.

Chemla, Y. R., Grossman, H. L., Poon, Y., McDermott, R., Stevens, R., Alper, M. D. and Clarke, J. (2000). Ultrasensitive magnetic biosensor for homogeneous immunoassay. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14268-72.

Chen, C. S., Tan, J. and Tien, J. (2004). Mechanotransduction at cell-matrix and cell-cell contacts. *Annu Rev Biomed Eng* **6**, 275-302.

Chen, L., Janetopoulos, C., Huang, Y. E., Iijima, M., Borleis, J. and Devreotes, P. N. (2003). Two phases of actin polymerization display different dependencies on PI(3,4,5)P3 accumulation and have unique roles during chemotaxis. *Mol Biol Cell* **14**, 5028-37.

Chen, M. Y., Insall, R. H. and Devreotes, P. N. (1996). Signaling through chemoattractant receptors in *Dictyostelium*. *Trends Genet* **12**, 52-7.

Choquet, D., Felsenfeld, D. P. and Sheetz, M. P. (1997). Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages. *Cell* **88**, 39-48.

- Circulation.** (2005). Late-Breaking Developments in Stem Cell Biology and Cardiac Growth Regulation. *Circulation* **111**, 1720-1724.
- Cochlovius, B., Perschl, A., Adema, G. J. and Zoller, M.** (1999). Human melanoma therapy in the SCID mouse: in vivo targeting and reactivation of melanoma-specific cytotoxic T cells by bi-specific antibody fragments. *Int J Cancer* **81**, 486-93.
- Collombet, J. M., Four, E., Burckhart, M. F., Masqueliez, C., Bernabe, D., Baubichon, D., Herodin, F. and Lallement, G.** (2005). Effect of cytokine treatment on the neurogenesis process in the brain of soman-poisoned mice. *Toxicology* **210**, 9-23.
- Contag, C. H. and Ross, B. D.** (2002). It's not just about anatomy: in vivo bioluminescence imaging as an eyepiece into biology. *J Magn Reson Imaging* **16**, 378-87.
- Coristine, A., Foster, P. J., Deoni, S., Heyn, C. and Rutt, B. K.** (2004). Positive contrast labeling of SPIO loaded cells in cell samples and spinal cord injury. *Proc. Int. Soc. Magn. Reson. Med.* **12**, 163.
- Coudrier, E., Amblard, F., Zimmer, C., Roux, P., Olivo-Marin, J. C., Rigotherier, M. C. and Guillen, N.** (2005). Myosin II and the Gal-GalNAc lectin play a crucial role in tissue invasion by *Entamoeba histolytica*. *Cell Microbiol* **7**, 19-27.
- Cousin, F.** (2000). Comportement de phase de colloides sphériques et plaquettaires. In *Thèse spécialité Matière condensée : Chimie et Organisation*. Paris: Paris 6.
- Cox, E. A. and Huttenlocher, A.** (1998). Regulation of integrin-mediated adhesion during cell migration. *Microsc Res Tech* **43**, 412-9.
- Cox, E. A., Sastry, S. K. and Huttenlocher, A.** (2001). Integrin-mediated adhesion regulates cell polarity and membrane protrusion through the Rho family of GTPases. *Mol Biol Cell* **12**, 265-77.
- Cullity.** (1972). Introduction to magnetic material.
- Curtis, A.** (2005). Cell forces in tissues. *Med Eng Phys.*
- Curtis, A. and Wilkinson, C.** (2001). Nantotechniques and approaches in biotechnology. *Trends Biotechnol* **19**, 97-101.
- Curtis, A. S.** (2004). Small is beautiful but smaller is the aim: review of a life of research. *Eur Cell Mater* **8**, 27-36.
- Curtis, A. S. and Seehar, G. M.** (1978). The control of cell division by tension or diffusion. *Nature* **274**, 52-3.
- Dalby, M. J.** (2005). Topographically induced direct cell mechanotransduction. *Med Eng Phys.*

Dalby, M. J., Childs, S., Riehle, M. O., Johnstone, H. J., Affrossman, S. and Curtis, A. S. (2003). Fibroblast reaction to island topography: changes in cytoskeleton and morphology with time. *Biomaterials* **24**, 927-35.

Daldrup-Link, H. E., Rudelius, M., Oostendorp, R. A., Settles, M., Piontek, G., Metz, S., Rosenbrock, H., Keller, U., Heinzmann, U., Rummeny, E. J. et al. (2003). Targeting of hematopoietic progenitor cells with MR contrast agents. *Radiology* **228**, 760-7.

Davis, F. G., Freels, S., Grutsch, J., Barlas, S. and Brem, S. (1998). Survival rates in patients with primary malignant brain tumors stratified by patient age and tumor histological type: an analysis based on Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) data, 1973-1991. *J Neurosurg* **88**, 1-10.

Decave, E., Garrivier, D., Brechet, Y., Bruckert, F. and Fourcade, B. (2002a). Peeling process in living cell movement under shear flow. *Phys Rev Lett* **89**, 108101.

Decave, E., Garrivier, D., Brechet, Y., Fourcade, B. and Bruckert, F. (2002b). Shear flow-induced detachment kinetics of Dictyostelium discoideum cells from solid substrate. *Biophys J* **82**, 2383-95.

Decave, E., Rieu, D., Dalous, J., Fache, S., Brechet, Y., Fourcade, B., Satre, M. and Bruckert, F. (2003). Shear flow-induced motility of Dictyostelium discoideum cells on solid substrate. *J Cell Sci* **116**, 4331-43.

Dedhar, S. and Hannigan, G. E. (1996). Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 657-69.

Dembo, M. and Wang, Y. L. (1999). Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts. *Biophys J* **76**, 2307-16.

Deng, Y., Wang, L., Yang, W., Fu, S. and Elaissari, A. (2003). Preparation of magnetic polymeric particles via inverse microemulsion polymerization process. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **257**, 69-78.

Despert, G. and Oberdisse, J. (2003). Formation of Micelle-Decorated Colloidal Silica by Adsorption of Nonionic Surfactant. *Langmuir* **19**, 7604 -7610.

Devreotes, P. and Janetopoulos, C. (2003). Eukaryotic chemotaxis: distinctions between directional sensing and polarization. *J Biol Chem* **278**, 20445-8.

Djamgoz, M. B. A., Mycielska, M., Madeja, Z., Fraser, S. P. and Korohoda, W. (2001). Directional movement of rat prostate cancer cells in direct-current electric field: involvement of voltagegated Na⁺ channel activity. *J Cell Sci* **114**, 2697-705.

Dodd, S. J., Williams, M., Suhan, J. P., Williams, D. S., Koretsky, A. P. and Ho, C. (1999). Detection of single mammalian cells by high-resolution magnetic resonance imaging. *Biophys J* **76**, 103-9.

Dormann, D. and Weijer, C. J. (2003). Chemotactic cell movement during development. *Curr Opin Genet Dev* **13**, 358-64.

Dormann, J. L. and Fiorani, D. (1991). Magnetic properties of fine particles.

du Roure, O., Saez, A., Buguin, A., Austin, R. H., Chavrier, P., Siberzan, P. and Ladoux, B. (2005). Force mapping in epithelial cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2390-5.

Dubost, C., Allary, M. and Oeconomos, N. (1952). Resection of an aneurysm of the abdominal aorta: reestablishment of the continuity by a preserved human arterial graft, with result after five months. *AMA Arch Surg* **64**, 405-8.

Edinger, M., Hoffmann, P., Contag, C. H. and Negrin, R. S. (2003). Evaluation of effector cell fate and function by in vivo bioluminescence imaging. *Methods* **31**, 172-9.

Elliott, S., Joss, G. H., Spudich, A. and Williams, K. L. (1993). Patterns in Dictyostelium discoideum: the role of myosin II in the transition from the unicellular to the multicellular phase. *J Cell Sci* **104 (Pt 2)**, 457-66.

Engelhard, H. H. (2001). Progress in the diagnosis and treatment of patients with meningiomas. Part I: diagnostic imaging, preoperative embolization. *Surg Neurol* **55**, 89-101.

Enpuku, K., Hotta, M. and Nakahodo, A. (2001). High-Tc SQUID system for biological immunoassays. *Physica C: Superconductivity* **357-360**, 1462-1465.

Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A. and Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* **4**, 1313-7.

Fabel, K., Dietrich, J., Hau, P., Wismeth, C., Winner, B., Przywara, S., Steinbrecher, A., Ullrich, W. and Bogdahn, U. (2001). Long-term stabilization in patients with malignant glioma after treatment with liposomal doxorubicin. *Cancer* **92**, 1936-42.

Fan, Y., Beilharz, M. W. and Grounds, M. D. (1996). A potential alternative strategy for myoblast transfer therapy: the use of sliced muscle grafts. *Cell Transplant* **5**, 421-9.

Fauconnier, N., Pons, J. N., Roger, J. and Bee, A. (1997). Thiolation of maghemite nanoparticles by dimercaptosuccinic acid. *J Colloid Interface Sci* **194**, 427-33.

Faulkner, W. (1996). Basic principle of MRI: copyright OutSource, Inc., publié en ligne (http://www.e-radiography.net/mrict/Basic_MR.pdf).

Flamand, V., Lespagnard, L., Thielemans, K., Leo, O., Urbain, J. and Moser, M. (1993). Enhancement of a spontaneous immune response against a B-cell lymphoma by dendritic cells leads to protection against the tumor. *Ann N Y Acad Sci* **690**, 382-4.

Floris, S., Blezer, E. L., Schreibelt, G., Dopp, E., van der Pol, S. M., Schadee-Eestermans, I. L., Nicolay, K., Dijkstra, C. D. and de Vries, H. E. (2004). Blood-brain barrier permeability and monocyte infiltration in experimental allergic encephalomyelitis: a quantitative MRI study. *Brain* **127**, 616-27.

Flynn, E. R. and Bryant, H. C. (2005). A biomagnetic system for in vivo cancer imaging. *Phys Med Biol* **50**, 1273-93.

Ford, J. W., Welling, T. H., 3rd, Stanley, J. C. and Messina, L. M. (1996). PKH26 and 125I-PKH95: characterization and efficacy as labels for in vitro and in vivo endothelial cell localization and tracking. *J Surg Res* **62**, 23-8.

Forgacs, G. (1995). On the possible role of cytoskeletal filamentous networks in intracellular signaling: an approach based on percolation. *J Cell Sci* **108 (Pt 6)**, 2131-43.

Fortin, J.-P., Martina, M.-S., Gazeau, F., Ménager, C., Wilhelm, C., J.-C.Bacri, Lesieur, S. and Clément, O. (2005). Magnetic targeting of magnetoliposomes in solid tumors with MRI monitoring in mice-feasibility. *Radiology* **accepted**.

Foster-Gareau, P., Heyn, C., Alejski, A. and Rutt, B. K. (2003). Imaging single mammalian cells with a 1.5 T clinical MRI scanner. *Magn Reson Med* **49**, 968-71.

Frank, J. A., Miller, B. R., Arbab, A. S., Zywicke, H. A., Jordan, E. K., Lewis, B. K., Bryant, L. H., Jr. and Bulte, J. W. (2003). Clinically applicable labeling of mammalian and stem cells by combining superparamagnetic iron oxides and transfection agents. *Radiology* **228**, 480-7.

Friedl, P. and Brocker, E. B. (2000). T cell migration in three-dimensional extracellular matrix: guidance by polarity and sensations. *Dev Immunol* **7**, 249-66.

Fukui, Y., Uyeda, T. Q., Kitayama, C. and Inoue, S. (2000). How well can an amoeba climb? *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10020-5.

Futrelle, R. P., Traut, J. and McKee, W. G. (1982). Cell behavior in Dictyostelium discoideum: preaggregation response to localized cyclic AMP pulses. *J Cell Biol* **92**, 807-21.

Galbraith, C. G. and Sheetz, M. P. (1997). A micromachined device provides a new bend on fibroblast traction forces. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9114-8.

Galbraith, C. G., Yamada, K. M. and Sheetz, M. P. (2002). The relationship between force and focal complex development. *J Cell Biol* **159**, 695-705.

Garcia-Garcia, E., Andrieux, K., Gil, S. and Couvreur, P. (2005). Colloidal carriers and blood-brain barrier (BBB) translocation: A way to deliver drugs to the brain? *Int J Pharm.*

Garrivier, D., Decave, E., Brechet, Y., Bruckert, F. and Fourcade, B. (2002). Peeling model for cell detachment. *Eur Phys J E Soft Matter* **8**, 79-97.

Gazeau, F., Bacri, J. C., Gendron, F., Perzynski, R., Raikher, Y. L., Stepanov, V. I. and Dubois, E. (1998). Magnetic resonance of ferrite nanoparticles:: evidence of surface effects. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **186**, 175-187.

Geldwerth, D., Helley, D., de Jong, K., Sabolovic, D., Sestier, C., Roger, J., Pons, J. N., Freyssinet, J. M., Devaux, P. F. and Kuypers, F. A. (1999). Detection of phosphatidylserine surface exposure on human erythrocytes using annexin V-ferrofluid. *Biochem Biophys Res Commun* **258**, 199-203.

Gemeinhart, R. A., Luo, D. and Saltzman, W. M. (2005). Cellular fate of a modular DNA delivery system mediated by silica nanoparticles. *Biotechnol Prog* **21**, 532-7.

Genove, G., DeMarco, U., Xu, H., Goins, W. F. and Ahrens, E. T. (2005). A new transgene reporter for in vivo magnetic resonance imaging. *Nat Med* **11**, 450-4.

Gerbal, F., Chaikin, P., Rabin, Y. and Prost, J. (2000). An elastic analysis of *Listeria monocytogenes* propulsion. *Biophys J* **79**, 2259-75.

Glockl, G., Brinkmeier, V., Aurich, K., Romanus, E., Weber, P. and Weitschies, W. (2005). Development of a liquid phase immunoassay by time-dependent measurements of the transient magneto-optical birefringence using functionalized magnetic nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **289**, 480-483.

Glogauer, M., Arora, P., Yao, G., Sokholov, I., Ferrier, J. and McCulloch, C. A. (1997). Calcium ions and tyrosine phosphorylation interact coordinately with actin to regulate cytoprotective responses to stretching. *J Cell Sci* **110 (Pt 1)**, 11-21.

Glogauer, M., Ferrier, J. and McCulloch, C. A. (1995). Magnetic fields applied to collagen-coated ferric oxide beads induce stretch-activated Ca²⁺ flux in fibroblasts. *Am J Physiol* **269**, C1093-104.

Gomes, D., Louedec, L., Plissonnier, D., Dauge, M. C., Henin, D., Osborne-Pellegrin, M. and Michel, J. B. (2001). Endoluminal smooth muscle cell seeding limits intimal hyperplasia. *J Vasc Surg* **34**, 707-15.

Gomez-Lopera, S. A., Plaza, R. C. and Delgado, A. V. (2001). Synthesis and Characterization of Spherical Magnetite/Biodegradable Polymer Composite Particles. *J Colloid Interface Sci* **240**, 40-47.

Gonzalez, S. and Tannous, Z. (2002). Real-time, in vivo confocal reflectance microscopy of basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* **47**, 869-74.

Grossman, H. L., Myers, W. R., Vreeland, V. J., Bruehl, R., Alper, M. D., Bertozzi, C. R. and Clarke, J. (2004). Detection of bacteria in suspension by using a superconducting quantum interference device. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 129-34.

Gruttner, C. and Teller, J. (1999). New types of silica-fortified magnetic nanoparticles as tools for molecular biology applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **194**, 8-15.

Guilford, W. H., Lantz, R. C. and Gore, R. W. (1995). Locomotive forces produced by single leukocytes in vivo and in vitro. *Am J Physiol* **268**, C1308-12.

Guillen, N. (1996). Role of signalling and cytoskeletal rearrangements in the pathogenesis of *Entamoeba histolytica*. *Trends Microbiol* **4**, 191-7.

Gumbiner, B. M. (1996). Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* **84**, 345-57.

Guo, M., Wu, M. H., Granger, H. J. and Yuan, S. Y. (2005). Focal adhesion kinase in neutrophil-induced microvascular hyperpermeability. *Microcirculation* **12**, 223-32.

Gussoni, E., Soneoka, Y., Strickland, C. D., Buzney, E. A., Khan, M. K., Flint, A. F., Kunkel, L. M. and Mulligan, R. C. (1999). Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* **401**, 390-4.

Hafeli, U. O. (2004). Magnetically modulated therapeutic systems. *Int J Pharm* **277**, 19-24.

Halbreich, A., Sabolovic, D., Sestier, C., Geldwerth, D., Pons, J. N. and Roger, J. (2000). US patent 6, vol. 150, pp. 181.

Hannigan, M., Zhan, L., Li, Z., Ai, Y., Wu, D. and Huang, C. K. (2002). Neutrophils lacking phosphoinositide 3-kinase gamma show loss of directionality during N-formyl-Met-Leu-Phe-induced chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3603-8.

Hardy, J., Edinger, M., Bachmann, M. H., Negrin, R. S., Fathman, C. G. and Contag, C. H. (2001). Bioluminescence imaging of lymphocyte trafficking in vivo. *Exp Hematol* **29**, 1353-60.

Harris, A. K., Wild, P. and Stopak, D. (1980). Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion. *Science* **208**, 177-9.

Hasmonay, E. (1998). Biréfringence Magnéto-optique statique et dynamique de colloïdes magnétiques. In *Physique des liquides*. Paris: Université Pierre et Marie Curie.

Hasmonay, E., Bee, A., Bacri, J.-C. and Perzynski, R. (1999). pH Effect on an Ionic Ferrofluid: Evidence of a Thixotropic Magnetic Phase. *J. Phys. Chem. B* **103**, 6421.

Hasmonay, E., Dubois, E., Bacri, J.-C., Perzynski, R., Raikher, Y. L. and Stepanov, V. I. (1998). Static magneto-optical birefringence of size-sorted α -Fe₂O₃ nanoparticles. *Eur. Phys. J. B* **5**, 859-867.

Hau, P., Fabel, K., Baumgart, U., Rummele, P., Grauer, O., Bock, A., Dietmaier, C., Dietmaier, W., Dietrich, J., Dudel, C. et al. (2004). Pegylated liposomal doxorubicin- efficacy in patients with recurrent high-grade glioma. *Cancer* **100**, 1199-207.

Haugh, J. M., Codazzi, F., Teruel, M. and Meyer, T. (2000). Spatial sensing in fibroblasts mediated by 3' phosphoinositides. *J Cell Biol* **151**, 1269-80.

Henson, J. W., Gaviani, P. and Gonzalez, R. G. (2005). MRI in treatment of adult gliomas. *Lancet Oncol* **6**, 167-75.

Herborn, C. U., Papanikolaou, N., Reszka, R., Grunberg, K., Schuler, D. and Debatin, J. F. (2003). [Magnetosomes as biological model for iron binding: relaxivity determination with MRI]. *Rofo* **175**, 830-4.

Hinds, K. A., Hill, J. M., Shapiro, E. M., Laukkanen, M. O., Silva, A. C., Combs, C. A., Varney, T. R., Balaban, R. S., Koretsky, A. P. and Dunbar, C. E. (2003). Highly efficient endosomal labeling of progenitor and stem cells with large magnetic particles allows magnetic resonance imaging of single cells. *Blood* **102**, 867-72.

Hoehn, M., Kustermann, E., Blunk, J., Wiedermann, D., Trapp, T., Wecker, S., Focking, M., Arnold, H., Hescheler, J., Fleischmann, B. K. et al. (2002). Monitoring of implanted stem cell migration in vivo: a highly resolved in vivo magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 16267-72.

Horwitz, R. and Webb, D. (2003). Cell migration. *Curr Biol* **13**, R756-9.

Hristov, M., Erl, W. and Weber, P. C. (2003). Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, 1185-9.

Hu, S., Eberhard, L., Chen, J., Love, J. C., Butler, J. P., Fredberg, J. J., Whitesides, G. M. and Wang, N. (2004). Mechanical anisotropy of adherent cells probed by a three-dimensional magnetic twisting device. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**, C1184-91.

Huang, H., Kamm, R. D. and Lee, R. T. (2004). Cell mechanics and mechanotransduction: pathways, probes, and physiology. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**, C1-11.

Iacob, G., Rotariu, O., Strachan, N. J. and Hafeli, U. O. (2004). Magnetizable needles and wires--modeling an efficient way to target magnetic microspheres in vivo. *Biorheology* **41**, 599-612.

Iijima, M., Huang, Y. E. and Devreotes, P. (2002). Temporal and spatial regulation of chemotaxis. *Dev Cell* **3**, 469-78.

Ingber, D. E. (2003). Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *J Cell Sci* **116**, 1157-73.

Irintchev, A. and Wernig, A. (1994). Denervation and reinnervation of muscle: physiological effects. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, S28-30.

Isacson, O., Bjorklund, L. M. and Schumacher, J. M. (2003). Toward full restoration of synaptic and terminal function of the dopaminergic system in Parkinson's disease by stem cells. *Ann Neurol* **53 Suppl 3**, S135-46; discussion S146-8.

Ito, A., Kuga, Y., Honda, H., Kikkawa, H., Horiuchi, A., Watanabe, Y. and Kobayashi, T. (2004). Magnetite nanoparticle-loaded anti-HER2 immunoliposomes for combination of antibody therapy with hyperthermia. *Cancer Lett* **212**, 167-75.

Ito, A., Shinkai, M., Honda, H. and Kobayashi, T. (2001). Heat-inducible TNF-alpha gene therapy combined with hyperthermia using magnetic nanoparticles as a novel tumor-targeted therapy. *Cancer Gene Ther* **8**, 649-54.

Ito, A., Tanaka, K., Kondo, K., Shinkai, M., Honda, H., Matsumoto, K., Saida, T. and Kobayashi, T. (2003). Tumor regression by combined immunotherapy and hyperthermia using magnetic nanoparticles in an experimental subcutaneous murine melanoma. *Cancer Sci* **94**, 308-13.

Jaiswal, J. K., Mattoussi, H., Mauro, J. M. and Simon, S. M. (2003). Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates. *Nat Biotechnol* **21**, 47-51.

Jalili, A., Makowski, M., Switaj, T., Nowis, D., Wilczynski, G. M., Wilczek, E., Chorazy-Massalska, M., Radzikowska, A., Maslinski, W., Bialy, L. et al. (2004). Effective photoimmunotherapy of murine colon carcinoma induced by the combination of photodynamic therapy and dendritic cells. *Clin Cancer Res* **10**, 4498-508.

Janson, L. W. and Taylor, D. L. (1993). In vitro models of tail contraction and cytoplasmic streaming in amoeboid cells. *J Cell Biol* **123**, 345-56.

Jeremic, B., Milicic, B., Grujicic, D., Dagovic, A., Aleksandrovic, J. and Nikolic, N. (2004). Clinical prognostic factors in patients with malignant glioma treated with combined modality approach. *Am J Clin Oncol* **27**, 195-204.

Joanny, J.-F., Jülicher, F. and Prost, J. (2003). Motion of an Adhesive Gel in a Swelling Gradient: A Mechanism for Cell Locomotion. *Phys. Rev. Lett.* **90**, 168102.

Johansson, C. B., Momma, S., Clarke, D. L., Risling, M., Lendahl, U. and Frisen, J. (1999). Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* **96**, 25-34.

Josephson, L., Tung, C. H., Moore, A. and Weissleder, R. (1999). High-efficiency intracellular magnetic labeling with novel superparamagnetic-Tat peptide conjugates. *Bioconjug Chem* **10**, 186-91.

Jung, C. W. and Jacobs, P. (1995). Physical and chemical properties of superparamagnetic iron oxide MR contrast agents: ferumoxides, ferumoxtran, ferumoxsil. *Magn Reson Imaging* **13**, 661-74.

Kabanov, A. V. and Batrakova, E. V. (2004). New technologies for drug delivery across the blood brain barrier. *Curr Pharm Des* **10**, 1355-63.

Kabanov, A. V., Batrakova, E. V. and Alakhov, V. Y. (2002). Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *J Control Release* **82**, 189-212.

Kawabata, K., Nagayama, M., Haga, H. and Sambongi, T. (2001). Mechanical effects on collective phenomena of biological systems: cell locomotion. *Current Applied Physics* **1**, 66-71.

Kawamoto, A., Tkebuchava, T., Yamaguchi, J., Nishimura, H., Yoon, Y. S., Milliken, C., Uchida, S., Masuo, O., Iwaguro, H., Ma, H. et al. (2003). Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation* **107**, 461-8.

Keselowsky, B. G., Collard, D. M. and Garcia, A. J. (2005). Integrin binding specificity regulates biomaterial surface chemistry effects on cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 5953-7.

Kim, J. H., Auerbach, J. M., Rodriguez-Gomez, J. A., Velasco, I., Gavin, D., Lumelsky, N., Lee, S. H., Nguyen, J., Sanchez-Pernaute, R., Bankiewicz, K. et al. (2002). Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* **418**, 50-6.

Kimoto, Y. (1992). Use of human leukocyte antigen-mismatched allogeneic lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 in the adoptive immunotherapy of patients with malignancies. *Hum Cell* **5**, 226-35.

Kircher, M. F., Allport, J. R., Graves, E. E., Love, V., Josephson, L., Lichtman, A. H. and Weissleder, R. (2003). In vivo high resolution three-dimensional imaging of antigen-specific cytotoxic T-lymphocyte trafficking to tumors. *Cancer Res* **63**, 6838-46.

Kittel, C. (1983). Physique de l'état solide: Dumod Université.

Koetitz, R., Lange, J., Browaeys, J., Perzynski, R., Bacri, J.-C., Ponsinet, V. and Rheinlaender, T. (1999). U.S. Patent.

- Koo, L. Y., Irvine, D. J., Mayes, A. M., Lauffenburger, D. A. and Griffith, L. G.** (2002). Co-regulation of cell adhesion by nanoscale RGD organization and mechanical stimulus. *J Cell Sci* **115**, 1423-33.
- Korohoda, W., Golda, J., Sroka, J., Wojnarowicz, A., Jochym, P. and Madeja, Z.** (1997). Chemotaxis of *Amoeba proteus* in the developing pH gradient within a pocket-like chamber studied with the computer assisted method. *Cell Motil Cytoskeleton* **38**, 38-53.
- Korohoda, W., Madeja, Z. and Sroka, J.** (2002). Diverse chemotactic responses of *Dictyostelium discoideum* amoebae in the developing (temporal) and stationary (spatial) concentration gradients of folic acid, cAMP, Ca(2+) and Mg(2+). *Cell Motil Cytoskeleton* **53**, 1-25.
- Kraitchman, D. L., Heldman, A. W., Atalar, E., Amado, L. C., Martin, B. J., Pittenger, M. F., Hare, J. M. and Bulte, J. W.** (2003). In vivo magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells in myocardial infarction. *Circulation* **107**, 2290-3.
- Kulbatski, I., Mothe, A. J., Nomura, H. and Tator, C. H.** (2005). Endogenous and exogenous CNS derived stem/progenitor cell approaches for neurotrauma. *Curr Drug Targets* **6**, 111-26.
- Kullberg, M., Mann, K. and Owens, J. L.** (2005). Improved drug delivery to cancer cells: a method using magnetoliposomes that target epidermal growth factor receptors. *Med Hypotheses* **64**, 468-70.
- Kuo, S. C. and Sheetz, M. P.** (1992). Optical tweezers in cell biology. *Trends Cell Biol* **2**, 116-8.
- Kuo, S. C. and Sheetz, M. P.** (1993). Force of single kinesin molecules measured with optical tweezers. *Science* **260**, 232-4.
- Ladhams, A., Schmidt, C., Sing, G., Butterworth, L., Fielding, G., Tesar, P., Strong, R., Leggett, B., Powell, L., Maddern, G. et al.** (2002). Treatment of non-resectable hepatocellular carcinoma with autologous tumor-pulsed dendritic cells. *J Gastroenterol Hepatol* **17**, 889-96.
- Laemmel, E., Genet, M., Le Goualher, G., Perchant, A., Le Gargasson, J. F. and Vicaut, E.** (2004). Fibered confocal fluorescence microscopy (Cell-viZio) facilitates extended imaging in the field of microcirculation. A comparison with intravital microscopy. *J Vasc Res* **41**, 400-11.
- Lange, J., Kotitz, R., Haller, A., Trahms, L., Semmler, W. and Weitschies, W.** (2002). Magnetorelaxometry--a new binding specific detection method based on magnetic nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **252**, 381-383.

Lauffenburger, D. A. and Horwitz, A. F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* **84**, 359-69.

Lee, W. A., Hirneise, C. M., Tayyarah, M., Huber, T. S. and Seeger, J. M. (2004). Impact of endovascular repair on early outcomes of ruptured abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* **40**, 211-5.

Lehenkari, P. P. and Horton, M. A. (1999). Single integrin molecule adhesion forces in intact cells measured by atomic force microscopy. *Biochem Biophys Res Commun* **259**, 645-50.

Lesieur, S., Grabielle-Madelmont, C., Menager, C., Cabuil, V., Dadhi, D., Pierrot, P. and Edwards, K. (2003). Evidence of surfactant-induced formation of transient pores in lipid bilayers by using magnetic-fluid-loaded liposomes. *J Am Chem Soc* **125**, 5266-7.

Lesniak, M. S. and Brem, H. (2004). Targeted therapy for brain tumours. *Nat Rev Drug Discov* **3**, 499-508.

Lewin, M., Carlesso, N., Tung, C. H., Tang, X. W., Cory, D., Scadden, D. T. and Weissleder, R. (2000). Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nat Biotechnol* **18**, 410-4.

Licha, K. and Olbrich, C. (2005). Optical imaging in drug discovery and diagnostic applications. *Adv Drug Deliv Rev* **57**, 1087-108.

Lidar, Z., Mardor, Y., Jonas, T., Pfeffer, R., Faibel, M., Nass, D., Hadani, M. and Ram, Z. (2004). Convection-enhanced delivery of paclitaxel for the treatment of recurrent malignant glioma: a phase I/II clinical study. *J Neurosurg* **100**, 472-9.

Lo, C. M., Wang, H. B., Dembo, M. and Wang, Y. L. (2000). Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J* **79**, 144-52.

Losy, F., Dai, J., Pages, C., Ginat, M., Muscatelli-Groux, B., Guinault, A. M., Rousselle, E., Smedile, G., Loisanche, D., Becquemin, J. P. et al. (2003). Paracrine secretion of transforming growth factor-beta1 in aneurysm healing and stabilization with endovascular smooth muscle cell therapy. *J Vasc Surg* **37**, 1301-9.

Lubbe, A. S., Alexiou, C. and Bergemann, C. (2001). Clinical applications of magnetic drug targeting. *J Surg Res* **95**, 200-6.

Lubbe, A. S., Bergemann, C., Huhnt, W., Fricke, T., Riess, H., Brock, J. W. and Huhn, D. (1996a). Preclinical experiences with magnetic drug targeting: tolerance and efficacy. *Cancer Res* **56**, 4694-701.

Lubbe, A. S., Bergemann, C., Riess, H., Schriever, F., Reichardt, P., Possinger, K., Matthias, M., Dorken, B., Herrmann, F., Gurtler, R. et al. (1996b). Clinical experiences with

magnetic drug targeting: a phase I study with 4'-epidoxorubicin in 14 patients with advanced solid tumors. *Cancer Res* **56**, 4686-93.

Luo, D. and Saltzman, W. M. (2000). Enhancement of transfection by physical concentration of DNA at the cell surface. *Nat Biotechnol* **18**, 893-5.

Magnitsky, S., Watson, D. J., Walton, R. M., Pickup, S., Bulte, J. W., Wolfe, J. H. and Poptani, H. (2005). In vivo and ex vivo MRI detection of localized and disseminated neural stem cell grafts in the mouse brain. *Neuroimage* **26**, 744-54.

Maheshwari, G., Brown, G., Lauffenburger, D. A., Wells, A. and Griffith, L. G. (2000). Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering. *J Cell Sci* **113 (Pt 10)**, 1677-86.

Mahmood, U. and Weissleder, R. (2003). Near-infrared optical imaging of proteases in cancer. *Mol Cancer Ther* **2**, 489-96.

Mandeville, J. T., Lawson, M. A. and Maxfield, F. R. (1997). Dynamic imaging of neutrophil migration in three dimensions: mechanical interactions between cells and matrix. *J Leukoc Biol* **61**, 188-200.

Mardor, Y., Roth, Y., Lidar, Z., Jonas, T., Pfeffer, R., Maier, S. E., Faibel, M., Nass, D., Hadani, M., Orenstein, A. et al. (2001). Monitoring response to convection-enhanced taxol delivery in brain tumor patients using diffusion-weighted magnetic resonance imaging. *Cancer Res* **61**, 4971-3.

Marion, S., Guillen, N., Bacri, J. C. and Wilhelm, C. (2005). Acto-myosin cytoskeleton dependent viscosity and shear-thinning behavior of the amoeba cytoplasm. *Eur Biophys J* **34**, 262-72.

Marion, S., Tavares, P., Arhets, P. and Guillen, N. (2004a). Signal transduction through the Gal-GalNAc lectin of *Entamoeba histolytica* involves a spectrin-like protein. *Mol Biochem Parasitol* **135**, 31-8.

Marion, S., Wilhelm, C., Voigt, H., Bacri, J. C. and Guillen, N. (2004b). Overexpression of myosin IB in living *Entamoeba histolytica* enhances cytoplasm viscosity and reduces phagocytosis. *J Cell Sci* **117**, 3271-9.

Marschel, P. and Schmid-Schonbein, G. W. (2002). Control of fluid shear response in circulating leukocytes by integrins. *Ann Biomed Eng* **30**, 333-43.

Martina, M.-S., Fortin, J.-P., Ménager, C., Clement, O., Barratt, G., Grabielle-Madellmont, C., Gazeau, F., Cabuil, V. and Lesieur, S. (2005). Generation of superparamagnetic liposomes revealed as highly efficient MRI contrast agents for in vivo imaging. *J Am Chem Soc* **127**, 10676-85.

- Massart, R.** (1981). Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Trans Magn* **17**, 1247-48.
- Matthews, B. D., Overby, D. R., Alenghat, F. J., Karavitis, J., Numaguchi, Y., Allen, P. G. and Ingber, D. E.** (2004). Mechanical properties of individual focal adhesions probed with a magnetic microneedle. *Biochem Biophys Res Commun* **313**, 758-64.
- Mayer-Kuckuk, P., Gade, T. P. F., M. Buchanan, I., Doubrovin, M., Ageyeva, L., Bertino, J. R., Boskey, A. L., Blasberg, R. G., Koutcher, J. A. and Banerjee, D.** (2005). High-Resolution Imaging of Bone Precursor Cells Within the Intact Bone Marrow Cavity of Living Mice. *Molecular Therapy* **12**, 33-41.
- Meier, S., Baumert, B. G., Maier, T., Wellis, G., Burg, G., Seifert, B. and Dummer, R.** (2004). Survival and prognostic factors in patients with brain metastases from malignant melanoma. *Onkologie* **27**, 145-9.
- Melo, L. G., Pachori, A. S., Kong, D., Gnecci, M., Wang, K., Pratt, R. E. and Dzau, V. J.** (2004). Gene and cell-based therapies for heart disease. *Faseb J* **18**, 648-63.
- Mempel, T. R., Scimone, M. L., Mora, J. R. and von Andrian, U. H.** (2004). In vivo imaging of leukocyte trafficking in blood vessels and tissues. *Curr Opin Immunol* **16**, 406-17.
- Menei, P., Jadaud, E., Faisant, N., Boisdron-Celle, M., Michalak, S., Fournier, D., Delhaye, M. and Benoit, J. P.** (2004). Stereotaxic implantation of 5-fluorouracil-releasing microspheres in malignant glioma. *Cancer* **100**, 405-10.
- Meriguet, G., Dubois, E., Dupui, V. and Perzynski, R.** (2004). *AIP Conference Proceedings* **708**, 124-125.
- Merlot, S. and Firtel, R. A.** (2003). Leading the way: Directional sensing through phosphatidylinositol 3-kinase and other signaling pathways. *J Cell Sci* **116**, 3471-8.
- Michel, J. B.** (2001). Contrasting outcomes of atheroma evolution: intimal accumulation versus medial destruction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**, 1389-92.
- Miura, K. and Siegert, F.** (2000). Light affects cAMP signaling and cell movement activity in Dictyostelium discoideum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2111-6.
- Miyata, H., Nishiyama, S., Akashi, K. and Kinoshita, K., Jr.** (1999). Protrusive growth from giant liposomes driven by actin polymerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2048-53.
- Mocellin, S., Mandruzzato, S., Bronte, V., Lise, M. and Nitti, D.** (2004). Part I: Vaccines for solid tumours. *Lancet Oncol* **5**, 681-9.
- Modo, M., Mellodew, K., Cash, D., Fraser, S. E., Meade, T. J., Price, J. and Williams, S. C.** (2004). Mapping transplanted stem cell migration after a stroke: a serial, in vivo magnetic resonance imaging study. *Neuroimage* **21**, 311-7.

- Mogilner, A. and Oster, G.** (2003a). Force generation by actin polymerization II: the elastic ratchet and tethered filaments. *Biophys J* **84**, 1591-605.
- Mogilner, A. and Oster, G.** (2003b). Polymer motors: pushing out the front and pulling up the back. *Curr Biol* **13**, R721-33.
- Momma, S., Johansson, C. B. and Frisen, J.** (2000). Get to know your stem cells. *Curr Opin Neurobiol* **10**, 45-9.
- Moore, A., Marecos, E., Bogdanov, A., Jr. and Weissleder, R.** (2000). Tumoral distribution of long-circulating dextran-coated iron oxide nanoparticles in a rodent model. *Radiology* **214**, 568-74.
- Moore, M. M., Goldman, J., Patel, A. R., Chien, S. and Liu, S. Q.** (2001). Role of tensile stress and strain in the induction of cell death in experimental vein grafts. *J Biomech* **34**, 289-97.
- Morigi, M., Zoja, C., Figliuzzi, M., Foppolo, M., Micheletti, G., Bontempelli, M., Saronni, M., Remuzzi, G. and Remuzzi, A.** (1995). Fluid shear stress modulates surface expression of adhesion molecules by endothelial cells. *Blood* **85**, 1696-703.
- Moroz, P., Jones, S. K. and Gray, B. N.** (2002a). Arterial embolization hyperthermia in porcine renal tissue. *J Surg Res* **105**, 209-14.
- Moroz, P., Jones, S. K. and Gray, B. N.** (2002b). Tumor response to arterial embolization hyperthermia and direct injection hyperthermia in a rabbit liver tumor model. *J Surg Oncol* **80**, 149-56.
- Moroz, P., Jones, S. K., Winter, J. and Gray, B. N.** (2001). Targeting liver tumors with hyperthermia: ferromagnetic embolization in a rabbit liver tumor model. *J Surg Oncol* **78**, 22-9; discussion 30-1.
- Nakamizo, A., Marini, F., Amano, T., Khan, A., Studeny, M., Gumin, J., Chen, J., Hentschel, S., Vecil, G., Dembinski, J. et al.** (2005). Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res* **65**, 3307-18.
- Naldini, A. and Carraro, F.** (2005). Role of inflammatory mediators in angiogenesis. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **4**, 3-8.
- Napoli, C., D'Armiento, F. P., Mancini, F. P., Postiglione, A., Witztum, J. L., Palumbo, G. and Palinski, W.** (1997). Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* **100**, 2680-90.

Nguyen-Ba-Charvet, K. T., Picard-Riera, N., Tessier-Lavigne, M., Baron-Van Evercooren, A., Sotelo, C. and Chedotal, A. (2004). Multiple roles for slits in the control of cell migration in the rostral migratory stream. *J Neurosci* **24**, 1497-506.

Nicolas, A., Geiger, B. and Safran, S. A. (2004). Cell mechanosensitivity controls the anisotropy of focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 12520-5.

Niggli, V. (2003). Signaling to migration in neutrophils: importance of localized pathways. *Int J Biochem Cell Biol* **35**, 1619-38.

Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F. and Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* **308**, 1314-8.

Ntziachristos, V., Tung, C. H., Bremer, C. and Weissleder, R. (2002). Fluorescence molecular tomography resolves protease activity in vivo. *Nat Med* **8**, 757-60.

Ntziachristos, V. and Weissleder, R. (2002). Charge-coupled-device based scanner for tomography of fluorescent near-infrared probes in turbid media. *Med Phys* **29**, 803-9.

Ntziachristos, V., Yodh, A. G., Schnall, M. and Chance, B. (2000). Concurrent MRI and diffuse optical tomography of breast after indocyanine green enhancement. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2767-72.

Ohki, K., Chung, S., Ch'ng, Y. H., Kara, P. and Reid, R. C. (2005). Functional imaging with cellular resolution reveals precise micro-architecture in visual cortex. *Nature* **433**, 597-603.

Oliver, T., Dembo, M. and Jacobson, K. (1999). Separation of propulsive and adhesive traction stresses in locomoting keratocytes. *J Cell Biol* **145**, 589-604.

Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S. M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M. et al. (2001a). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* **410**, 701-5.

Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Limana, F., Jakoniuk, I., Quaini, F., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M., Leri, A. and Anversa, P. (2001b). Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10344-9.

Oudit, G. Y., Sun, H., Kerfant, B. G., Crackower, M. A., Penninger, J. M. and Backx, P. H. (2004). The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *J Mol Cell Cardiol* **37**, 449-71.

Ozawa, T., Mickle, D. A., Koyama, N., Ozawa, S. and Li, R. K. (2002). Optimal biomaterial for creation of autologous cardiac grafts. *Circulation* **106**, 176-82.

Palecek, S. P., Schmidt, C. E., Lauffenburger, D. A. and Horwitz, A. F. (1996). Integrin dynamics on the tail region of migrating fibroblasts. *J Cell Sci* **109** (Pt 5), 941-52.

Palsson, E. and Othmer, H. G. (2000). A model for individual and collective cell movement in *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10448-53.

Papahadjopoulos, D., Allen, T. M., Gabizon, A., Mayhew, E., Matthay, K., Huang, S. K., Lee, K. D., Woodle, M. C., Lasic, D. D., Redemann, C. et al. (1991). Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 11460-4.

Pardoe, H., Clark, P. R., St Pierre, T. G., Moroz, P. and Jones, S. K. (2003). A magnetic resonance imaging based method for measurement of tissue iron concentration in liver arterially embolized with ferrimagnetic particles designed for magnetic hyperthermia treatment of tumors. *Magn Reson Imaging* **21**, 483-8.

Pardridge, W. M. (2002). Drug and gene targeting to the brain with molecular Trojan horses. *Nat Rev Drug Discov* **1**, 131-9.

Pardridge, W. M. (2003). Gene targeting in vivo with pegylated immunoliposomes. *Methods Enzymol* **373**, 507-28.

Parker, K. K., Brock, A. L., Brangwynne, C., Mannix, R. J., Wang, N., Ostuni, E., Geisse, N. A., Adams, J. C., Whitesides, G. M. and Ingber, D. E. (2002). Directional control of lamellipodia extension by constraining cell shape and orienting cell tractional forces. *Faseb J* **16**, 1195-204.

Parodi, J. C., Palmaz, J. C. and Barone, H. D. (1991). Transfemoral intraluminal graft implantation for abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg* **5**, 491-9.

Pelham, R. J., Jr. and Wang, Y. (1997). Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13661-5.

Pelham, R. J., Jr. and Wang, Y. L. (1998). Cell locomotion and focal adhesions are regulated by the mechanical properties of the substrate. *Biol Bull* **194**, 348-9; discussion 349-50.

Perin, E. C., Dohmann, H. F., Borojevic, R., Silva, S. A., Sousa, A. L., Silva, G. V., Mesquita, C. T., Belem, L., Vaughn, W. K., Rangel, F. O. et al. (2004). Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 months after transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy. *Circulation* **110**, II213-8.

Peskin, C. S., Odell, G. M. and Oster, G. F. (1993). Cellular motions and thermal fluctuations: the Brownian ratchet. *Biophys J* **65**, 316-24.

Pirko, I., Johnson, A., Ciric, B., Gamez, J., Macura, S. I., Pease, L. R. and Rodriguez, M. (2004). In vivo magnetic resonance imaging of immune cells in the central nervous system with superparamagnetic antibodies. *Faseb J* **18**, 179-82.

Pluchino, S. and Martino, G. (2005). The therapeutic use of stem cells for myelin repair in autoimmune demyelinating disorders. *J Neurol Sci* **233**, 117-9.

Pluchino, S., Quattrini, A., Brambilla, E., Gritti, A., Salani, G., Dina, G., Galli, R., Del Carro, U., Amadio, S., Bergami, A. et al. (2003). Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. *Nature* **422**, 688-94.

Puddephat, M. (2003). Principle of Magnetic Resonance Imaging: copyright easymeasure Ltd.

Puig-de-Morales, M., Millet, E., Fabry, B., Navajas, D., Wang, N., Butler, J. P. and Fredberg, J. J. (2004). Cytoskeletal mechanics in adherent human airway smooth muscle cells: probe specificity and scaling of protein-protein dynamics. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**, C643-54.

Rapoport, S. I. (2000). Osmotic opening of the blood-brain barrier: principles, mechanism, and therapeutic applications. *Cell Mol Neurobiol* **20**, 217-30.

Reimann, J., Irintchev, A. and Wernig, A. (2000). Regenerative capacity and the number of satellite cells in soleus muscles of normal and mdx mice. *Neuromuscul Disord* **10**, 276-82.

Rickert, P., Weiner, O. D., Wang, F., Bourne, H. R. and Servant, G. (2000). Leukocytes navigate by compass: roles of PI3Kgamma and its lipid products. *Trends Cell Biol* **10**, 466-73.

Riva, P., Arista, A., Franceschi, G., Frattarelli, M., Sturiale, C., Riva, N., Casi, M. and Rossitti, R. (1995). Local treatment of malignant gliomas by direct infusion of specific monoclonal antibodies labeled with ¹³¹I: comparison of the results obtained in recurrent and newly diagnosed tumors. *Cancer Res* **55**, 5952s-5956s.

Riviere, C., Boudghene, F. P., Gazeau, F., Roger, J., Pons, J. N., Laissy, J. P., Allaire, E., Michel, J. B., Letourneur, D. and Deux, J. F. (2005). Iron Oxide Nanoparticle-labeled Rat Smooth Muscle Cells: Cardiac MR Imaging for Cell Graft Monitoring and Quantitation. *Radiology* **235**, 959-967.

Roddie, M. E., Peters, A. M., Danpure, H. J., Osman, S., Henderson, B. L., Lavender, J. P., Carroll, M. J., Neirinckx, R. D. and Kelly, J. D. (1988). Inflammation: imaging with Tc-99m HMPAO-labeled leukocytes. *Radiology* **166**, 767-72.

Romanus, E., Gro[ss], C., Glockl, G., Weber, P. and Weitschies, W. (2002a). Determination of biological binding reactions by field-induced birefringence measurements. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **252**, 384-386.

Romanus, E., Huckel, M., Gro[ss], C., Prass, S., Weitschies, W., Brauer, R. and Weber, P. (2002b). Magnetic nanoparticle relaxation measurement as a novel tool for in vivo diagnostics. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **252**, 387-389.

Rosner, B. I., Hang, T. and Tranquillo, R. T. (2005). Schwann cell behavior in three-dimensional collagen gels: Evidence for differential mechano-transduction and the influence of TGF-beta 1 in morphological polarization and differentiation. *Exp Neurol*.

Rotsch, C., Jacobson, K. and Radmacher, M. (1999). Dimensional and mechanical dynamics of active and stable edges in motile fibroblasts investigated by using atomic force microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 921-6.

Rutherford, R. B. and Krupski, W. C. (2004). Current status of open versus endovascular stent-graft repair of abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* **39**, 1129-39.

S. Lecommandoux, O. S., F. Chécot, J. Rodriguez-Hernandez, R. Perzynski, (2005). Magnetic Nanocomposite Micelles and Vesicles. *Advanced Materials* **17**, 712-718.

Sadhu, C., Masinovsky, B., Dick, K., Sowell, C. G. and Staunton, D. E. (2003). Essential role of phosphoinositide 3-kinase delta in neutrophil directional movement. *J Immunol* **170**, 2647-54.

Safford, K. M. and Rice, H. E. (2005). Stem cell therapy for neurologic disorders: therapeutic potential of adipose-derived stem cells. *Curr Drug Targets* **6**, 57-62.

Saitoh, Y., Kato, A., Hagihara, Y., Kaneda, Y. and Yoshimine, T. (2003). Gene therapy for ischemic brain diseases. *Curr Gene Ther* **3**, 49-58.

Sakalihasan, N., Limet, R. and Defawe, O. D. (2005). Abdominal aortic aneurysm. *Lancet* **365**, 1577-89.

Santini, J. T., Jr., Richards, A. C., Scheidt, R. A., Cima, M. J. and Langer, R. S. (2000). Microchip technology in drug delivery. *Ann Med* **32**, 377-9.

Savitz, S. I., Dinsmore, J. H., Wechsler, L. R., Rosenbaum, D. M. and Caplan, L. R. (2004). Cell Therapy for Stroke. *Neurorx* **1**, 406-414.

Scherer, F., Anton, M., Schillinger, U., Henke, J., Bergemann, C., Kruger, A., Gansbacher, B. and Plank, C. (2002). Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther* **9**, 102-9.

Schlachetzki, F., Zhang, Y., Boado, R. J. and Pardridge, W. M. (2004). Gene therapy of the brain: the trans-vascular approach. *Neurology* **62**, 1275-81.

Schnyder, A. and Huwyler, J. (2005). Drug Transport to Brain with Targeted Liposomes. *Neurorx* **2**, 99-107.

Schoder, H., Erdi, Y. E., Larson, S. M. and Yeung, H. W. (2003). PET/CT: a new imaging technology in nuclear medicine. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **30**, 1419-37.

Schuler, D. and Frankel, R. B. (1999). Bacterial magnetosomes: microbiology, biomineralization and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **52**, 464-73.

Schulze, E., Ferrucci, J. T., Jr., Poss, K., Lapointe, L., Bogdanova, A. and Weissleder, R. (1995). Cellular uptake and trafficking of a prototypical magnetic iron oxide label in vitro. *Invest Radiol* **30**, 604-10.

Schwarz, U. S. and Bischofs, I. B. (2005). Physical determinants of cell organization in soft media. *Med Eng Phys*.

Schwarzbauer, J. E. (1997). Cell migration: may the force be with you. *Curr Biol* **7**, R292-4.

Scimone, M. L., Lutzky, V. P., Zittermann, S. I., Maffia, P., Jancic, C., Buzzola, F., Issekutz, A. C. and Chuluyan, H. E. (2005). Migration of polymorphonuclear leucocytes is influenced by dendritic cells. *Immunology* **114**, 375-85.

Serrador, J. M., Nieto, M. and Sanchez-Madrid, F. (1999). Cytoskeletal rearrangement during migration and activation of T lymphocytes. *Trends Cell Biol* **9**, 228-33.

Servant, G., Weiner, O. D., Herzmark, P., Balla, T., Sedat, J. W. and Bourne, H. R. (2000). Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. *Science* **287**, 1037-40.

Seylaz, J., Charbonne, R., Nanri, K., Von Euw, D., Borredon, J., Kacem, K., Meric, P. and Pinard, E. (1999). Dynamic in vivo measurement of erythrocyte velocity and flow in capillaries and of microvessel diameter in the rat brain by confocal laser microscopy. *J Cereb Blood Flow Metab* **19**, 863-70.

Shah, P. K. (1997). Inflammation, metalloproteinases, and increased proteolysis: an emerging pathophysiological paradigm in aortic aneurysm. *Circulation* **96**, 2115-7.

Sheetz, M. P., Felsenfeld, D. P. and Galbraith, C. G. (1998). Cell migration: regulation of force on extracellular-matrix-integrin complexes. *Trends Cell Biol* **8**, 51-4.

Sheikh, S., Rainger, G. E., Gale, Z., Rahman, M. and Nash, G. B. (2003). Exposure to fluid shear stress modulates the ability of endothelial cells to recruit neutrophils in response to tumor necrosis factor-alpha: a basis for local variations in vascular sensitivity to inflammation. *Blood* **102**, 2828-34.

Shen, H., Tan, J. and Saltzman, W. M. (2004). Surface-mediated gene transfer from nanocomposites of controlled texture. *Nat Mater* **3**, 569-74.

Shi, N. and Pardridge, W. M. (2000). Noninvasive gene targeting to the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7567-72.

Shi, N., Zhang, Y., Zhu, C., Boado, R. J. and Pardridge, W. M. (2001). Brain-specific expression of an exogenous gene after i.v. administration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12754-9.

Shyy, J. Y. and Chien, S. (2002). Role of integrins in endothelial mechanosensing of shear stress. *Circ Res* **91**, 769-75.

Silva, G. V., Litovsky, S., Assad, J. A., Sousa, A. L., Martin, B. J., Vela, D., Coulter, S. C., Lin, J., Ober, J., Vaughn, W. K. et al. (2005). Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation* **111**, 150-6.

Slattery, M. J. and Dong, C. (2003). Neutrophils influence melanoma adhesion and migration under flow conditions. *Int J Cancer* **106**, 713-22.

Slattery, M. J., Liang, S. and Dong, C. (2005). Distinct role of hydrodynamic shear in leukocyte-facilitated tumor cell extravasation. *Am J Physiol Cell Physiol* **288**, C831-9.

Smirnov, P. (2005 (en cours de préparation)). Imagerie cellulaire par IRM à l'aide de nanoparticules superparamagnétiques : faisabilité et application à la thérapie cellulaire.

Smirnov, P., Gazeau, F., Lewin, M., Bacri, J. C., Siauve, N., Vayssettes, C., Cuenod, C. A. and Clement, O. (2004). In vivo cellular imaging of magnetically labeled hybridomas in the spleen with a 1.5-T clinical MRI system. *Magn Reson Med* **52**, 73-9.

Sobel, G., Szabo, I., Paska, C., Kiss, A., Kovalszky, I., Kadar, A., Paulin, F. and Schaff, Z. (2005). Changes of Cell Adhesion and Extracellular Matrix (ECM) Components in Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Pathol Oncol Res* **11**, 26-31.

Sonntag, K. C., Simantov, R. and Isacson, O. (2005). Stem cells may reshape the prospect of Parkinson's disease therapy. *Brain Res Mol Brain Res* **134**, 34-51.

Sroka, J., Madeja, Z., Michalik, M., Przystalski, S. and Korohoda, W. (2002). Folic acid, ascorbic acid and sodium selenite restore the motility of Dictyostelium discoideum inhibited by triethyllead. *Toxicology* **180**, 275-92.

Stamm, C., Westphal, B., Kleine, H. D., Petzsch, M., Kittner, C., Klinge, H., Schumichen, C., Nienaber, C. A., Freund, M. and Steinhoff, G. (2003). Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* **361**, 45-6.

Stanley, S. L., Jr. (2003). Amoebiasis. *Lancet* **361**, 1025-34.

Stein, B. N., Gamble, J. R., Pitson, S. M., Vadas, M. A. and Khew-Goodall, Y. (2003). Activation of endothelial extracellular signal-regulated kinase is essential for neutrophil

transmigration: potential involvement of a soluble neutrophil factor in endothelial activation. *J Immunol* **171**, 6097-104.

Storm, P. B., Clatterbuck, R. E., Liu, Y. J., Johnson, R. M., Gillis, E. M., Guarnieri, M. and Carson, B. S., Sr. (2003). A surgical technique for safely placing a drug delivery catheter into the pons of primates: preliminary results of carboplatin infusion. *Neurosurgery* **52**, 1169-76; discussion 1176-7.

Stroh, M., Zimmer, J. P., Duda, D. G., Levchenko, T. S., Cohen, K. S., Brown, E. B., Scadden, D. T., Torchilin, V. P., Bawendi, M. G., Fukumura, D. et al. (2005). Quantum dots spectrally distinguish multiple species within the tumor milieu in vivo. *Nat Med* **11**, 678-82.

Suzuki, M., Shinkai, M., Honda, H. and Kobayashi, T. (2003). Anticancer effect and immune induction by hyperthermia of malignant melanoma using magnetite cationic liposomes. *Melanoma Res* **13**, 129-35.

Swanson, J. A. and Taylor, D. L. (1982). Local and spatially coordinated movements in *Dictyostelium discoideum* amoebae during chemotaxis. *Cell* **28**, 225-32.

Tan, J. L., Tien, J., Pirone, D. M., Gray, D. S., Bhadriraju, K. and Chen, C. S. (2003). Cells lying on a bed of microneedles: an approach to isolate mechanical force. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 1484-9.

Tateishi-Yuyama, E., Matsubara, H., Murohara, T., Ikeda, U., Shintani, S., Masaki, H., Amano, K., Kishimoto, Y., Yoshimoto, K., Akashi, H. et al. (2002). Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* **360**, 427-35.

Tavares, P., Sansonetti, P. and Guillen, N. (2000). Cell polarization and adhesion in a motile pathogenic protozoan: role and fate of the *Entamoeba histolytica* Gal/GalNAc lectin. *Microbes Infect* **2**, 643-9.

Teresa Girao da Cruz, M., Cardoso, A. L., de Almeida, L. P., Simoes, S. and Pedroso de Lima, M. C. (2005). Tf-lipoplex-mediated NGF gene transfer to the CNS: neuronal protection and recovery in an excitotoxic model of brain injury. *Gene Ther* **12**, 1242-52.

Thoumine, O. and Meister, J. J. (2000). Dynamics of adhesive rupture between fibroblasts and fibronectin: microplate manipulations and deterministic model. *Eur Biophys J* **29**, 409-19.

Thoumine, O. and Ott, A. (1997a). Comparison of the mechanical properties of normal and transformed fibroblasts. *Biorheology* **34**, 309-26.

Thoumine, O. and Ott, A. (1997b). Time scale dependent viscoelastic and contractile regimes in fibroblasts probed by microplate manipulation. *J Cell Sci* **110 (Pt 17)**, 2109-16.

Titzer, S., Christensen, O., Manzke, O., Tesch, H., Wolf, J., Emmerich, B., Carsten, C., Diehl, V. and Bohlen, H. (2000). Vaccination of multiple myeloma patients with idiotype-pulsed dendritic cells: immunological and clinical aspects. *Br J Haematol* **108**, 805-16.

Tomita, Y., Kubis, N., Calando, Y., Dinh, A. T., Meric, P., Seylaz, J. and Pinard, E. (2005). Long-term in vivo investigation of mouse cerebral microcirculation by fluorescence confocal microscopy in the area of focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **25**, 858-67.

Tracqui, P. and Demongot, J. (2003). Elements de biologie à l'usage d'autres disciplines.

Tse, H. F., Kwong, Y. L., Chan, J. K., Lo, G., Ho, C. L. and Lau, C. P. (2003). Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* **361**, 47-9.

Ueda, M., Sako, Y., Tanaka, T., Devreotes, P. and Yanagida, T. (2001). Single-molecule analysis of chemotactic signaling in Dictyostelium cells. *Science* **294**, 864-7.

Uematsu, H., Takahashi, M., Dougherty, L. and Hatabu, H. (2004). High field body MR imaging: preliminary experiences. *Clin Imaging* **28**, 159-62.

Urbich, C., Dernbach, E., Reissner, A., Vasa, M., Zeiher, A. M. and Dimmeler, S. (2002). Shear stress-induced endothelial cell migration involves integrin signaling via the fibronectin receptor subunits alpha(5) and beta(1). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 69-75.

Usami, S., Wung, S. L., Skierczynski, B. A., Skalak, R. and Chien, S. (1992). Locomotion forces generated by a polymorphonuclear leukocyte. *Biophys J* **63**, 1663-6.

Van Haastert, P. J. and Devreotes, P. N. (2004). Chemotaxis: signalling the way forward. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 626-34.

Vereycken, V., Bucherer, C., Lacombe, C. and Lelievre, J. C. (1995). [A study of leukocyte chemotaxis in a glass micropipette]. *J Mal Vasc* **20**, 113-6.

Vinogradov, S. V., Batrakova, E. V. and Kabanov, A. V. (2004). Nanogels for oligonucleotide delivery to the brain. *Bioconjug Chem* **15**, 50-60.

Vinogradov, S. V., Bronich, T. K. and Kabanov, A. V. (2002). Nanosized cationic hydrogels for drug delivery: preparation, properties and interactions with cells. *Adv Drug Deliv Rev* **54**, 135-47.

Viroonchatapan, E., Sato, H., Ueno, M., Adachi, I., Tazawa, K. and Horikoshi, I. (1996). Magnetic targeting of thermosensitive magnetoliposomes to mouse livers in an in situ on-line perfusion system. *Life Sci* **58**, 2251-61.

- Voura, E. B., Jaiswal, J. K., Mattoussi, H. and Simon, S. M.** (2004). Tracking metastatic tumor cell extravasation with quantum dot nanocrystals and fluorescence emission-scanning microscopy. *Nat Med* **10**, 993-8.
- Wang, H. B., Dembo, M., Hanks, S. K. and Wang, Y.** (2001). Focal adhesion kinase is involved in mechanosensing during fibroblast migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11295-300.
- Wang, H. B., Dembo, M. and Wang, Y. L.** (2000). Substrate flexibility regulates growth and apoptosis of normal but not transformed cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **279**, C1345-50.
- Wang, N., Butler, J. P. and Ingber, D. E.** (1993). Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* **260**, 1124-7.
- Wang, P. P., Frazier, J. and Brem, H.** (2002a). Local drug delivery to the brain. *Adv Drug Deliv Rev* **54**, 987-1013.
- Wang, W., Wyckoff, J. B., Frohlich, V. C., Oleynikov, Y., Huttelmaier, S., Zavadil, J., Cermak, L., Bottinger, E. P., Singer, R. H., White, J. G. et al.** (2002b). Single cell behavior in metastatic primary mammary tumors correlated with gene expression patterns revealed by molecular profiling. *Cancer Res* **62**, 6278-88.
- Wang, Y.** (1985). Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts: possible role of treadmilling. *J. Cell Biol.* **101**, 597-602.
- Ward, S. G.** (2004). Do phosphoinositide 3-kinases direct lymphocyte navigation? *Trends Immunol* **25**, 67-74.
- Wehrle-Haller, B. and Imhof, B. A.** (2003). Actin, microtubules and focal adhesion dynamics during cell migration. *Int J Biochem Cell Biol* **35**, 39-50.
- Weiner, O. D.** (2002). Regulation of cell polarity during eukaryotic chemotaxis: the chemotactic compass. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 196-202.
- Weiss, P.** (1934). In vitro experiments on the factors determining the course of the outgrowing nerve fiber. *J. exp. Zool.* **68**, 393-448.
- Weiss, P.** (1945). Experiments on cell and axon orientation in vitro -the role of colloidal exudates in tissue organization. *J. exp. Zool.* **100**, 353-86.
- Weissleder, R. and Mahmood, U.** (2001). Molecular imaging. *Radiology* **219**, 316-33.
- Widera, D., Holtkamp, W., Entschladen, F., Niggemann, B., Zanker, K., Kaltschmidt, B. and Kaltschmidt, C.** (2004). MCP-1 induces migration of adult neural stem cells. *Eur J Cell Biol* **83**, 381-7.

Wilhelm, C., Billotey, C., Roger, J., Pons, J. N., Bacri, J. C. and Gazeau, F. (2003a). Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. *Biomaterials* **24**, 1001-11.

Wilhelm, C., Cebers, A., Bacri, J. C. and Gazeau, F. (2004). Deformation of intracellular endosomes under a magnetic field. *Eur Biophys J* **32**, 655-60.

Wilhelm, C., Gazeau, F. and Bacri, J.-C. (2003b). Rotational magnetic endosome microrheology: Viscoelastic architecture inside living cells. *Physical Review E (Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics)* **67**, 061908-12.

Wilhelm, C., Gazeau, F., Roger, J., Pons, J. N. and Bacri, J. C. (2002a). Interaction of anionic superparamagnetic nanoparticles with cells: kinetic analysis of membrane adsorption and subsequent internalization. *Langmuir* **18**, 8148-8155.

Wilhelm, C., Gazeau, F., Roger, J., Pons, J. N., Salis, M. F., Perzynski, R. and Bacri, J. C. (2002b). Binding of biological effectors on magnetic nanoparticles measured by a magnetically induced transient birefringence experiment. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* **65**, 031404.

Wilkinson, C. D. W., Curtis, A. S. G. and Crossan, J. (1998). Nanofabrication in cellular engineering. In *Papers from the 42nd international conference on electron, ion, and photon beam technology and nanofabrication*, vol. 16, pp. 3132-3136. Chicago, Illinois (USA): AVS.

Williams, H. P. and Harwood, A. J. (2003). Cell polarity and Dictyostelium development. *Curr Opin Microbiol* **6**, 621-7.

Williams, R. M., Zipfel, W. R. and Webb, W. W. (2001). Multiphoton microscopy in biological research. *Curr Opin Chem Biol* **5**, 603-8.

Wojciak-Stothard, B. and Ridley, A. J. (2003). Shear stress-induced endothelial cell polarization is mediated by Rho and Rac but not Cdc42 or PI 3-kinases. *J Cell Biol* **161**, 429-39.

Wozniak, M. A., Modzelewska, K., Kwong, L. and Keely, P. J. (2004). Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim Biophys Acta* **1692**, 103-19.

Wu, J. C., Sundaresan, G., Iyer, M. and Gambhir, S. S. (2001). Noninvasive optical imaging of firefly luciferase reporter gene expression in skeletal muscles of living mice. *Mol Ther* **4**, 297-306.

Wu, X. L. and Libchaber, A. (2000). Particle diffusion in a quasi-two-dimensional bacterial bath. *Phys Rev Lett* **84**, 3017-20.

Yang, M., Baranov, E., Moossa, A. R., Penman, S. and Hoffman, R. M. (2000). Visualizing gene expression by whole-body fluorescence imaging. *PNAS* **97**, 12278-12282.

Yap, A. S., Briehar, W. M. and Gumbiner, B. M. (1997). Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 119-46.

Ye, Q., Yang, D., Williams, M., Williams, D. S., Pluempitiwiriyaewej, C., Moura, J. M. and Ho, C. (2002). In vivo detection of acute rat renal allograft rejection by MRI with USPIO particles. *Kidney Int* **61**, 1124-35.

Yoo, K. J., Li, R. K., Weisel, R. D., Mickle, D. A., Jia, Z. Q., Kim, E. J., Tomita, S. and Yau, T. M. (2000). Heart cell transplantation improves heart function in dilated cardiomyopathic hamsters. *Circulation* **102**, III204-9.

Zelivyanskaya, M. L., Nelson, J. A., Poluektova, L., Uberti, M., Mellon, M., Gendelman, H. E. and Boska, M. D. (2003). Tracking superparamagnetic iron oxide labeled monocytes in brain by high-field magnetic resonance imaging. *J Neurosci Res* **73**, 284-95.

Zhang, Y., Schlachetzki, F. and Pardridge, W. M. (2003a). Global non-viral gene transfer to the primate brain following intravenous administration. *Mol Ther* **7**, 11-8.

Zhang, Y., Zhang, Y. F., Bryant, J., Charles, A., Boado, R. J. and Pardridge, W. M. (2004). Intravenous RNA interference gene therapy targeting the human epidermal growth factor receptor prolongs survival in intracranial brain cancer. *Clin Cancer Res* **10**, 3667-77.

Zhang, Y. F., Boado, R. J. and Pardridge, W. M. (2003b). Absence of toxicity of chronic weekly intravenous gene therapy with pegylated immunoliposomes. *Pharm Res* **20**, 1779-85.

Zhang, Z. Y. and Smith, B. D. (2000). High-generation polycationic dendrimers are unusually effective at disrupting anionic vesicles: membrane bending model. *Bioconjug Chem* **11**, 805-14.

Zhao, M., Kircher, M. F., Josephson, L. and Weissleder, R. (2002). Differential conjugation of tat peptide to superparamagnetic nanoparticles and its effect on cellular uptake. *Bioconjug Chem* **13**, 840-4.

Zhao, M., Momma, S., Delfani, K., Carlen, M., Cassidy, R. M., Johansson, C. B., Brismar, H., Shupliakov, O., Frisen, J. and Janson, A. M. (2003). Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 7925-30.

Zhao, M. and Weissleder, R. (2004). Intracellular cargo delivery using tat peptide and derivatives. *Med Res Rev* **24**, 1-12.

Zhu, Y., Yu, T., Zhang, X. C., Nagasawa, T., Wu, J. Y. and Rao, Y. (2002). Role of the chemokine SDF-1 as the meningeal attractant for embryonic cerebellar neurons. *Nat Neurosci* **5**, 719-20.