



HAL
open science

IRM cellulaire de lymphocytes marqués par des nanoparticules d'oxydes de fer : application au diagnostic en cancérologie

Pierre Mowat

► **To cite this version:**

Pierre Mowat. IRM cellulaire de lymphocytes marqués par des nanoparticules d'oxydes de fer : application au diagnostic en cancérologie. Sciences du Vivant [q-bio]. Université d'Angers, 2007. Français. NNT: . tel-00346880

HAL Id: tel-00346880

<https://theses.hal.science/tel-00346880>

Submitted on 12 Dec 2008

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.

**IRM CELLULAIRE DE LYMPHOCYTES MARQUES PAR
DES NANOPARTICULES D'OXYDES DE FER :
APPLICATION AU DIAGNOSTIC EN CANCEROLOGIE**

THÈSE DE DOCTORAT

Spécialité : Imagerie médicale

ÉCOLE DOCTORALE D'ANGERS

Présentée et soutenue publiquement

Le 6 juillet 2007

A Angers

Par Pierre Mowat

Devant le jury ci-dessous :

Pr. Jean-Jacques Le Jeune (Directeur de thèse), PU-PH	Université d'Angers
Pr. Jean-Michel Franconi (Rapporteur), PU	Université Bordeaux 2
Dr. Claire Billotey (Rapporteur), MCU-PH	Université Lyon 1
Pr. Jean-Pierre Benoit (Examineur), PU-PH	Université d'Angers
Dr. Chantal Curtet (Examineur), MCU-PH	Université de Nantes
Dr. Laurent Lemaire (Examineur), IR	Université d'Angers

Directeur de thèse : Pr. Jean-Jacques Le Jeune

INSERM U646, « Ingénierie de la vectorisation particulière »

IBT – 10, rue André Boquel, 49100 ANGERS

**IRM CELLULAIRE DE LYMPHOCYTES MARQUES PAR
DES NANOPARTICULES D'OXYDES DE FER :
APPLICATION AU DIAGNOSTIC EN CANCEROLOGIE**

THÈSE DE DOCTORAT

Spécialité : Imagerie médicale

ÉCOLE DOCTORALE D'ANGERS

Présentée et soutenue publiquement

Le 6 juillet 2007

A Angers

Par Pierre Mowat

Devant le jury ci-dessous :

Pr. Jean-Jacques Le Jeune (Directeur de thèse), PU-PH	Université d'Angers
Pr. Jean-Michel Franconi (Rapporteur), PU	Université Bordeaux 2
Dr. Claire Billotey (Rapporteur), MCU-PH	Université Lyon 1
Pr. Jean-Pierre Benoit (Examineur), PU-PH	Université d'Angers
Dr. Chantal Curtet (Examineur), MCU-PH	Université de Nantes
Dr. Laurent Lemaire (Examineur), IR	Université d'Angers

Directeur de thèse : Pr. Jean-Jacques Le Jeune

INSERM U646, « Ingénierie de la vectorisation particulière »

IBT – 10, rue André Boquel, 49100 ANGERS

Remerciements

Au Professeur Jean-Jacques Le Jeune, mon directeur de thèse, pour m'avoir permis de réaliser ce travail. Je le remercie pour son soutien, ses conseils et pour la confiance qu'il m'a accordée.

Au Professeur Jean-Pierre Benoit, pour son accueil au sein de l'unité INSERM U646 et pour son soutien.

Au Professeur Jean-Michel Franconi et au Docteur Claire Billotey, pour avoir accepté de juger ce travail.

Au Docteur Chantal Curtet, qui a bien voulu examiner mon travail de thèse.

Au Docteur Florence Franconi, pour sa gentillesse, ses conseils précieux et sa disponibilité.

Au Docteur Laurent Lemaire, pour avoir encadré ce travail. Je le remercie pour sa disponibilité et sa grande rigueur scientifique. Je le remercie également pour ses conseils avisés et son soutien durant toutes les périodes de la thèse, qu'elles fussent agréables ou difficiles. Sans son aide précieuse, ce travail n'aurait jamais vu le jour.

Je tiens à remercier aussi :

Gisèle Tanguy, pour sa participation à ce travail et tous les services rendus. Je la remercie pour sa gentillesse et son amitié.

Joëlle Dorat, pour sa participation à ce travail et les grands moments de fous rires que nous avons eus ensemble!

David Portet (Surfactis), qui a contribué à sa façon au travail en nous fournissant des bisphosphonates.

Robert Filmon du SCIAM (Service Commun d'Imageries et d'Analyses Microscopiques), pour son travail remarquable en Microscopie Electronique à Transmission.

Yves Mauras et Martine Ménard du laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie (CHU d'Angers), pour leur grande disponibilité concernant les dosages de fer réalisés par ICP-OES.

Tous les membres de l'INSERM U646 et plus particulièrement tous les membres de **l'équipe de Biophysique Médicale**.

Toutes les personnes de l'animalerie.

Toutes les personnes que j'ai connues durant mon doctorat :

« les anciens » : Ali Karimi, Arnaud Vonarbourg, Virginie Martinet, Virginie DuceL, Frédéric Tewes, Anne Sapin, David Portet, Delphine Jarnet, Valérie Tatard, Christophe Jollivet, Anne Pouessel-Aubert, Frédéric Lagarce ...

« les contemporains et les nouveaux » : Arnaud Béduneau, Alexandra Giteau, Archibald Paillard, Emilie Allard, Nicolas Anton, Kamel Ahmed Ouamer, Emilie Roger ...

A ma famille,

Table des matières :

INTRODUCTION GENERALE	7
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	14
A. SYSTEME IMMUNITAIRE	15
I/ Rappels sur le système immunitaire	16
1. Réponse « immunitaire innée »	16
2. Réponse « immunitaire spécifique »	16
2.1. Acteurs de la réponse immunitaire spécifique.....	16
2.2. Réponse à médiation cellulaire et réponse humorale	18
II/ Stratégies immunitaires anti-tumorales	22
1. Stratégies naturelles.....	22
1.1. Antigènes tumoraux.....	23
1.2. Les effecteurs cellulaires de l'immunosurveillance des cancers	24
2. Stratégies thérapeutiques anti-tumorales : immunothérapie	25
B. IRM CELLULAIRE	27
I/ Imagerie cellulaire	28
1. Intérêt de l'imagerie cellulaire	28
2. Techniques d'imagerie cellulaire in vivo	29
2.1. Techniques optiques	30
2.2. Techniques d'imagerie nucléaire.....	32
2.3. IRM cellulaire.....	34
II/ IRM cellulaire	34
1. Introduction	34
2. Agents de contraste pour l'IRM cellulaire	35
2.1. Propriétés des agents de contraste en IRM.....	35
2.2. Agents de contraste superparamagnétiques	36
2.3. Agents de contraste paramagnétiques : les chélates de Gadolinium	39
2.4. Comparaison agents paramagnétiques et superparamagnétiques	40
3. Marquage cellulaire.....	42
3.1. Marquage par internalisation naturelle	43
3.2. Marquage par utilisation de vecteurs non viraux.....	45
3.3. Marquage par utilisation d'un vecteur viral	46
3.4. Autres techniques de marquage	47
3.5. Avantages et Inconvénients de ces techniques de marquage	47
4. Devenir cellulaire du marquage	48
5. Efficacité de marquage.....	49
6. limites de détection en IRM cellulaire	51
7. conclusion.....	52

TRAVAUX EXPERIMENTAUX.....54

A. Matériels et Méthodes56

***I/ Synthèse et caractérisation physico-chimique des nanoparticules*.....57**

- 1. Synthèse des nanoparticules d'oxydes de fer superparamagnétiques 57
 - 1.1. Formulation du cristal d'oxydes de fer 57
 - 1.2. Recouvrement du cristal d'oxydes de fer 57
- 2. Caractérisation physico-chimique des nanoparticules 59
 - 2.1. Détermination du diamètre du noyau d'oxydes de fer 59
 - 2.2. Détermination du diamètre hydrodynamique des nanoparticules 59
 - 2.3. Détermination de la concentration en fer des nanoparticules 60
 - 2.4. Détermination des propriétés relaxométriques des nanoparticules 60

***II/ Expérimentations animales et culture cellulaire*62**

- 1. Lignées BLCL 62
- 2. Modèle animal C6 62
- 3. Prélèvement des lymphocytes périphériques murins 63
- 4. Phénotype des cellules isolées..... 64
- 5. Marquage magnétique des BLCL et des lymphocytes périphériques murins 65
 - 5.1. Marquage des BLCL et des lymphocytes périphériques murins non activés 65
 - 5.2. Activation non spécifique et marquage des lymphocytes périphériques murins..... 65
 - 5.3. Evaluation de la viabilité cellulaire 66
 - 5.4. Evaluation de la charge cellulaire..... 66
 - 5.5. Evaluation du pourcentage de cellules marquées 67
 - 5.6. Localisation cellulaire des particules d'oxydes de fer 69
- 6. Expression des résultats et tests statistiques..... 69

***III/ Suivi in vivo du recrutement lymphocytaire en IRM*70**

- 1. Injection autologue des lymphocytes marqués..... 70
- 2. Suivi IRM..... 70

B. Résultats.....71

***I/ Screening des nanoparticules d'oxydes de fer superparamagnétiques*.....72**

- 1. Caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules 72
 - 1.1. Nature des nanoparticules..... 72
 - 1.2. Caractéristiques physiques et physico-chimiques des nanoparticules..... 75
- 2. Test in vitro de la capacité de marquage de différentes particules..... 79
 - 2.1. Evaluation de la viabilité des BLCL..... 79
 - 2.2. Evaluation qualitative du marquage des BLCL..... 80
 - 2.3. Evaluation quantitative du marquage des BLCL..... 83
 - 2.4. Conclusion 84

<i>II/ Marquage des lymphocytes périphériques murins</i>	85
1. Effet des particules HEDP et NTMBP sur la viabilité des lymphocytes périphériques...	85
2. Effet des particules HEDP et NTMBP sur le pourcentage de lymphocytes périphériques marqués	87
3. Effet des particules HEDP et NTMBP sur la quantité de fer par lymphocyte périphérique marqué.....	88
4. Conclusion.....	89
<i>III/ Marquage des lymphocytes périphériques murins activés de manière non spécifique.....</i>	91
1. Viabilité des lymphocytes périphériques murins au cours de l'activation, pendant et après le marquage NTMBP	91
2. Localisation des particules NTMBP dans les lymphoblastes.....	93
3. Effet des particules NTMBP sur le pourcentage de lymphoblastes marqués et étude de la stabilité du marquage	94
4. Conclusion.....	95
<i>IV/ Nouvelle méthodologie d'évaluation de l'efficacité du marquage lymphocytaire</i>	96
<i>V/ Suivi in vivo de l'infiltration tumorale par les lymphocytes périphériques murins activés et marqués NTMBP</i>	98
1. Modèle tumoral	99
2. Suivi de l'infiltration tumorale par les lymphocytes périphériques activés	101
3. Conclusion.....	106
 <i>DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</i>	107
 <i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</i>	119
 <i>ANNEXES.....</i>	136

INTRODUCTION GENERALE

Le cancer est un terme général qui définit un ensemble de cellules indifférenciées échappant au contrôle de l'organisme. Ces cellules se multiplient indéfiniment, envahissent les tissus voisins en les détruisant et se répandent dans l'organisme en métastases. En France, le cancer est aujourd'hui la première cause de mortalité chez les hommes et la seconde chez les femmes, derrière les maladies cardio-vasculaires. En 2000, il a été la cause d'environ 150000 décès et au cours des 20 dernières années, l'incidence et la prévalence du cancer en France ont augmenté de façon considérable (278000 nouveaux cas en 2000 contre 160000 en 1980) [1]. Selon un rapport récent de l'OMS [2], la prévalence des cancers pourrait augmenter de 50% dans le monde avec 15 millions de nouveaux cas par an en 2020. Le traitement du cancer est donc un enjeu considérable en terme de santé publique et pose le problème du diagnostic préalable de la maladie. En effet, caractériser les tumeurs le plus fidèlement possible et le plus tôt possible est indispensable pour adapter au mieux le traitement et pour cela, l'imagerie médicale fait partie des outils de diagnostic non invasifs permettant de détecter les tumeurs même lorsque celles-ci sont cliniquement muettes.

Une approche diagnostique originale repose sur la vectorisation spécifique d'agents de contraste vers les cellules tumorales, cette vectorisation pouvant être assurée soit par une modification chimique de l'agent de contraste (greffage d'anticorps, de peptides fonctionnalisés...) soit par une médiation cellulaire de contraste.

La modification chimique des agents de contraste est en effet indispensable puisque les molécules commerciales n'ont intrinsèquement aucune capacité à cibler activement les tumeurs. Pour cela, il faut passer par une fonctionnalisation de l'agent de contraste [3]. Afin de diriger les particules vers les marqueurs tumoraux (Her2/neu, Herceptine...), des anticorps monoclonaux (MAb) ont été greffés à leur surface. Ainsi les anticorps servent à transporter spécifiquement l'agent de contraste vers la cible. Les MAb peuvent être

directement liés à la particule ou être accrochés via un « espaceur » comme l'avidine ou la streptavidine (système à deux étages) [4, 5]. L'intérêt d'utiliser ce chaînon supplémentaire est qu'en greffant sur l'agent de contraste de la biotine, il est alors possible d'amplifier le marquage. En effet, l'avidine ou la streptavidine possède plusieurs sites de fixation de la biotine, ce qui permet d'amener plusieurs particules par anticorps [6]. La liaison covalente entre l'agent de contraste et l'anticorps est généralement réalisée entre les groupements hydroxyles situés à la surface de la particule et les groupements amines du MAb. C'est le cas pour les particules recouvertes de PEG (PolyEthylene Glycol) [3, 7] et pour les particules commerciales comme les Ferridex[®] (particules recouvertes de dextran). Concernant ces dernières, il est nécessaire de fonctionnaliser les particules pour permettre la liaison avec l'anticorps. Cela est réalisé ou par oxydation (périodate) ou par réduction (borohydrure) du dextran (formation de bases de Schiff) [8, 9, 10]. D'autres méthodes pour greffer les MAbs sur les nanoparticules magnétiques existent : fixation croisée par le glutaraldéhyde [11], complexation par ultrasonication [12, 13] et liaison par le groupement amine-sulfhydryle [14, 15]. Dans la littérature, un certain nombre d'exemples ont montré la faisabilité in vivo d'un ciblage tumoral direct par des agents de contraste IRM couplés avec des anticorps monoclonaux [12, 16, 17]. L'injection par voie intraveineuse de la MAb-magnetite chez des souris nude portant une tumeur entraîne une diminution de 50% du T₂ suite à l'accumulation des nanoparticules dans le tissu tumoral 24 à 48h après injection [3, 7]. Un autre exemple est l'utilisation de nanoparticules d'oxyde de fer MION-(46L) conjuguées à des MAbs intacts pour la détection immunospécifique de cellules carcinomateuses [18].

Concernant le greffage de peptides spécifiques sur les particules, la cholecystoquinine [19] et la sécrétine [20] ont été utilisées pour une visualisation en IRM de leurs récepteurs pancréatiques respectifs, ce qui peut aider dans le diagnostic du cancer du pancréas. La

Transferrine (Tf) est un autre exemple de protéine employée pour le ciblage tumoral depuis que certaines tumeurs sont connues pour surexprimer les récepteurs à la transferrine (Tfr). Les particules d'oxydes de fer liées à la transferrine ont été utilisées pour du marquage spécifique et pour la détection de gliosarcomes [21, 22, 23] et de carcinomes mammaires [24], avec et sans transfection du gène codant pour le Tfr. Par ailleurs, il a été montré que les oxydes de fer conjugués avec la synaptotagmine I, protéine spécifique des phospholipides présents dans les cellules apoptotiques, engendrait un contraste spécifique des cellules tumorales apoptotiques lors d'un traitement par chimiothérapie [25].

La deuxième approche consiste à internaliser dans la cellule l'agent de contraste. C'est la médiation cellulaire de contraste. Utiliser la cellule comme vecteur plutôt qu'un agent chimique permet de suivre les phénomènes naturels in vivo comme l'infiltration tumorale. En arrivant à suivre la migration des cellules au niveau de la tumeur, il est possible d'approfondir les connaissances indispensables à la compréhension des mécanismes cellulaires anti-tumoraux et donc d'élargir les stratégies thérapeutiques à mettre en œuvre. Parmi les cellules infiltrant les tumeurs, les lymphocytes T ou TILs (Tumor-Infiltrating T Lymphocytes) jouent un rôle important. Les TILs CD8⁺ reconnaissent les antigènes tumoraux associés aux molécules CMH de classe I présents à la surface des cellules cancéreuses et sont capables de les détruire directement [26]. Les TILs CD4⁺, eux aussi, sont capables d'infiltrer une tumeur, comme l'a montré récemment Hiraoka et al. [27]. L'infiltration se retrouve dans certains types de cancer comme les cancers colorectaux, oesophagiens, pancréatiques et ceux de la vésicule biliaire [28, 29, 30, 31].

Dans le cadre d'une vectorisation cellulaire de contraste, la détection de tumeurs en IRM passe donc par le marquage des lymphocytes. Celui-ci se fait in vitro par simple endocytose des agents de contraste [32, 33] ou de manière aidée. En effet, les

lymphocytes, contrairement aux macrophages, n'ont pas une activité de phagocytose aussi élevée. Afin d'améliorer l'efficacité d'incorporation des agents de contraste dans les lymphocytes, un certain nombre de modifications des particules d'oxydes de fer ont été décrites. Par exemple, le recouvrement de particules superparamagnétiques avec des molécules apportant des charges de surface négatives est responsable d'une internalisation importante comparable à celle observée avec des magnétodendrimères [34]. Wilhelm et al. ont démontré que ces particules d'oxydes de fer anioniques sont internalisées plus efficacement dans les cellules que les particules recouvertes de dextran [35]. Une autre approche repose sur l'utilisation du peptide Tat (Transactivator of transcription) du virus HIV-1 [36, 37, 38]. Lié aux particules d'oxydes de fer via un dextran aminé qui sert de recouvrement (particules CLIO-Tat), il permet une incorporation 10 à 100 fois plus importante que par endocytose naturelle [39]. Nous pouvons enfin citer l'utilisation d'agents de transfection polycationiques formant des complexes avec les particules d'oxydes de fer. Parmi ces agents de transfection, deux classes principales existent : les agents obtenus à partir de lipides comme la lipofectamine, la Lipofectamine2000[®], le FuGENE6[®] et les polymères polyaminés comme la Poly-L-Lysine (PLL) et la polyéthylèneimine (PEI). Ces molécules diffèrent en taille, en charge et en masse moléculaire, ce qui influe sur les paramètres de transfection et donc sur l'efficacité de marquage [40].

La migration des lymphocytes marqués vers une tumeur a été étudiée dans un modèle OVA, modèle qui se caractérise par la surexpression des récepteurs à l'ovalbumine à la surface des cellules tumorales et contre lesquels des clones lymphocytaires sont disponibles [41, 42].

Dans ce contexte, le but de notre travail a été de mettre au point un système innovant de diagnostic qui consiste à cibler une tumeur par des lymphocytes périphériques marqués et utilisés comme agents de contraste en IRM.

Les objectifs spécifiques à cette étude ont été :

- de marquer le plus efficacement possible des lymphocytes périphériques murins par des nanoparticules d'oxydes de fer sans pour autant compromettre leur viabilité.
- de détecter *in vivo*, au niveau du site tumoral, les lymphocytes marqués, en suivant l'infiltration de la tumeur en IRM.

Ainsi ce travail sera organisé de la façon suivante :

Dans un premier temps, nous présenterons les mécanismes de la réponse immunitaire innée et de la réponse immunitaire adaptative puis nous nous intéresserons aux stratégies immunitaires anti-tumorales. Dans un second temps, un état des travaux antérieurs sur l'imagerie cellulaire sera réalisé puis nous développerons plus particulièrement l'état de l'art sur l'IRM cellulaire. Ensuite, nous exposerons dans une troisième partie les résultats expérimentaux qui s'articuleront autour de 4 axes :

- le « screening » des nanoparticules d'oxydes de fer afin de choisir le ou les objets particuliers offrant la meilleure efficacité de marquage tout en préservant la viabilité des cellules. Pour cela, nous étudierons le comportement de nos objets particuliers sur une lignée lymphoblastique B (BLCL) qui nous permettra de sélectionner rapidement le meilleur agent de contraste c'est-à-dire celui offrant le meilleur compromis entre viabilité cellulaire et efficacité de marquage.

- le marquage des lymphocytes périphériques murins naïfs et activés que nous caractériserons en termes de viabilité cellulaire, de pourcentage de marquage, de quantité de fer intracellulaire et de stabilité de marquage.

- le suivi IRM de l'infiltration tumorale des lymphocytes périphériques murins activés.

- la mise en place d'une nouvelle méthodologie IRM [43] permettant de quantifier à partir des cartographies 3D T_2^* l'efficacité RM du marquage.

Enfin, nous discuterons ces résultats et présenterons de nouvelles perspectives de recherche qui permettront d'élargir la problématique initiale.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

A. SYSTEME IMMUNITAIRE

I/ Rappels sur le système immunitaire

1. Réponse « immunitaire innée »

Le système immunitaire, système de défense de l'organisme chez les mammifères, vise à éliminer les pathogènes ainsi que les anomalies des éléments du « soi ». C'est un système complexe qui comprend plusieurs niveaux de réponse. En effet, lors de la présence d'un agent pathogène ou d'une anomalie du soi, l'organisme induit un premier niveau de réponse : c'est « l'immunité innée » ou « non spécifique » (**figure**) [44]. Comme son nom l'indique, elle fait intervenir des cellules non spécifiques du pathogène :

- des cellules phagocytaires comprenant les monocytes/macrophages et les polynucléaires neutrophiles (PNN).
- des cellules cytotoxiques comme les « Natural Killer » (NK).

Après avoir reconnu le pathogène en tant qu'élément étranger, ces cellules vont l'éliminer. Pour cela, diverses stratégies sont utilisées : l'endocytose et la lyse enzymatique pour les cellules phagocytaires, la perforation de la membrane plasmique de la cellule cible et l'induction des voies apoptotiques pour les cellules NK [45, 46].

2. Réponse « immunitaire spécifique »

2.1. Acteurs de la réponse immunitaire spécifique

Alors qu'un premier niveau de défense s'est mis en place, le pathogène ou l'anomalie du « soi » peut quand même se développer si cette réponse immunitaire « innée » est insuffisante. Vient alors, dans un second temps, un autre type de réponse. C'est « l'immunité adaptative » ou « spécifique » (**figure**) [44]. Elle est caractérisée par la reconnaissance spécifique des molécules du pathogène, les antigènes, par des cellules immunitaires hautement spécialisées : les lymphocytes B et T.

Ces cellules possèdent à leur surface des récepteurs membranaires spécifiques des antigènes : les BCR (B Cell Receptor) pour les lymphocytes B et les TCR (T Cell Receptor) pour les lymphocytes T. Le BCR est directement fonctionnel c'est à dire qu'il participe lui même à la transduction du signal résultant de la reconnaissance de l'antigène et les lymphocytes B, par leur BCR, reconnaissent l'antigène sous sa forme native. Quant au TCR, il doit, pour être fonctionnel, être couplé à une molécule CD3 qui va assurer la transduction du signal activateur faisant suite au contact du TCR avec l'antigène. Les lymphocytes T, par leur TCR, ne peuvent reconnaître que l'antigène sous sa forme dégradée (peptides antigéniques). La reconnaissance du peptide antigénique n'est d'ailleurs possible que lorsque ce dernier est complexé aux molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) définissant le « soi ».

Concernant les lymphocytes T, on en distingue deux types :

- les lymphocytes T « cytotoxiques » encore appelés T8 puisqu'ils possèdent le marqueur CD8+. Ces lymphocytes reconnaissent le peptide antigénique que si celui-ci est présenté par les molécules du CMH de classe I, molécules présentes sur toutes les cellules nucléées de l'organisme.
- les lymphocytes T « auxiliaires » ou lymphocytes T4 possèdent à leur surface la molécule CD4+. Le TCR des CD4+ reconnaît le peptide antigénique que s'il est présenté par les molécules CMH de classe II. Ces molécules CMH de classe II sont exprimées uniquement par certaines cellules du système immunitaire telles que les Cellules Présentatrices de l'Antigène (CPA). Les CPA comprennent les monocytes/ macrophages, les lymphocytes B et les cellules dendritiques qui sont les plus efficaces pour activer les lymphocytes T naïfs car elles détiennent un large panel de molécules nécessaires à cette fonction.

2.2. Réponse à médiation cellulaire et réponse humorale

La réponse à médiation cellulaire et la réponse humorale sont deux types de réactions immunitaires différentes et complémentaires de « l'immunité spécifique ». L'orientation de la réponse immunitaire adaptative vers l'une ou l'autre de ces réponses est liée à l'activation des lymphocytes T4, activation qui ne peut avoir lieu que dans les organes lymphoïdes secondaires (les ganglions lymphatiques, la rate et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses). Le lymphocyte activé est le siège de modifications morphologiques et physiologiques considérables : augmentation de la taille, dispersion de la chromatine, apparition de nucléoles, augmentation importante du nombre de ribosomes et d'autres organites intracytoplasmiques (mitochondries, appareil de Golgi), apparition de lysosomes et de vacuoles de pinocytose, passage de la phase G1 à la phase S. Le lymphocyte ainsi transformé porte le nom de lymphoblaste ou immunoblaste et l'on parle de transformation lymphoblastique pour désigner le passage de l'état naïf à l'état activé.

Pour avoir des lymphocytes T activés c'est-à-dire des lymphocytes fonctionnels et dirigés contre le pathogène ou l'anomalie du « soi », deux signaux de transduction sont nécessaires :

- le premier fait suite à la reconnaissance du complexe CMH/peptide antigénique par le complexe TCR/CD3 (Cf. 2.1).
- le second signal est un signal dit de « co-stimulation » indispensable pour une activation complète des lymphocytes T se traduisant par la prolifération et la différenciation des cellules T en cellules effectrices ou mémoires. Ce signal peut, par exemple, faire suite à la liaison de la molécule CD28 présente sur la membrane du lymphocyte à la molécule B7 présente notamment sur les CPA.

En absence du signal de « co-stimulation », les CPA ne présenteront pas efficacement les antigènes et les lymphocytes T alors entreront dans un état d'anergie (inactivité puis mort

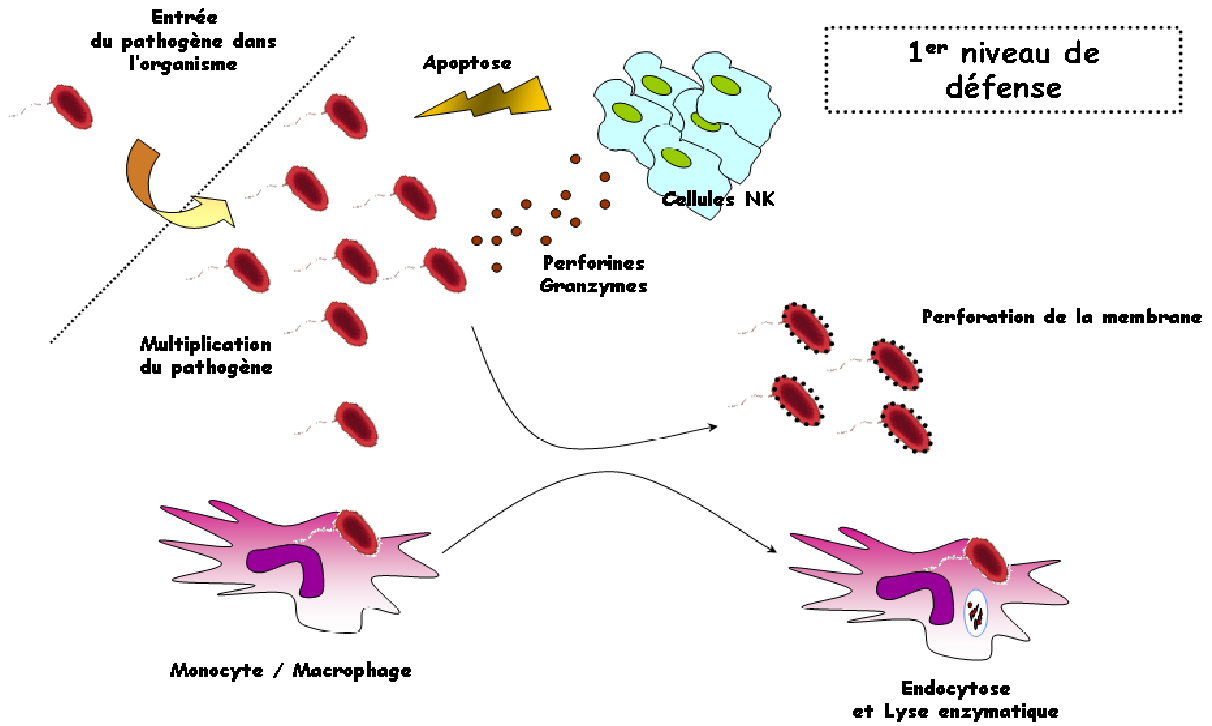
cellulaire) responsable du phénomène de tolérance (absence de réaction face à la prolifération du « non soi »).

L'orientation vers une réponse à médiation cellulaire ou vers une réponse humorale dépend de nombreux facteurs tels que la nature de l'antigène, la dose d'antigènes et le micro-environnement des lymphocytes T4 activés (présence notamment de molécules modulatrices du système immunitaire, les cytokines).

En effet, les lymphocytes T CD4⁺ activés peuvent se différencier en lymphocytes de type Th1 ou de type Th2. Les lymphocytes Th1 vont produire de l'interleukine 2 (IL-2), de l'interféron gamma (INF γ) et du « Tumor Necrosis Factor » alpha (TNF α), cytokines permettant la mise en place d'une réponse à médiation cellulaire se traduisant par l'activation des lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ et des cellules non spécifiques de l'antigène (cellules NK, macrophages...). Le but ultime de la réponse à médiation cellulaire est la destruction de la cellule contenant le pathogène ou présentant l'anomalie. Les lymphocytes Th2 quant à eux vont sécréter d'autres cytokines comme l'IL-4, l'IL-10, l'IL-13, l'IL-5 permettant la mise en place d'une réponse humorale. Ces cytokines vont stimuler la différenciation des lymphocytes B ayant reconnu le pathogène ou l'anomalie du « soi » par le BCR (**Cf. 2.1**) en cellules spécialisées dans la production d'anticorps, les plasmocytes. Ces anticorps ainsi produits sont libérés dans l'organisme et vont neutraliser les antigènes présents dans le milieu extracellulaire. Les antigènes ainsi recouverts d'anticorps forment des « complexes immuns » plus facilement détectables par l'organisme. Les cellules NK, les macrophages, les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles peuvent alors reconnaître ces complexes et détruire le pathogène par une action cytotoxique dépendante des anticorps appelée ADCC (« Antibody Dependent Cell Cytotoxicity »). Enfin, les molécules circulantes du complexe moléculaire du complément peuvent également procéder à une cytolysse en opsonisant le pathogène (l'opsonisation

correspond à la modification des parois du pathogène sous l'effet de molécules ou opsonines leur permettant de se fixer sur les récepteurs spécifiques du phagocyte pour les diverses opsonines) ou en reconnaissant les complexes pathogènes/anticorps.

1
IMMUNITÉ INNÉE OU NON SPÉCIFIQUE



2
IMMUNITÉ ADAPTATIVE OU SPÉCIFIQUE

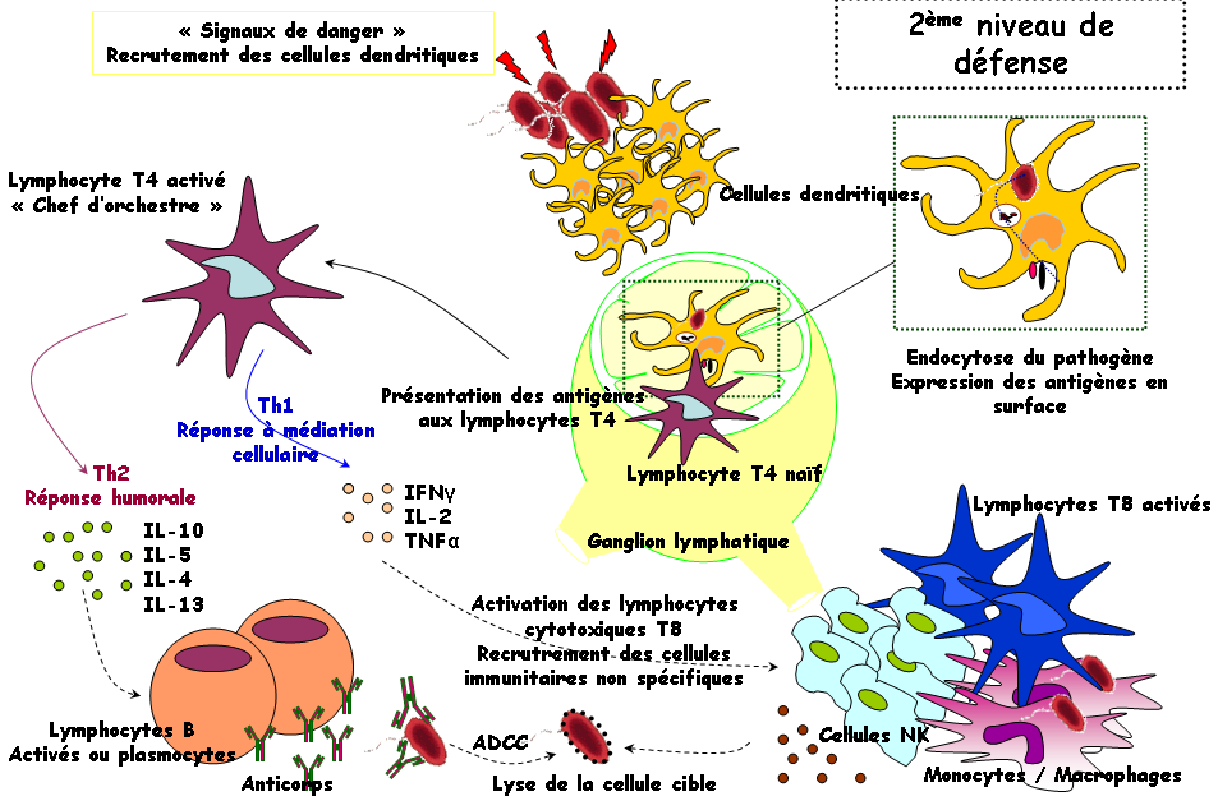


Figure : schéma-bilan de la réponse immunitaire.

II/ Stratégies immunitaires anti-tumorales

1. Stratégies naturelles

Selon la théorie de Burnet et Thomas, le système immunitaire peut reconnaître et éliminer toute cellule anormale même en absence d'une intervention thérapeutique externe. Ce concept qui existe depuis près de 100 ans est celui de l'immunosurveillance. La validité de la théorie de l'immunosurveillance des cancers a émergé récemment après une longue période de débats d'idées. En effet, cette notion qui consiste à dire que le système immunitaire pourrait protéger l'hôte de maladies néoplasiques a été initialement proposée par Ehrlich en 1909 et formellement introduite en tant que théorie de l'immunosurveillance des cancers 50 ans plus tard par Burnet et Thomas [47, 48, 49, 50].

Dans les années 1990, plusieurs études ont renoué avec cette notion d'immunosurveillance des cancers. Parmi celles-ci, certaines ont montré que la production endogène d'Interferon γ (IFN- γ) protégeait l'hôte de l'extension de tumeurs transplantées et de la formation de tumeurs spontanées et chimiquement induites [51, 52]. D'autres ont montré que des souris déficientes en perforine (pfp^{-/-}) étaient plus susceptibles à une induction tumorale par le MCA (MethylCholAnthrene) et à la formation de tumeurs spontanées comparé aux souris sauvages [53, 54]. Ces deux molécules interviendraient donc dans l'immunosurveillance des cancers puisqu'elles joueraient un rôle critique en protégeant contre l'apparition et le développement tumoral [55]. Ici, nous nous intéresserons uniquement aux effecteurs cellulaires de l'immunosurveillance des cancers (lymphocytes T, cellules NK) après une brève description des différents antigènes rencontrés au niveau tumoral.

1.1. Antigènes tumoraux

Il a été observé à la fois chez l'Homme et chez les animaux que de nombreuses tumeurs induisent une réponse immunitaire [56, 57, 58, 59] et les efforts se sont focalisés sur des études concernant les antigènes associés aux tumeurs (Tumor Associated Antigen ou TAA) dans l'espoir de mettre en place une réaction de réjection anti-tumorale. En général le terme d'antigène désigne un composé qui induit une réponse immunitaire de la part de l'organisme et dans la plupart des cas ce composé est reconnu comme du « non soi ». Cependant, il a été montré que de nombreux TAAs sont des produits du « soi » sélectivement exprimés dans certains types de tumeurs émergentes. Les TAAs peuvent appartenir à une famille de protéines mutées du « soi », spécifiques à un clone tumoral. Ils peuvent aussi être des composés cellulaires codés par des oncogènes, ou éventuellement des produits de gène ayant été altérés ponctuellement (mutations). Enfin, ils peuvent être des produits de gènes de virus oncogènes. Les TAAs, qu'ils proviennent de composés du « soi » mutés ou non mutés sont en majorité faiblement immunogènes ou considérés comme non immunogènes [60].

Parmi les principaux TAAs, nous pouvons citer l'Antigène Carcino-Embryonnaire (ACE) [61, 62] ; l'Alpha-Foeto-Protéine (AFP) [63, 64] ; HER-2/neu [65] ; G250 [66] ; MUC-1 [67] ; l'antigène oncofoetal (OFA/iLRP) [68] ; les antigènes de mélanomes/mélanocytes comme Melan-A-MART-1 [69], gp 100 [70], MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3, MAGE-12, BAGE, GAGE [71] et la β -caténine [72] ; la caspase-8 [73], p53 [74] ... Cette liste des principaux TAAs n'est pas exhaustive et de nouveaux antigènes découverts sont progressivement rajoutés à la liste existante. Certains TAAs présents en très faible quantité dans les tissus sains des organismes adultes (AFP, ACE) sont surexprimés dans les cellules cancéreuses. C'est pourquoi ces composés surexprimés sont utilisés comme marqueurs pour dépister la présence de tumeurs en progression.

1.2. Les effecteurs cellulaires de l'immunosurveillance des cancers

Les systèmes de l'immunité innée et de l'immunité adaptative participent tous deux au processus d'immunosurveillance des cancers. Girdali et al. [75] ont examiné les contributions relatives des différentes cellules T dans le processus d'évolution de la formation tumorale chez des souris KO $\text{TCR}\beta^{-/-}$ et/ou $\text{TCR}\delta^{-/-}$. Pour ce type d'animaux traités chimiquement par MCA (MethylCholAnthrene), une augmentation de l'incidence des fibrosarcomes et des carcinomes fusiformes a été observée, démontrant le rôle protecteur des cellules T $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$ dans ce modèle particulier de développement tumoral.

De même, dans le cas de modèles de mélanomes chimiquement induits par le DMBA (7,12-DiMethyl-Benz[a]Anthracene) et par le TPA (12-O-TetradecanoylPhorbol-13-Acetate) chez des souris $\text{TCR}\delta^{-/-}$, une susceptibilité accrue à la formation de la tumeur a été observée. Ces résultats suggèrent que l'immunosurveillance peut être un processus multivariable qui requière les actions de différents effecteurs de manière dépendante avec l'origine du type de cellule tumorale, avec les mécanismes de transformation, avec la localisation anatomique de la tumeur et avec les mécanismes de reconnaissance immunologique [55].

De plus, il a été montré que les cellules NK et NKT interviennent également dans cette immunosurveillance dans la mesure où les souris C57BL/6 déplétées en cellules NK et NKT sont 2 à 3 fois plus susceptibles à la formation de tumeurs chimiquement induites par le MCA que les souris contrôles [76].

2. Stratégies thérapeutiques anti-tumorales : immunothérapie

Les protocoles d'immunothérapie anti-tumorale, chez l'homme, se sont largement développés ces dix dernières années grâce notamment à l'identification de nombreux antigènes de tumeurs reconnus spécifiquement par des lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ [77]. Parmi les différents modes d'immunothérapie actuellement à l'essai, l'immunothérapie active ou vaccination thérapeutique consiste à injecter un ou plusieurs antigènes tumoraux, sous diverses formes, afin de stimuler une réponse immunitaire T in vivo et l'immunothérapie adoptive ou passive consiste à injecter des lymphocytes T spécifiques d'antigènes tumoraux, lymphocytes générés et sélectionnés ex vivo par une culture appropriée.

Des essais de vaccination thérapeutique se sont développés dans le cadre de cancers comme le mélanome, le cancer de la prostate et le cancer du sein. Ces essais consistent à injecter au patient une protéine antigénique exprimée par sa tumeur ou des peptides dérivés de celle-ci ou encore, plus récemment, des cellules dendritiques présentant ces peptides. Malheureusement, bien que des réponses immunitaires spécifiques des antigènes tumoraux ciblés commencent à être observés, les résultats demeurent encore trop hétérogènes [78].

Partant de l'observation que des lymphocytes T spécifiques des cellules tumorales sont présents en nombre important dans certains cancers et de l'identification d'un facteur de croissance de ces lymphocytes, l'interleukine 2 (IL-2), le groupe de Steven Rosenberg [79] aux Etats-Unis a commencé, dès les années 1980, les essais d'immunothérapie adoptive chez l'homme par transfert de TILs (Tumour Infiltrating Lymphocytes). Ces lymphocytes T au phénotype variable ont été décrits comme infiltrant les tumeurs et un nombre important de ces cellules retrouvées au niveau tumoral a souvent été corrélé à une amélioration du pronostic et à une augmentation de la survie dans des modèles animaux

[80, 81, 82, 83]. De ce fait des essais cliniques, notamment dans le cadre du mélanome [84, 85] et du gliome [86, 87, 88, 89, 90] utilisent ces TILs dans des protocoles d'immunothérapie passive [91, 92, 93]. Ces TILs comprennent les lymphocytes T CD8+ qui vont avoir une activité cytotoxique sur la tumeur en libérant de la perforine (lyse de la membrane plasmique des cellules tumorales) et des granzymes (entrent dans la cellule puis la lysent) et les lymphocytes T CD4+ qui, en tant que chefs d'orchestre de l'immunité spécifique, vont activer les lymphocytes CD8+ en sécrétant de l'INF γ , du TNF α et de l'IL-2 (Cf. I.2.2). Cependant l'action des lymphocytes cytotoxiques ne permet pas à elle seule l'élimination de la tumeur.

B. IRM CELLULAIRE

I/ Imagerie cellulaire

1. Intérêt de l'imagerie cellulaire

Utiliser l'imagerie pour suivre la migration de cellules in vivo est actuellement une des pistes fortement envisagée pour des approches thérapeutiques, diagnostiques ou même mécanistiques de nombreuses pathologies. En effet, l'imagerie peut être utilisée dans une large étendue de problèmes biomédicaux (maladies dégénératives, malformations myocardiques, infarctus du myocarde, diabète...) pour suivre l'implantation puis la migration de cellules, ceci dans un cadre de thérapie cellulaire [94]. Elle peut être également utilisée pour comprendre les mécanismes mis en jeu par ces cellules (mécanismes de l'inflammation, de l'auto-immunité, mécanismes anti-tumoraux...).

Concernant la thérapie cellulaire, de nombreux auteurs [95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102] ont décrit le suivi en imagerie de cellules souches, l'intérêt étant de visualiser la rétention, la migration et la localisation de ces cellules transplantées qui viennent reconstituer les tissus dégénérés. L'utilisation de ces précurseurs cellulaires qui ont un fort potentiel thérapeutique est une stratégie prometteuse dans le traitement des neurodégénérescences [103, 104, 105] et de l'ischémie myocardique [106, 107, 108], par exemple. Le suivi en imagerie de cellules immunitaires comme les cellules dendritiques [109] et les macrophages [110, 111] a également été étudié. Il en est de même pour les lymphocytes, cellules hautement spécialisées [112, 113, 114, 115, 116, 117]. Le succès d'une thérapie cellulaire repose en partie sur l'aptitude des cellules à atteindre leur cible. La possibilité de localiser in vivo ces populations cellulaires spécifiques constitue un des éléments clés d'optimisation et de développement de la thérapie cellulaire. En particulier, dans le cadre des thérapies anti-tumorales, si la possibilité d'induire une régression de certains types de cancer [118] a, par l'injection adoptive de cellules immunitaires (les

cellules LAK ou Lymphokine-Activated Killer [79], les TILs ou Tumor-Infiltrating Lymphocytes, les lymphocytes de donneur après une transplantation de cellules souches et les cellules NK ou Natural Killer), été démontré chez les patients, les mécanismes de circulation de ces cellules dans le microenvironnement tumoral restent encore largement méconnus. Pourtant, la connaissance de la biodistribution spatiale et temporelle des cellules constitue un point déterminant pour optimiser l'efficacité thérapeutique et identifier les meilleurs modes d'administration. Par conséquent, la possibilité de suivre la migration de cellules *in vivo* en imagerie est fondamentale afin d'observer leur comportement vis-à-vis de la tumeur.

L'imagerie cellulaire trouve son prolongement dans l'imagerie moléculaire qui permet d'observer le fonctionnement de cellules *in vivo*, notamment les processus moléculaires ou l'expression de gènes. Pour cela, les molécules d'intérêt ou le produit de l'expression des gènes sont étiquetés par des agents de contraste dit « intelligents » afin de voir où ils se fixent et où et quand ils sont exprimés.

2. Techniques d'imagerie cellulaire *in vivo*

Suivre *in vivo* la distribution et le mouvement de cellules spécifiques [100] est un challenge majeur en terme de résolution spatiale et de contraste auxquelles les techniques d'imagerie sont confrontées. La plupart du temps, à cause du faible nombre de cellules à observer, il devient difficile de faire du « tracking » malgré les progrès techniques accomplis.

L'observation directe de cellules *in vivo*, de façon non invasive, n'est pas possible et requière le marquage des cellules par une sonde. Une fois marquées, les cellules peuvent alors être observées. A chaque technique d'imagerie correspond une ou plusieurs sondes spécifiques. Cette sonde va souvent être responsable, en grande partie, de la sensibilité de

la technique d'imagerie cellulaire. Le potentiel des techniques d'imagerie cellulaire va donc être caractérisé à la fois par la résolution spatiale, par la sensibilité, par la nature des organes à explorer, par la possibilité de quantifier le nombre de cellules impliquées et par le caractère ionisant ou non de la technique d'imagerie. Les caractéristiques liées à la sonde, à savoir la toxicité, la biocompatibilité, la facilité d'incorporation dans la cellule ainsi que la stabilité du marquage au cours du temps, jouent également un rôle dans le potentiel de ces techniques.

Il est possible de classer les techniques d'imagerie cellulaire en fonction de la résolution spatiale et de la sensibilité qu'elles apportent. D'une part, se trouvent les techniques très sensibles mais avec une faible résolution comme les techniques d'imagerie optique (par bioluminescence ou par fluorescence) et les techniques basées sur l'utilisation de radionucléides (Tomographie par Emission de Positons ou TEP, Tomodensitométrie ou TDM, TEP-TDM ou TEP-scan, Single Photon Emission Computed Tomography ou SPECT). D'autre part, se trouvent les techniques moins sensibles que les précédentes mais ayant une résolution spatiale plus élevée comme l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM).

2.1. Techniques optiques

L'imagerie optique repose sur la transmission d'un faisceau lumineux à travers les tissus. Deux techniques d'imagerie optique peuvent être utilisées pour le suivi cellulaire in vivo : l'imagerie par fluorescence qui s'appuie sur la détection de fluorochromes (le plus connu est la GFP ou Green Fluorescent Protein) après excitation transcutanée par un laser et l'imagerie par bioluminescence qui repose sur l'utilisation de molécules qui émettent naturellement des photons après injection d'un substrat donné (le plus connu est la luciférine obtenu par action d'une enzyme, la luciférase). L'émission lumineuse est généralement observée au moyen d'une caméra CDD (Charge-Coupled Device) refroidie.

Dans les deux cas, ces techniques d'imagerie sont bien adaptées au suivi de cellules. Il est en effet possible d'obtenir des cellules qui peuvent soit synthétiser une molécule fluorescente ou une « enzyme bioluminescente » [119, 120] soit être marquées par un agent exogène [121]. Il devient alors possible de suivre une population spécifique de cellules in vivo en imagerie. Dans le cadre du diagnostic tumoral, Ito et al. ont montré qu'il était possible d'utiliser l'imagerie par fluorescence pour visualiser la formation de micrométastases hépatiques chez la souris [122].

L'utilisation d'une lumière dans le domaine du visible ($\lambda = 400 - 800 \text{ nm}$) est limitée par la pénétration en profondeur dans le tissu puisque celui-ci va absorber et disperser la lumière qui le traverse. Elle peut toutefois permettre une analyse de l'échantillon sur plusieurs centaines de μm de profondeur. Une exploration plus en profondeur des tissus requière l'utilisation d'une lumière proche infra-rouge (imagerie NIR, Near InfraRed, $\lambda = 700 - 5000 \text{ nm}$) et de sondes avec des longueurs d'onde d'excitation et d'émission qui ne sont pas aussi facilement absorbées par les tissus (absorption due principalement à l'eau et l'hémoglobine) [123].

De nombreuses améliorations en imagerie optique ont vu le jour. Ces améliorations passent aussi bien par la mise au point de nouvelles techniques que par le développement de nouveaux marqueurs. Ces nouvelles techniques ont été décrites, certaines d'entre elles étant utilisées pour faire des images de l'expression de gènes in vivo. Outre la fluorescence et la bioluminescence, elles reposent aussi sur l'absorption ou la réflexion comme sources de contraste. Ce sont la tomographie optique diffuse [124], l'imagerie pondérée en surface [125, 126] (tomographie par réflexion diffuse), l'imagerie confocale [127, 128, 129], l'imagerie multiphotonique [130, 131, 132] et la microscopie intravitale [133, 134].

2.2. Techniques d'imagerie nucléaire

La Tomographie par Emission de Positons ou TEP (Positron Emission Tomography ou PET en anglais), couramment employée en clinique, permet de réaliser une imagerie métabolique, véritable cartographie biochimique in vivo. L'utilisation de radioéléments émetteurs de positons permet une étude et une quantification tridimensionnelle de leur répartition in vivo. Le ^{18}F est actuellement l'émetteur de positons le plus facilement utilisable en raison de sa demi-vie de 109 minutes, longue pour un émetteur de positons, permettant son transport depuis son lieu de production (le cyclotron) jusqu'à son site d'utilisation (le service de médecine nucléaire). Le positon une fois émis, parcourt quelques millimètres dans les tissus et, lors de la rencontre d'un électron du milieu biologique, s'annihile en libérant deux photons γ de 511 keV émis simultanément et en direction opposée à 180° . Cette propriété permet une localisation du lieu d'émission [135] après détection des photons par une couronne de détecteurs. L'utilisation de la TEP présente un intérêt notamment en oncologie [136, 137]. Les cellules tumorales présentent des perturbations du métabolisme glucidique qui conduit à l'accumulation du déoxyglucose dans les cellules atteintes. Son marquage possible par le ^{18}F (^{18}F fluoro-déoxy-glucose ou FDG, Flu-Cis[®]) permet ainsi de réaliser une imagerie des tumeurs, toute accumulation étant le témoin de la modification métabolique cellulaire [135].

Alors que la sensibilité en TEP est élevée et que les images se font rapidement [123], la résolution spatiale est limitée (5-6 mm chez l'homme) et requiert l'utilisation de radioéléments qui, pour la plupart, ont une toxicité cellulaire significative et une demie vie courte permettant de faire des images sur un temps limité (24-48h) [41]. Dans le but d'améliorer la résolution spatiale, des systèmes de micro-TEP ont été créés (résolution spatiale isotrope autour de 1-2 mm [138]).

Outre la TEP et la micro-TEP, une autre technique basée sur l'utilisation de radioéléments existe. L'imagerie SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography) ou TEMP (Tomographie à Emission Mono-Photonique) [139, 140, 141] repose sur la détection, au moyen d'une gamma caméra, des rayonnements γ émis directement par des radiotraceurs marqués le plus souvent au ^{99m}Tc ou ^{123}I . La sensibilité des systèmes simple-photon est intrinsèquement environ deux fois moins grande que celle des systèmes TEP et de fortes doses de radiopharmaceutiques doivent être administrées à cause de cette perte de sensibilité [123].

Enfin, pour permettre un repérage anatomique précis des lésions cancéreuses, la TEP peut être associée à un scanner ou TDM (tomodensitomètre) multi-barettes. C'est la TEP-TDM ou PET-CT (Positron Emission Tomography - Computed Tomography) en anglais.

Concernant l'imagerie cellulaire, les études antérieures se sont basées sur l'utilisation de radiomarqueurs et traceurs TEP pour suivre les cellules in vivo. Dès 1983, de l'oxine marqué à l'Indium 111 a été utilisé pour marquer des lymphocytes ex vivo puis pour suivre leur recrutement au niveau de la thyroïde une fois réinjectés chez des patients atteints de thyroïdite [142]. Plus récemment, des approches similaires ont vu le jour pour faire des images de suivi cellulaire in vivo chez de petits animaux [143, 144, 145]. Ces techniques impliquent un radiomarquage ex vivo des cellules de l'hôte ou l'introduction de lignées cellulaires marquées chez l'animal. Ces techniques basées sur le radiomarquage présentent une excellente sensibilité. Malheureusement, la résolution spatiale est limitée et la question de l'interaction du rayonnement ionisant avec le métabolisme cellulaire reste posée.

2.3. IRM cellulaire

L'Imagerie par Résonance Magnétique ou IRM est maintenant capable de fonctionner à une résolution microscopique (quelques dizaines de μm) pour des modèles de petits animaux et peut être utilisée pour analyser des marqueurs physiologiques et cellulaires [123]. Elle permet d'obtenir des images à relativement haute résolution et, grâce à son innocuité, peut servir pour suivre des cellules marquées sur des périodes de temps prolongées (jusqu'à plusieurs jours). Nous allons traiter plus en détail de l'IRM cellulaire dans la partie suivante.

II/ IRM cellulaire

1. Introduction

L'examen IRM est basé sur les propriétés magnétiques des noyaux d'hydrogène des substances composant les tissus biologiques. Le contraste de l'image dépend essentiellement de paramètres intrinsèques caractéristiques du tissu étudié (densité protonique, temps de relaxation longitudinal (T1), temps de relaxation transversale (T2), susceptibilité magnétique) et de paramètres extrinsèques dépendant directement des paramètres des séquences choisies pour la réalisation des images et donc modulables par l'opérateur. Toutefois le contraste entre les tissus n'est pas toujours suffisant pour permettre la différenciation nette des structures que l'on souhaite observer. Dès lors, l'utilisation d'agents de contraste qui, par leurs propriétés magnétiques, modifient les caractéristiques des tissus, va permettre d'accroître les contrastes différentiels des images.

2. Agents de contraste pour l'IRM cellulaire

2.1. Propriétés des agents de contraste en IRM

Les variations du signal RM (Résonance Magnétique) observées après utilisation de produits de contraste sont dues aux interactions de ces derniers avec la source de signal magnétique, les noyaux d'hydrogène. L'augmentation des contrastes dépend de divers paramètres : la classe de l'agent de contraste, sa concentration dans les structures à observer, la nature de ces structures, le confinement dans les espaces cellulaires et le type de séquence d'IRM utilisée. Les agents de contraste diminuent les temps de relaxation T1 et T2 et donc accélèrent les vitesses de relaxation $1/T1$ et $1/T2$. L'efficacité de ces produits sur les vitesses de relaxation est proportionnelle à leur concentration. Deux classes majeures d'agents de contraste sont utilisées en recherche pour de l'IRM cellulaire : les agents de contraste superparamagnétiques (nanoparticules d'oxydes de fer) et les agents de contraste paramagnétiques (chélates de Gadolinium, entre autres). L'effet de ces deux classes de produits, aux doses usuelles, est globalement opposé.

Les agents paramagnétiques présentent un effet T1 prépondérant. En effet, dans la mesure où les relaxivités $r1$ et $r2$ (pentes des droites $1/T1$ et $1/T2$ en fonction de la concentration) de ces agents sont du même ordre de grandeur et que les T1 dans les cellules sont beaucoup plus élevés que les T2 (de l'ordre de 10 fois), l'effet T1 est prépondérant sur l'effet T2. Une diminution du T1 aura pour effet, sur des séquences pondérées en T1, de rehausser le signal. Cet effet sera d'autant plus marqué que la pondération de la séquence en T1 sera importante. Les agents qui ont un effet prépondérant sur le T1, comme les agents paramagnétiques, sont dits agents de contraste positifs.

Les agents superparamagnétiques sont des agents de susceptibilité magnétique. Ils présentent un effet T2 dominant et la valeur très élevée de leur relaxivité r_2 entraîne un tel déphasage qu'il s'exprime de façon prépondérante à tout effet T1. Une diminution du T2 aura pour effet, sur des séquences pondérées en T2, mais également sur des séquences pondérées en T1, de diminuer le signal. Cet effet dépend donc moins de la séquence utilisée. Les agents qui ont un effet prépondérant sur le T2, comme les agents superparamagnétiques, sont dits agents de contraste négatifs.

Les agents de contraste, qu'ils soient paramagnétiques ou superparamagnétiques, ont à la fois un effet T1 et un effet T2. Tout dépend du type de séquence et de la concentration à laquelle ils sont utilisés. Ainsi, de fortes doses en complexes de Gadolinium ainsi que l'utilisation d'une séquence pondérée T2 ou T2* permettra de faire de l'imagerie négative (effondrement du signal RM là où sont présents les agents de contraste), même si peu de travaux vont dans ce sens [146]. A l'opposé, l'utilisation de très faibles doses en particules superparamagnétiques ainsi que l'utilisation d'une séquence pondérée T1 peut aussi permettre de faire de l'imagerie positive (rehaussement du signal RM) [147, 148].

2.2. Agents de contraste superparamagnétiques

Ce sont des agents de contraste dits négatifs qui ont pour effet principal de diminuer le temps de relaxation transversale (T2) des protons de l'eau et génèrent ainsi un contraste négatif en diminuant l'intensité du signal RM. Les particules superparamagnétiques sont toutes à base de noyaux d'oxydes de fer cristallisés (magnétite) et possèdent des moments magnétiques importants. Ces noyaux, en solution à pH neutre ou acide, ont tendance à s'agréger. Afin d'éviter l'agrégation et d'augmenter la biocompatibilité entre les particules et les cellules, les noyaux d'oxydes de fer sont recouverts de molécules diverses (dextran, PEG, citrate, bisphosphonates...) apportant une stabilité aux agents de contraste et

améliorant l'affinité de ces composés pour les structures biologiques. Ces molécules de recouvrement viennent s'adsorber à la surface des cristaux d'oxydes de fer et confèrent ainsi aux particules des charges anioniques, cationiques ou l'absence de charges. Ces charges influent certainement sur la capacité des particules à être internalisées dans les cellules car elles favorisent la fixation des agents de contraste à la membrane cellulaire [35]. D'autre part, les molécules de recouvrement peuvent être modifiées en greffant par exemple des anticorps monoclonaux qui permettront un ciblage spécifique [5, 149].

Trois classes de particules superparamagnétiques se distinguent en fonction de la taille hydrodynamique du noyau d'oxydes de fer : les SPIOs (SuperParamagnetic Iron Oxides) qui ont un noyau dont la taille est comprise entre 50 et 3500 nm [150], les USPIOs (Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxides) de petite taille (< 50 nm) [151] et les MIONs (Monocrystalline Iron Oxides Nanopreparations). Les particules MIONs possèdent des propriétés magnétiques similaires à celles des SPIOs et USPIOs mais ont des tailles encore plus petites (3 à 9 nm), ce qui les rend plus adaptées au marquage cellulaire [152, 153]. Elles constituent une sous catégorie parmi les particules USPIOs. C'est pourquoi nous ne les présenterons pas dans ce qui suit.

Dans la famille des SPIOs, deux composés sont commercialisés : les Ferumoxides (Endorem[®], Feridex[®]) et le Ferucarbotran (Resovist[®]). Ces nanoparticules ont une taille moyenne (60 nm) et sont recouvertes de dextran pour les Ferumoxides et de carboxydextran pour le Ferucarbotran (**figure 1**). Dans les deux cas, les applications cliniques sont la détection de tumeurs hépatiques [154]. Dans la famille des USPIOs, divers recouvrements sont utilisés et les applications cliniques sont variées : des particules recouvertes de dextran (Ferumoxtran-10) pour de l'imagerie du système lymphatique [155, 156], des particules recouvertes de citrate (VSPO) pour de la caractérisation préclinique [157], des particules recouvertes d'amidon pegylé (Feruglose) pour de

l'angiographie coronarienne [158] ou encore des particules recouvertes de carboxydextran (SHU555C) pour explorer la région aorto-iliaque [159].

De multiples facteurs déterminent l'efficacité RM de ces agents de contraste tels que la taille des cristaux d'oxydes de fer, la charge, la nature du recouvrement, la taille hydrodynamique des particules recouvertes ... Ces caractéristiques physico-chimiques n'affectent pas seulement l'efficacité RM des particules superparamagnétiques mais aussi leur stabilité, leur biodistribution, leur opsonisation (reconnaissance et élimination par les cellules phagocytaires, améliorée après fixation d'une partie du complément C3 ou C4 à la surface de la particule), leur métabolisme et leur élimination du compartiment vasculaire [160].

Table 1 MRI contrast agents on the market

Contrast agent	Structure	Classification	Target	Producer
Magnevist [®]	Gd-DTPA	T ₁ -agent	Extracellular agent	Schering AG, Germany
Omniscan [®]	Gd-DTPA-BMA	T ₁ -agent	Extracellular agent	Amersham-Nycomed, Norway
ProHance [®]	Gd-DO3A-HP	T ₁ -agent	Extracellular agent	Bracco Imaging, Italy
Dotarem [®]	Gd-DTOA	T ₁ -agent	Extracellular agent	Guerbet SA, France
OptiMARK [®]	Gd-DTPA-BMEA	T ₁ -agent	Extracellular agent	Mallinckrodt, Inc, USA
Gadovist [®]	Gd-DO3A-Butriol	T ₁ -agent	Extracellular agent	Schering AG, Germany
Multihance [®]	Gd-BOPTA, Gadobenate	T ₁ -agent	Liver specific agent	Bracco imaging, Italy
Eovist [®]	Gd-EOB-DTPA, Gadoxetate	T ₁ -agent	Liver specific agent	Schering AG, Germany
Teslascan [®]	Mn-DPDP, mangafodipir	T ₁ -agent	Liver specific agent	Amersham imaging, Great Britain
Feridex [®]	Iron oxide particles, Ferumoxide	T ₂ -agent	Liver specific agent	Berlex, USA
Endorem [®]	Iron oxide particles	T ₂ -agent	Liver specific agent	Guerbet, France
Resovist [®]	Iron oxide nanoparticles coated with carboxydextran, diameter: 60 nm	T ₂ -agent	Liver specific agent	Schering AG, Germany

Figure 1 : principaux agents de contraste T1 et T2 commercialisés.

Yan GP. et al., Magnetic resonance imaging contrast agents : overview and perspectives. Radiography. 2006 ; in press.

2.3. Agents de contraste paramagnétiques : les chélates de Gadolinium

Ces agents de contraste dits positifs diminuent principalement le temps de relaxation longitudinal (T1) des protons de l'eau et, par conséquent, augmentent l'intensité du signal RM, apportant ainsi un contraste positif. Ce sont des composés qui possèdent un ou plusieurs électrons libres dont le moment magnétique est 657 fois plus élevé que celui du proton. Parmi ces composés se trouvent l'oxygène, les nitroxydes, les métaux de transition, les lanthanides(III) dont le Gadolinium(III) qui est le plus utilisé. Le Gadolinium est un ion métallique (7 électrons célibataires) de la famille des terres rares qui est hautement toxique dans sa forme hydratée $[\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_8]^{3+}$. En effet, in vivo, il bloque le système réticulo-endothélial, entre en compétition avec les systèmes calcium dépendants, a un effet sur la contractilité myocardique et un effet neurotoxique. D'autre part, il précipite sous forme de Chlorure de Gadolinium. Il doit donc être complexé sous forme de chélates qui sont des molécules stables permettant de masquer la toxicité du Gadolinium et prévenant la précipitation de l'ion tout en maintenant ses propriétés paramagnétiques.

Parmi ces chélates de Gadolinium, on distingue notamment le Gd-DTPA (Magnevist[®]) qui a une structure linéaire ionique, le Gd-DOTA (Dotarem[®]) qui a une structure macrocyclique ionique, le Gd-DTPA-BMA (Omniscan[®]) qui a une structure linéaire non ionique et le Gd-HP-DO3A (Prohance[®]) qui a une structure macrocyclique non ionique (**figures 1 et 2**). Après injection en systémique, ces agents de contraste vont cibler l'espace intravasculaire ainsi que les cavités extracellulaires par filtration rapide au niveau des capillaires. Ils sont donc utilisés en routine pour détecter les lésions vasculaires, abdominales et hépatiques [161].

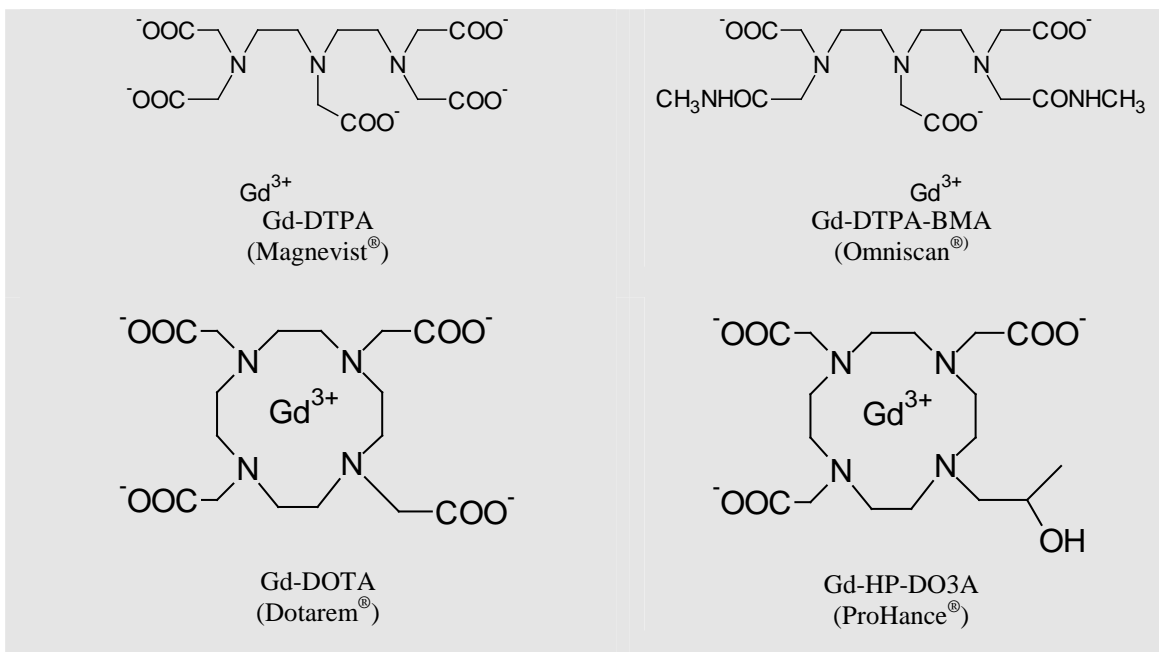


Figure 2 : structure d'agents de contraste paramagnétiques commerciaux (<http://w3.umh.ac.be/chimie/docs/RMN/rmn-1.htm>).

2.4. Comparaison agents paramagnétiques et superparamagnétiques

Les particules d'oxydes de fer superparamagnétiques (SPIOs) qui ont été introduites comme agents de contraste peu après l'utilisation des chélates de Gadolinium [162, 163, 164, 165] sont aujourd'hui les agents de contraste préférentiellement utilisés pour l'IRM cellulaire [8]. L'intérêt porté à ces particules superparamagnétiques est principalement dû aux propriétés suivantes :

- Sensibilité $T2^*$: les particules d'oxydes de fer entraînent une modification du signal par unité de métal plus importante que les chélates de Gadolinium, en particulier avec des séquences pondérées $T2^*$ (meilleure sensibilité qu'avec une pondération $T2$ mais images plus artéfactées). Etant composées de milliers d'atomes de fer, elles ont donc une sensibilité en IRM plus élevée que les agents de contraste paramagnétiques. Par ailleurs,

en modulant la taille de ces particules, il est possible de changer leurs propriétés magnétiques. L'inconvénient de l'utilisation de ces agents de contraste superparamagnétiques est que la perturbation du signal est hypointense comme celle provoquée par la désoxyhémoglobine au niveau du sang (difficulté d'identification de la provenance des hyposignaux sur l'image).

- Charge intracellulaire en agents de contraste : les nanoparticules d'oxydes de fer tendent à donner un meilleur contraste que les agents de contraste paramagnétiques probablement en permettant un haut niveau d'accumulation de l'agent de contraste superparamagnétique dans les endosomes cellulaires.

- Biocompatibilité : les nanoparticules superparamagnétiques sont constituées de fer biodégradable qui est biocompatible avec les cellules. Elles peuvent donc être facilement recyclées par les cellules qui vont utiliser les voies métaboliques classiques de prise en charge du fer. Par contre, les complexes de Gadolinium, molécules chargées et hydrophiles, sont imperméables aux membranes cellulaires et sont captés par les cellules de manière très lente (endocytose naturelle difficile) [166]. L'exposition intracellulaire de ces chélates paramagnétiques à des environnements acides (lysosomes, vésicules ...) entraîne une dissociation de l'ion métallique et du chélate, provoquant une toxicité cellulaire. Toutefois, les particules d'oxydes de fer ajoutées dans le milieu de culture à fortes concentrations présentent également une toxicité envers les cellules (Cf. 3.5).

- Fonctionnalisation de l'agent de contraste : la molécule de recouvrement des particules d'oxydes de fer est généralement le dextran, composé qui peut être facilement modifié chimiquement et sur lequel il est possible de greffer des groupements fonctionnels et des ligands en vue d'un ciblage actif.

3. Marquage cellulaire

Malgré la bonne résolution spatiale de l'Imagerie par Résonance magnétique (jusqu'à quelques dizaines de μm), les cellules, *in vivo*, ne peuvent pas être détectées directement à cause du faible contraste avec les structures avoisinantes. Il est donc nécessaire d'utiliser un marqueur qui va apporter du contraste au type cellulaire qu'il est souhaitable de suivre en imagerie. Parmi ces marqueurs encore appelés agents de contraste, les deux catégories principales sont les agents de contraste paramagnétiques (chélates de Gadolinium) et les agents de contraste superparamagnétiques (particules d'oxydes de fer) précédemment décrits.

Il apparaît qu'en fonction du type d'agent de contraste utilisé et du type cellulaire à marquer, l'efficacité de marquage ne sera pas la même. Il semble donc y avoir une spécificité entre l'agent de contraste (la balise) et le type cellulaire (le vecteur). Certaines balises vont être particulièrement bien adaptées à certains vecteurs cellulaires, ce qui permettra la mise en œuvre de techniques de marquage rudimentaires voire l'absence de technique de marquage (agents de contraste naturellement internalisés par phagocytose/endocytose lors de l'ajout de ces derniers dans le milieu de culture) alors que d'autres ne le seront pas. Lorsque la compatibilité entre l'agent de contraste et le vecteur cellulaire ne sera pas très bonne (efficacité de marquage faible/très faible), alors il sera nécessaire d'utiliser des artifices (vecteurs non viraux, viraux). Cependant, ces artifices qui augmentent l'efficacité de marquage et par conséquent la sensibilité en IRM, peuvent induire une certaine toxicité envers la cellule. Ainsi, il sera nécessaire de trouver le bon compromis entre la sensibilité RM induite par l'agent de contraste et la toxicité de ce dernier. Nous verrons par la suite les avantages et les inconvénients apportés par ces différentes techniques de marquage.

L'internalisation des agents de contraste dans les cellules est liée à la capacité qu'aura la cellule à recevoir et fixer l'agent de contraste. La capacité d'incorporation est donc dépendante de la surface de la cellule, de l'encombrement stérique et des charges présentes à la surface de l'agent de contraste. En effet, il a été montré que la capacité d'endocytose des particules d'oxydes fer était fonction de la surface de la cellule et que plus la cellule avait une taille importante, meilleure était l'incorporation. D'autre part, les particules AMNP (Anionic Maghemite NanoParticles, particules d'oxydes de fer superparamagnétiques chélatées avec l'acide meso-2,3-dimercaptosuccinique) présentent une haute affinité pour les membranes cellulaires, affinité principalement due aux interactions électrostatiques entre la membrane et les agents de contraste [35].

3.1. Marquage par internalisation naturelle

L'efficacité de marquage va dépendre principalement de la nature des nanoparticules d'oxydes de fer utilisées (nature des molécules de recouvrement, utilisation d'agents de transfection non viraux, viraux), de la concentration en fer dans le milieu et bien sûr du type cellulaire à marquer. In vitro, la possibilité de marquer différents types cellulaires est plus importante qu'in vivo. En effet, le marquage in vivo ne peut concerner que les cellules possédant des propriétés de phagocytose élevées comme les macrophages alors que le marquage in vitro peut concerner aussi bien les cellules phagocytaires (macrophages, cellules souches, cellules dendritiques) que les cellules n'ayant pas ces capacités (lymphocytes). Cependant, l'avantage du marquage in vivo est qu'il est direct (injection par voie intraveineuse des agents de contraste) contrairement au marquage in vitro qui nécessite une étape préalable de prélèvement des cellules et une étape de réinjection (problème du maintien de la viabilité et de la fonctionnalité des cellules).

In vivo, le type cellulaire le plus connu pour internaliser un grand nombre de composés de façon naturelle est le macrophage. Après injection intraveineuse de

nanoparticules d'oxydes de fer, les cellules de Kupffer (macrophages spécialisés au niveau hépatique) internalisent les nanoparticules. Des hyposignaux sont donc observés sur l'image RM suite au marquage in vivo des macrophages hépatiques. Dans le cas où l'architecture du tissu hépatique est perturbée comme en présence d'une tumeur hépatique primaire ou de métastases hépatiques, les cellules de Kupffer viennent à manquer et alors le signal RM n'est plus altéré [167]. Cette différenciation faite au niveau hépatique entre tissu normal et tissu néoplasique est l'application la plus significative dans l'utilisation des SPIOs. Par la suite, ont été développés les USPIOs (particules plus petites que les SPIOs ayant une demi-vie plasmatique plus longue). Ces particules sont également captées par les macrophages situés au niveau hépatique mais aussi au niveau des ganglions lymphatiques [168, 169] et de la moelle osseuse [170]. Par exemple, après administration d'USPIOs, les ganglions lymphatiques normaux apparaissent foncés sur l'image RM alors qu'en présence de métastases le signal reste isointense (même intensité de signal que sur l'image contrôle). Au niveau cérébral, l'IRM cellulaire peut aussi permettre de visualiser la rupture de la BHE (Barrière Hémato-Encéphalique). Après injection intraveineuse de particules MION-46L [171] ou d'USPIOs [172, 173, 174], les marqueurs magnétiques peuvent être phagocytés par les monocytes circulants ou passer à travers la BHE rompue puis être captés par les cellules de la microglie, avant d'être visualisés en IRM.

In vitro, les SPIOs et USPIOs non modifiés ont été utilisés à fortes concentrations pour marquer divers types cellulaires, qu'ils soient phagocytaires ou non, tels que les cellules T [33, 175], les monocytes/macrophages [176, 177, 178], les cellules de gliome [22, 23] et les cellules souches d'oligodendrocytes [179]. Des nanoparticules magnétiques anioniques (particules AMNP) ont été développées et utilisées pour marquer in vitro les macrophages [180, 35, 181]. La charge de surface négative apportée par ces particules induit une capture trois fois plus importante comparée aux conventionnels SPIOs recouverts de

dextran (Feridex[®]). Ces particules se retrouvent aussi dans des endosomes [35, 42]. Par ailleurs, il a été montré que l'endocytose phase fluide (pinocytose) ou l'injection directe dans les cellules peuvent être utilisées pour marquer ces dernières avec toute une variété d'agents T1 [182, 183].

3.2. Marquage par utilisation de vecteurs non viraux

Des méthodes d'internalisation plus efficaces sont apparues in vitro pour augmenter le marquage par les particules magnétiques. Dans ce cas, les préparations ont été optimisées c'est-à-dire modifiées par adsorption d'une molécule appropriée, en surface de l'agent de contraste, molécule qui va induire l'internalisation dans la cellule. Ici, nous ne parlerons que des molécules non virales puisque les molécules virales feront l'objet d'un chapitre à part entière.

D'un côté, des composés non spécifiques (marquage indépendant du type cellulaire ou de l'espèce animale), les agents de transfection, adsorbés à la surface des particules, permettent d'accentuer l'efficacité de marquage. Il s'agit de composés commercialisés, mélangés en solution avec les agents de contraste. Des complexes des deux éléments se forment alors par interactions électrostatiques [184]. Quand les complexes sont ajoutés dans le milieu d'incubation, l'agent de transfection transporte l'(U)SPIO à l'intérieur de la cellule par l'intermédiaire de vésicules endosomales. Parmi ces agents de transfection, se trouvent les dendrimères [185], la Poly-L-Lysine (PLL) [186], la lipofectamine [187], le sulfate de protamine [188], les lectines [189], les peptides de polyarginine [190] et le FuGene [191]. Comme le montre la plupart des études récentes, la PLL de haut poids moléculaire (autour de 400 kDa) est devenue un agent de transfection de choix [192, 193, 194, 98]. D'un point de vue mécanistique, ces agents de transfection, polymères hautement chargés, viennent se fixer sur de multiples sites au niveau de la membrane cellulaire, induisent un fléchissement de cette dernière puis une endocytose [195].

D'un autre côté, des composés spécifiques (ciblage actif) assurent également une meilleure internalisation des agents de contraste. Ce sont des anticorps monoclonaux (MAb) spécifiques de récepteurs intracellulaires. Par exemple, l'anticorps de souris anti-Tfr OX26 [196] qui reconnaît le récepteur à la transferrine peut être couplé à des particules d'oxydes de fer. Ce sont les MION-46L-OX-26 capables de marquer des cellules souches d'oligodendrocytes [100] et des précurseurs neuronaux par RME (Receptor Mediated Endocytosis) [197]. Un autre anticorps, spécifique de récepteurs des cellules dendritiques et greffé sur des particules d'oxydes de fer, permet de marquer plus efficacement les cellules. Il s'agit de l'anti CD11 biotinylé. Conjugué à des particules d'oxydes de fer recouvertes de dextran streptavidinylés, il permet d'obtenir un haut degré de marquage des cellules [198].

3.3. Marquage par utilisation d'un vecteur viral

Une autre méthode existe encore pour augmenter l'incorporation des agents de contraste dans les cellules. L'amélioration significative du marquage peut passer par le greffage du peptide Tat du virus HIV-1 sur les particules d'oxydes de fer (particules CLIO ou Cross-Linked Iron oxide). Ce peptide contient un signal de translocation membranaire qui transporte efficacement les particules superparamagnétiques dans les cellules [199, 41]. De cette manière, les particules d'oxydes de fer s'accumuleraient au niveau du cytoplasme [200] et/ou au niveau du noyau [41]. En conjuguant un nombre important de peptides Tat par particules d'oxydes de fer, la captation cellulaire a été récemment améliorée (augmentation du ratio Tat peptide / CLIO) [201]. L'utilisation de ce peptide viral a également montré son efficacité pour le marquage cellulaire par des chélates de Gadolinium [202].

3.4. Autres techniques de marquage

D'autres méthodes existent pour faciliter l'incorporation d'agents de contraste, comme l'utilisation d'un choc osmotique (marquage de globules rouges par des complexes de Gadolinium [203]) ou la magnétoélectroporation [204, 205]. La magnétoélectroporation (MEP) est une méthode alternative qui consiste à marquer instantanément ($t < 1s$) les cellules en utilisant des pulses électromagnétiques de courtes durées mais de haut voltage (par exemple, temps de 17 ms et différence de potentiel de 130 V) rendant la membrane cellulaire perméable le temps de l'incorporation des agents de contraste.

3.5. Avantages et Inconvénients de ces techniques de marquage

Même si certaines de ces techniques permettent de marquer plus efficacement les cellules comme nous le verrons au paragraphe 5, toutes présentent des avantages et des inconvénients. Les particules USPIOs non modifiées, utilisées à fortes concentrations (2mg fer / mL de milieu culture) pour améliorer l'efficacité de marquage, présentent une toxicité envers les cellules. Une quantité trop importante de fer dans le milieu va entraîner la formation de radicaux libres qui auront des effets délétères envers les cellules et provoqueront une diminution de la prolifération cellulaire voire la mort cellulaire [206]. C'est pourquoi, en utilisant des agents qui vont faciliter l'incorporation des particules dans les cellules, la quantité de fer à ajouter dans le milieu d'incubation va pouvoir être diminuée, tout en assurant un marquage efficace. L'utilisation de ces agents est d'autant plus intéressante qu'ils n'ont, d'après certaines études, aucun effet sur la viabilité et la fonctionnalité des cellules dans lesquelles ils s'incorporent. C'est le cas des particules Tat HIV-1 [116], des magnétodendrimères MD-100 [101] ou encore des particules Ferridex[®] couplées à la PLL [192].

Comme nous venons de le voir, les agents de transfection ne semblent pas altérer la viabilité et la fonctionnalité des cellules. Par exemple, les cellules souches marquées

gardent leurs capacités à proliférer et à se différencier [207, 208]. Cependant, chaque combinaison entre agents de transfection et particules d'oxydes de fer demandent à être optimisée. Si la concentration en particule est trop faible, le marquage sera insuffisant et si elle est trop forte, les complexes peuvent alors précipiter et provoquer une toxicité envers les cellules. L'intérêt de ces agents de transfection est qu'ils sont pour la plupart commercialisés. Le prix de ces produits est tout à fait abordable et la synthèse des complexes particules / agents de transfection rapide, une fois les étapes d'optimisation mises au point. A l'opposé, les particules anioniques (particules AMNP) comme les particules MION-46L-OX 26 ne sont pas commercialisées et ont donc besoin d'être synthétisées en laboratoire. Concernant ces dernières, l'inconvénient d'utiliser un anticorps monoclonal est que celui-ci est spécifique d'une espèce. La validation d'un modèle animal ne signifie donc pas forcément la mise en place immédiate d'une étude clinique. En effet, il faudrait être capable de synthétiser un nouvel anticorps capable de reconnaître les antigènes humains puisque l'injection chez l'homme d'un composé xénogénique (provenant d'une autre espèce) n'est pas autorisée. Enfin, un autre inconvénient de ces particules MION-46L-OX 26 est qu'elles reconnaissent le récepteur à la Transferrine exprimé en grand nombre dans différents types cellulaires [209], ce qui pose le problème de la spécificité de la cible à marquer.

4. Devenir cellulaire du marquage

Raynal et al. ont démontré que la capture de nanoparticules Ferumoxides (particules recouvertes de dextran) dans des macrophages se faisait par endocytose via les récepteurs scavenger SR-A [210]. Suite à la phagocytose de ces nanoparticules par les cellules de Kupffer au niveau hépatique (cellules du Système Réticulo-Endothélial, RES en anglais), les nanoparticules d'oxydes de fer sont transférées dans des endosomes qui peuvent alors fusionner avec des lysosomes, ce qui fait passer les particules d'un milieu neutre

(endosomes) vers un milieu acide (lysosomes ; pH = 4,5-5) [211]. Par ailleurs, Il a été montré que les MIONS s'accumulent dans des vésicules périnucléaires qui peuvent représenter le stade terminal de ces lysosomes et dans lesquelles l'activité enzymatique augmente avec la charge en fer dans les cellules [212, 213, 214]. L'augmentation de la production d'espèces réactives oxygénées (ERO) dans les cellules marquées par les complexes Ferumoxide-PLL suggère que ces complexes se dissolvent dans les endosomes/lysosomes et que le fer est ainsi libéré dans le cytoplasme [207].

En plus du catabolisme cellulaire des particules d'oxydes de fer pouvant expliquer une diminution du marquage au cours du temps, ce dernier peut également décroître au cours des cycles de division cellulaire successifs. Des données préliminaires ont montré qu'après 5 à 8 cycles de division cellulaire, le fer, trouvé en quantité infinitésimale, ne pouvait plus être détecté au niveau des cellules à cycle cellulaire rapide (détection du fer par bleu de Prusse ou par relaxométrie) [207, 192, 215].

5. Efficacité de marquage

L'efficacité de marquage des cellules peut être évaluée de différentes manières : évaluation faite en fonction du taux de fer incorporé par cellule, du pourcentage de cellules marquées ou encore de la capacité à détecter en IRM des cellules individualisées, avec la résolution spatiale adéquate. Cette efficacité de marquage dépend du type cellulaire à marquer et du type particulière utilisé pour ce marquage. Dans ce paragraphe, nous traiterons de l'efficacité de marquage en nous basant sur la quantité de fer intracellulaire car ces données sont plus facilement accessibles dans la littérature et nous permettront une comparaison.

Concernant le marquage des cellules connues pour leurs capacités de phagocytose (monocytes / macrophages, cellules souches, cellules dendritiques, fibroblastes, hybridomes), la quantité de fer par cellule marquée est beaucoup plus élevée (entre 50-100

pg de fer / cellule) par rapport au marquage de cellules non phagocytaires comme les lymphocytes [216, 217, 218]. Toutefois, même parmi les cellules dites phagocytaires, la quantité de fer incorporée peut être extrêmement variable. Il a été montré qu'en utilisant des particules non modifiées, de taille standard, la quantité de fer intracellulaire est de 61 pg / macrophage [218], 7,1 pg / cellule souche [219] et 0,05 pg / lymphocyte [220]. Ceci aura des conséquences en terme de détectabilité IRM. Par exemple, en incorporant 61 pg de fer / macrophage, il est possible de détecter une cellule in vivo (résolution de $100 \times 100 \times 100 \mu\text{m}^3$ ou de $100 \times 100 \times 200 \mu\text{m}^3$; séquence de type FIESTA ou Fast Imaging Employing STeady-state Acquisition) avec un champ magnétique de 1,5 Teslas alors qu'en incorporant 0,05 pg de fer / lymphocyte, une cellule individualisée devra être visualisée avec une résolution 2 fois plus importante (résolution in vitro de $50 \times 50 \times 100 \mu\text{m}^3$; séquence de type écho de gradient) en utilisant un champ magnétique beaucoup plus élevé (7 Teslas). Il apparaît donc à la vue de ces données qu'il est beaucoup plus facile de marquer des cellules phagocytaires pour les suivre in vivo que de marquer des lymphocytes. C'est pourquoi des modifications simples (utilisation d'agents de transfection sur des particules commerciales, modification de la nature du recouvrement) ou plus complexes (greffage d'anticorps monoclonaux, de peptides Tat HIV-1) sont apparues afin d'augmenter l'efficacité de marquage des cellules non phagocytaires.

L'utilisation des particules anioniques permet déjà d'améliorer l'incorporation des particules dans ces cellules. La quantité de fer intracellulaire passe à 1,7 pg / lymphocyte T humain [221] et à 1,6 pg / lymphocyte T CD3+ de souris [34] avec un temps d'incubation relativement court (1-4 h). Avec le même type de particules, DE. Hu et P. Smirnov ont montré des quantités de fer comparables (1,4 pg / splénocyte) [222, 223]. Avec des particules de ferumoxides couplées à la Poly-L-Lysine (PLL), la quantité de fer intracellulaire est proche de celle trouvée avec les particules anioniques mais sur un temps

d'incubation plus long (18h ; 1,53 pg / lymphocyte) [215]. En utilisant des particules de ferumoxides couplées à un autre agent de transfection, le Superfect™, la quantité de fer intracellulaire ne change pas (1,53 pg / lymphocyte) [192]. Par contre, en augmentant la durée de l'incubation jusqu'à 24h, il est possible d'incorporer avec les particules de ferumoxides / PLL une quantité de fer 7 fois plus importante (10,2 pg / lymphocyte) [215]. Afin d'accroître à nouveau la capacité d'internalisation des particules, des agents d'origine virale tels que les peptides Tat HIV-1 ont été utilisés. Ils permettent de faire entrer massivement les particules à l'intérieur des cellules. De nombreux travaux ont montré des quantités de fer importantes mais très variables par lymphocyte marqué, comprises généralement entre 1 et 5 pg de fer / lymphocyte [224, 199, 39] mais pouvant aller jusqu'à 20 pg de fer / cellule [199].

6. limites de détection en IRM cellulaire

Les limites de détection dépendent de la résolution en IRM, déterminée par la puissance du champ magnétique extérieur appliqué et par le type de séquence utilisée. Elles dépendent également de la concentration en fer intracellulaire.

A champ magnétique élevé, il a été montré que des lymphocytes T individualisés pouvaient être détectés in vitro. Cette détection en IRM a été corrélée avec une détection des cellules par fluorescence [220]. Mais l'IRM permet d'aller encore plus loin dans la résolution des images. En effet, il est possible de distinguer en IRM des zones intracellulaires. Par exemple, à un champ de 11,7 Teslas, des cellules marquées par des particules MD-100 (magnétodendrimères) ont été non seulement détectées individuellement mais une distinction très nette entre le noyau et le cytoplasme de ces cellules a été montrée [225]. A un champ magnétique plus faible comme ceux utilisés habituellement en clinique (1,5 Teslas), la détection de macrophages magnétiquement

marqués peut se faire puisque ce type cellulaire, de part ses capacités de phagocytose, incorpore des quantités de fer plus importantes [226].

Des calculs pour déterminer la plus petite quantité de fer intracellulaire nécessaire à la détection en IRM de cellules individualisées ont été effectués. En utilisant une séquence d'impulsion FIESTA permettant d'obtenir sur des temps d'acquisition très courts des images de haute résolution ($100 \times 100 \times 200 \mu\text{m}^3$), il faut une quantité de fer comprise entre 1,4 et 3 pg / cellule pour détecter des cellules individualisées [227]. Cette quantité de fer minimale permettant la détection d'une cellule en IRM est largement atteinte même en marquant des cellules non phagocytaires. En effet, l'utilisation d'agents de transfection ou du peptide Tat-HIV1 permet d'augmenter considérablement l'efficacité de marquage de ces cellules (Cf. 5.).

D'autres limites à la détection des cellules en IRM sont liées au devenir du marquage. Plusieurs cycles de division cellulaire entraînent une dilution du marquage. A priori, les cellules peuvent toujours être détectées jusqu'à au moins 4 cycles de division si la quantité de fer intracellulaire initiale est de 25 pg. Un autre mécanisme de décroissance du marquage est la dégradation des agents de contraste par les cellules (Cf. 4) ou la sortie de ces agents de l'espace intracellulaire puis la prise en charge par d'autres effecteurs (perte du marquage). Il a été montré qu'au delà de 6 semaines, les cellules pouvaient difficilement être détectées de manière fiable [101].

7. conclusion

Les techniques d'imagerie cellulaire présentent toutes des avantages et des inconvénients. L'imagerie par bioluminescence a une bonne résolution mais un pouvoir de pénétration limité, l'imagerie nucléaire a une bonne sensibilité mais manque de résolution et nécessite l'utilisation de produits ionisants. Enfin, l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) a une bonne résolution mais la sensibilité lui fait défaut.

Parmi ces techniques, nous nous sommes intéressés à l'IRM. Cette technique d'imagerie permet d'apporter, en plus des informations anatomiques, des renseignements par rapport au métabolisme, par rapport à la fonction de certaines structures de l'organisme (imagerie fonctionnelle)... Dans cette revue bibliographique, nous avons montré que l'IRM pouvait également être utilisée au service des cellules, dans un cadre de thérapie cellulaire afin de suivre la migration puis l'implantation des cellules marquées au sein du tissu malade ou pour comprendre les mécanismes liés aux pathologies (mécanismes de l'inflammation, de la réaction anti-tumorale).

TRAVAUX EXPERIMENTAUX

Pour mettre en place un système innovant de diagnostic précoce des tumeurs, nous avons marqué par des nanoparticules d'oxydes de fer des lymphocytes périphériques murins, ceci dans le but de suivre en IRM l'infiltration tumorale. Dans ce contexte, les lymphocytes T ont été choisis comme vecteurs cellulaires pour cibler les tumeurs car ils sont impliqués dans les mécanismes anti-tumoraux et sont capables de reconnaître spécifiquement les éléments étrangers à l'organisme comme les cellules tumorales. Parmi les effecteurs de la réponse immunitaire, les lymphocytes T sont des cellules hautement spécialisées, adaptées à une reconnaissance spécifique de leur cible.

Nous nous sommes particulièrement intéressés au marquage des lymphocytes périphériques. L'avantage à travailler avec des lymphocytes périphériques (cellules isolées à partir du sang) réside dans le fait que la technique de prélèvement de ces cellules est non invasive, contrairement au prélèvement de lymphocytes à partir de la rate ou de ganglions lymphatiques, qui nécessite le sacrifice de l'animal. Après avoir prélevé quelques millilitres de sang, nous avons isolé les lymphocytes périphériques murins et nous les avons marqués avec les nanoparticules d'oxydes de fer superparamagnétiques synthétisées au laboratoire depuis plusieurs années. Nous avons privilégié l'utilisation d'agents de contraste superparamagnétiques car la sensibilité RM avec ces agents de contraste est meilleure qu'avec les agents paramagnétiques utilisés en imagerie T1.

Nous allons maintenant décrire les Matériels et Méthodes utilisés lors de l'expérimentation puis nous présenterons les résultats de notre étude.

A. Matériels et Méthodes

Nous décrivons dans ce chapitre l'ensemble des matériels et méthodes utilisés lors de l'expérimentation, concernant :

- la synthèse et la caractérisation des nanoparticules d'oxydes de fer
- le prélèvement et le marquage des lymphocytes périphériques murins
- l'évaluation du marquage lymphocytaire
- la mise en place du modèle tumoral C6
- le suivi in vivo du recrutement lymphocytaire en IRM

I/ Synthèse et caractérisation physico-chimique des nanoparticules

1. Synthèse des nanoparticules d'oxydes de fer superparamagnétiques

1.1. Formulation du cristal d'oxydes de fer

Comme décrit par Babès [228], la méthode employée pour le développement des cristaux d'oxydes de fer est dérivée de la procédure décrite par Massart [229]. A partir de cette méthode, des solutions colloïdales d'oxydes de fer ont été formulées par co-précipitation de sels ferriques et ferreux en milieu basique (solution aqueuse d'hydroxyde de tétraméthylammonium ou TMAOH).

200 μL d'une solution aqueuse de chlorure ferreux (31 μmol) et ferrique (67 μmol) sont injectés à un débit constant de 0,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ dans 2 mL de solution basique de TMAOH 1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($\text{pH} = 13$), sous agitation magnétique et à température ambiante. Les cristaux d'oxydes de fer ainsi formés vont être recouverts de composés de nature bisphosphonique ou polymérique permettant de stabiliser la solution colloïdale.

1.2. Recouvrement du cristal d'oxydes de fer

1.2.1. Recouvrement par des composés de nature bisphosphonique

La solution colloïdale obtenue, de couleur noire, est recouverte de bisphosphonates. Les trois types de recouvrement utilisés dans le cadre de ce travail ont été l'acide 1-hydroxy-ethylidene bisphosphonique (HEDP, Fluka), le 6-hydroxy-6,6-bisphosphonohexyl-1-triméthyl ammonium (NTMBP, Surfactis technologies, France) et le bisphosphonate appelé DPS1 dont nous ne préciserons pas la nomenclature pour des raisons de confidentialité (DPS1, Surfactis technologies, France). 48 μmoles de bisphosphonates (solutions à 0,1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) sont ajoutées à la suspension colloïdale (2,2 mL), sous agitation magnétique et à température ambiante. La fixation du bisphosphonate

sur le noyau d'oxydes de fer se fait à $\text{pH} = 6,5$ par ajout de $1800 \mu\text{moles}$ d'acide 2-[(2-hydroxy-1,1-bis(hydroxyméthyl)éthyl)amino]-éthane sulfonique (3 mol.L^{-1} , TES, Sigma) préparée dans l'acide chlorhydrique (3 mol.L^{-1} , HCl, VWR).

Enfin, la solution est purifiée par passage sur une colonne de biogel (Biogel P6, gel medium, Biorad). L'éluat ainsi recueilli est filtré (Filtres $0,2 \mu\text{m}$ minisart high flow, Sartorius) et peut être conservé à 4°C .

1.2.2. Recouvrement par un composé de nature polymérique

La solution colloïdale est recouverte d'un composé de nature polymérique, le D10000, dextran de poids moléculaire égal à 10000 g.mol^{-1} (Dextran T10, Amersham Pharmacia Biotech AB). 44 mg de dextran sont ajoutés directement dans la suspension colloïdale d'oxyde de fer ($2,2 \text{ mL}$), sous agitation magnétique et à température ambiante. La fixation du dextran sur le noyau d'oxydes de fer se fait en chauffant à 65°C pendant 30 minutes.

Enfin, la solution est dialysée contre de l'eau PPI (Cooper) pendant 6 heures jusqu'à l'obtention d'une solution à $\text{pH} = 7$. La solution ainsi recueillie est filtrée (Filtres $0,2 \mu\text{m}$ minisart high flow, Sartorius) et peut être conservée à 4°C .

2. Caractérisation physico-chimique des nanoparticules

2.1. Détermination du diamètre du noyau d'oxydes de fer

La taille du cristal a été déterminée par microscopie électronique à transmission (microscope Jeol 2011 (Jeol, Croissy sur Seine, France)).

2.2. Détermination du diamètre hydrodynamique des nanoparticules

Les mesures de diamètre hydrodynamique des particules sont réalisées à l'aide d'un Autosizer 4700 (Malvern Instruments, Orsay, France) et sont basées sur une technique de spectroscopie de corrélation de photons. Le principe de la mesure repose sur le passage dans la solution d'un faisceau laser ($\lambda = 488 \text{ nm}$). La lumière va diffuser dans la solution (diffusion isotrope pour des particules dont la taille est inférieure à 50 nm) puis l'intensité de la lumière diffusée est analysée par différents modèles mathématiques. En mode « auto-corrélation », le signal recueilli dépend du coefficient de diffusion de la particule et la relation de Stokes-Einstein ramène à une estimation du diamètre hydrodynamique de la particule :

$$D = kT / 3\pi\eta d \quad \text{avec } D, \text{ le coefficient de diffusion (m}^2\cdot\text{s}^{-1}\text{)}$$

k , la constante de Boltzmann ($1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$)

η , le coefficient de viscosité (Pa.s)

d , le diamètre hydrodynamique de la particule (m)

2.3. Détermination de la concentration en fer des nanoparticules

Afin d'incuber les cellules avec une dose de fer choisie et de façon à déterminer les propriétés magnétiques des particules, il est important de connaître la concentration en fer totale (Fe (II) et Fe (III)) de celles-ci.

La suspension colloïdale de nanoparticules est digérée durant deux heures par une solution d'acide chlorhydrique à 30% (V/V) (HCl, VWR). Les concentrations sont déterminées par mesures spectrophotométriques à 340 nm (Uvikon 940, Kontron, France), mesures converties à partir de courbes d'étalonnage réalisées à partir de solutions ayant des concentrations connues en fer.

2.4. Détermination des propriétés relaxométriques des nanoparticules

Les relaxivités r_1 et r_2 des nanoparticules d'oxydes de fer sont calculées à partir des mesures de temps de relaxation longitudinaux T_1 et transversaux T_2 réalisées à 4°C à l'aide d'un relaxomètre opérant à 20 MHz (Minispec Bruker NMR 120, Wissembourg, France).

2.4.1. Mesure du T_1

Le temps de relaxation longitudinal T_1 aussi appelé « temps de relaxation spin-réseau » correspond au retour à l'état fondamental de l'aimantation longitudinale des protons de l'eau. Il est mesuré à l'aide d'une séquence d'inversion-récupération dont les paramètres sont les suivants :

Nombre d'excitations (NEX) = 2

Nombre de points = 20

Temps d'inversion au premier point (TI_1) = 0,05 – 10 ms (en fonction de la concentration en fer dans l'échantillon)

Temps d'inversion au $n^{\text{ième}}$ point (TI_n) = $TI_{n-1} + 1,5 \times TI_{n-1}$

2.4.2. Mesure du T2

Le temps de relaxation transversal T_2 aussi appelé « temps de relaxation spin-spin » correspond au retour à l'état fondamental de l'aimantation transversale. Il est déterminé par une séquence de type CPMG. Les paramètres sont :

Nombre d'excitations (NEX) = 2

Temps de Répétition (TR) = 10s

Nombre de points = 220

Temps d'Echo du 1^{er} écho (TE_1) = 0,05 - 5 ms (en fonction de la concentration en fer dans l'échantillon)

Le temps inter-écho (IE) est constant

Temps d'Echo du n^{ième} écho (TE_n) = $n \times TE_1$

2.4.3. Calcul des relaxivités

Les relaxivités r_1 et r_2 exprimées en $L.mmol^{-1}.s^{-1}$ sont déterminées par les pentes des droites correspondant aux régressions linéaires de $1/T_1$ et $1/T_2$ en fonction des concentrations en fer des différentes dilutions étudiées. La pente de la droite $1/T_1 = f([Fe])$ donne la valeur r_1 et la pente de la droite $1/T_2 = f([Fe])$ la valeur r_2 .

II/ Expérimentations animales et culture cellulaire

1. Lignées BLCL

Les BLCL (B Lymphoblastoid Cell Line) sont des lymphocytes B infectés et transformés par le virus EBV (Epstein Barr Virus), lignées développées à l'INSERM U601 (Nantes). Il s'agit donc de lignées lymphoblastiques B capables de proliférer dans un milieu de culture de base comme le RPMI 1640 / L-Glutamine (Biowhittaker) complété avec du SVF 10% (Biowhittaker) et des antibiotiques 1% (Amphotéricine B, Pénicilline, Streptomycine, Sigma). Les cellules non adhérentes sont incubées à 37°C / 5% CO₂ à la concentration de 0,3 à 1 million de cellules / mL de milieu de culture et repiquées par simple dilution deux fois par semaine.

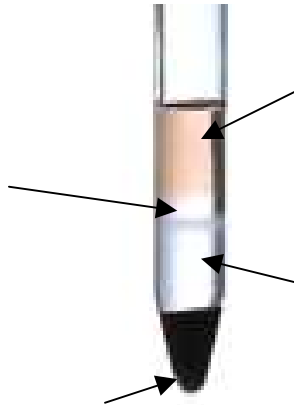
2. Modèle animal C6

Les animaux utilisés sont des rats Sprague Dawley femelles (200-250 g) chez qui des injections de cellules C6 (2 à 3 millions de cellules) ont été réalisées en sous-cutané au niveau de la patte droite. Les cellules C6 sont une lignée de gliome de rat à prolifération rapide (temps de doublement de 48h). Bien que nous ayons à faire à un gliome, un développement tumoral est observé après injection sous-cutanée.

Le gliome C6 est une lignée commerciale cultivée dans du milieu de culture DMEM complété en Glucose (4,5 g.L⁻¹), L-Glutamine 0,6 g.L⁻¹ (Biowhittaker), SVF 10% (Biowhittaker) et en antibiotiques 1% (Amphotéricine B, Pénicilline, Streptomycine, Sigma). Les cellules sont incubées à 37°C / 5% CO₂ à la concentration de 2 à 3 millions de cellules / mL de milieu de culture et, de par leur adhérence, sont trypsinisées (Trypsine 1X / EDTA) tous les 3 jours pour un repiquage.

3. Prélèvement des lymphocytes périphériques murins

Les lymphocytes circulants prélevés chez des rats porteurs ou non de tumeurs sont isolés à partir de sang prélevé en intra-cardiaque chez le rat. Le sang est ensuite déposé sur un gradient de Ficoll (Ficoll-Paque Plus[®], Amersham Biosciences, USA) afin de séparer les globules blancs mononucléés, c'est-à-dire principalement les lymphocytes (**Cf. résultats**), des granulocytes et érythrocytes. Après centrifugation, un anneau lymphocytaire est obtenu. Il se trouve confiné entre la phase plasmatique et la phase de Ficoll-Paque Plus (**figure**).



L'anneau de lymphocytes est prélevé, lavé puis les cellules sont mises à incuber pendant une heure à 37°C / 5% CO₂ dans du milieu de culture RPMI 1640 / L-Glutamine complet (RPMI complété avec du SVF 10%, des acides aminés non essentiels 1%, du pyruvate de sodium 1 mmol.L⁻¹, du β-mercapto-éthanol 50 μmol.L⁻¹ et des antibiotiques

1%). En effet, les monocytes, contrairement aux lymphocytes, sont des cellules capables d'adhérer. Cette incubation correspond donc à une étape de déplétion monocyttaire et également à une étape de déplétion plaquettaire.

Cependant, cette étape de déplétion ne permet pas d'éliminer les plaquettes dans leur totalité. Un déplaquettage est donc réalisé par centrifugation sans décélération brutale (120g, pendant 10 minutes, à 18°C). De cette manière, les plaquettes restent au niveau du surnageant alors que les lymphocytes sont retrouvés dans le culot.

4. Phénotype des cellules isolées

Le phénotype des cellules mononucléées isolées à partir de sang de rat par Ficoll est réalisé par immunocytologie. Brièvement 100 000 cellules sont mises en suspension dans 50 µL de PBS 1X / SVF 5% / Azide 0,02% (plaque 96 puits) et incubées 1 heure à 4°C en présence de 50 µL d'anticorps primaires (BD PharMingen). Ces anticorps primaires sont préalablement dilués dans du PBS 1X / SVF 5% / Azide 0,02% afin d'obtenir une solution à 10 µg d'Anticorps / mL :

- Ig G1 (500 µg.mL⁻¹), Ig G2a (250 µg.mL⁻¹) et Ig G3 (250 µg.mL⁻¹) pour les contrôles isotypiques
- CD3 et αβTCR (500 µg.mL⁻¹) pour les lymphocytes T totaux
- CD4 (500 µg.mL⁻¹) pour les lymphocytes CD4+
- CD8 (500 µg.mL⁻¹) pour les lymphocytes CD8+
- CD11b/c (500 µg.mL⁻¹) pour les monocytes
- CD45 RA (500 µg.mL⁻¹) pour les lymphocytes B
- NKR-P1A (500 µg.mL⁻¹) pour les Natural Killers

Après lavage des cellules par du PBS 1X / SVF 5% / Azide 0,02%, 50 μL d'anticorps secondaire (fragment Fab'₂ chèvre anti-souris couplé à la FITC) sont ajoutés dans chaque puit pour 30 minutes à 4°C. L'anticorps secondaire (500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, Dakocytomation, Danemark) a été préalablement dilué au 1/50^{ème} dans du PBS 1X / SVF 5% / Azide 0,02%. Après lavages, les cellules sont resuspendues dans du PBS 1X / Azide 0,02% / Formaldéhyde 2% pour une analyse en cytométrie de flux.

5. Marquage magnétique des BLCL et des lymphocytes périphériques murins

5.1. Marquage des BLCL et des lymphocytes périphériques murins non activés

Les cellules sont incubées à la concentration de 500 000 cellules / mL de RPMI 1640 / L-Glutamine pendant 18h à 37°C / 5% CO₂ en présence de particules HEDP, NTMBP, DPS1, D10000 à des concentrations en fer variant de 25 à 150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Après cette incubation, les cellules sont lavées 4 fois avec du milieu de culture afin d'éliminer l'excès de fer.

5.2. Activation non spécifique et marquage des lymphocytes périphériques murins

Après les étapes de déplétion monocytaire et plaquettaire, les lymphocytes périphériques murins sont amplifiés à l'aide d'un protocole en deux phases utilisant la Concanavaleine A (VWR) :

- 1^{ère} phase d'activation : 2 millions de cellules / mL de milieu de culture sont mises à incuber pendant 24h dans du RPMI 1640 / L-Glutamine complet contenant du SVF 10%, des acides aminés non essentiels 1%, du pyruvate de sodium 1 mmol.L^{-1} , du β -mercapto-éthanol 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ et des antibiotiques 1% avec 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de Concanavaleine A (VWR) et 4 ng.mL^{-1} d'Il-2 (R&D Systems).

- 2^{ème} phase d'activation : après lavage, les cellules sont mises à incuber pendant 60h à la concentration d'1 million de cellules / mL de RPMI 1640 / L-Glutamine complet. La quantité d'Il-2 est conservée à 4 ng.mL⁻¹ alors que la quantité de Concanavaline A est augmentée à 3 µg.mL⁻¹.

Après cette deuxième activation, les cellules sont lavées et remises en culture dans du RPMI 1640 / L-Glutamine complet à raison d'1 million de cellules / mL. Le marquage magnétique est réalisé par ajout des nanoparticules NTMBP (50 µg de fer / mL) pour une période de 18h. A la fin de cette incubation, les cellules sont lavées à 4 reprises pour éliminer l'excès de nanoparticules.

5.3. Evaluation de la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire est évaluée par numération sur cellule de Malassez après coloration au bleu Trypan. Les cellules comptées sont celles apparaissant réfringentes par exclusion du colorant.

5.4. Evaluation de la charge cellulaire

La quantité de fer moyenne par cellule a été évaluée par ICP-OES (Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy). 0,1 à 2 millions de cellules sont digérées pendant 2 heures dans 200 µL d'acide nitrique à 65% (Vol/Vol). La concentration totale en fer (en mg.L⁻¹) dans l'échantillon est mesurée à la longueur d'onde de 259,9 nm par l'appareil d'ICP-OES Jobin-Yvon 238 (Ultrace Instruments SA, Longjumeau, France). A partir de la concentration en fer mesurée, la quantité moyenne de fer par cellule est déduite. Il faut noter que cette quantité moyenne de fer est calculée pour une cellule, qu'elle soit marquée ou non. Il faut donc corriger la valeur trouvée par le pourcentage de cellules marquées.

5.5. Evaluation du pourcentage de cellules marquées

5.5.1. Evaluation par coloration au bleu de Prusse

Le bleu de Prusse (Perls) permet de marquer le fer présent au niveau des cellules. Après avoir éliminé l'excès de fer, les cellules sont fixées dans du PFA 4% / PBS 1X, à 4°C, pendant 15 minutes puis lavées 2 fois dans du PBS 1X. Le culot cellulaire est suspendu dans du ferrocyanide de potassium 1% / acide chlorhydrique 3% pendant 15 minutes à 60°C. Après 2 lavages dans du PBS 1X, les cellules sont observées au microscope optique (Axioskop 2 microscope, Zeiss, Oberkochen, Allemagne) relié à un analyseur d'images permettant d'obtenir des clichés en couleur à partir desquels le pourcentage de cellules contenant du fer est calculé.

5.5.2. Evaluation par micro-IRM

A la fin de la période d'incubation avec les nanoparticules et une série de 4 lavages, les cellules sont mises en suspension dans un gel d'agarose à bas point de fusion dont la concentration est de 0,5% en masse. La suspension est transférée dans un capillaire de 3 mm pour analyse. Pour chaque condition de marquage, 3 dilutions cellulaires ont été réalisées : 5, 10 et 20 cellules / μL .

L'analyse IRM est réalisée à l'aide d'un imageur Bruker Avance DRX 300 (Bruker Biospin SA, Wissembourg, France) équipé d'un aimant supraconducteur vertical de 150 mm fonctionnant à un champ magnétique de 7,05 Teslas et d'une antenne type selle de cheval d'un diamètre de 10 mm. Les gradients écrantés ont une puissance maximale de 2000 mT / m. La séquence d'impulsions utilisée est une séquence d'écho de gradient 3D standard "spoiled" qui a été modifiée en séquence multi-écho pour permettre l'obtention de cartographies quantitatives T_2^* .

Les paramètres de cette séquence sont les suivants :

Nombre d'excitations (N_{ex}) = 1

Temps de Répétition (TR) = 200 ms

Nombre d'écho = 8

Temps d'Echo du 1^{er} écho (TE_1) = 5 ms

Temps inter-écho (IE) = 5 ms

Angle de basculement (α) = 30°

Taille de la matrice = 128*128*128

Champs de vision = 9*9*9mm (résolution isotrope de 70 μ m)

Bande passante = 50 kHz

Durée d'acquisition = 1 heure

Les cartographies 3D sont seuillées puis calculées à l'aide du logiciel Paravision (version 2.1.1 ; Bruker Biospin SA, Wissembourg, France). Pour faire ressortir les pixels des signaux hypo-intenses (effondrement du T_2^* apporté par les agents de contraste) correspondant aux cellules marquées et ainsi gommer au mieux les artéfacts liés aux zones de gel, une valeur de seuil (T_2^{*th}) a été déterminée. Elle est de 80 ms. Les pixels ayant un T_2^* supérieur à la valeur de seuil ont été attribués d'une nouvelle valeur de T_2^* égale à 0 alors que les pixels avec un T_2^* inférieur au T_2^{*th} ont été attribués d'une valeur égale à 80 moins la valeur initiale de T_2^* . Ceci a pour conséquence d'inverser le contraste et de visualiser les données 3D avec une projection d'intensité maximale.

Afin d'analyser quantitativement les cartographies, le logiciel ImageJ (National Institutes of Health, <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>) a été utilisé (fonction « analyse particles »). Le nombre et la taille moyenne des perturbations ont été évalués sur une région d'intérêt de 25 \times 75 \times 25 pixels (volume exploré de 16,29 μ L). Les perturbations

situées en bord et celles formant des agglomérats n'ont pas été prises en compte. A partir du nombre de perturbations calculé et du nombre théorique de cellules présentes dans le volume, le ratio nous a donné un pourcentage de cellules marquées.

5.6. Localisation cellulaire des particules d'oxydes de fer

La localisation des nanoparticules d'oxydes de fer au niveau cellulaire est déterminée par Microscopie Electronique à Transmission (MET). Les cellules, une fois lavées, sont culottées et fixées dans une solution de glutaraldéhyde 2% / PBS 1X pendant 30 minutes. L'échantillon est lavé dans du PBS 1X, post-fixé dans une solution de tétraoxyde d'osmium 2% / PBS 1X pendant une heure puis à nouveau lavé dans du PBS 1X. L'échantillon est alors déshydraté dans des bains successifs d'éthanol (bains de degrés croissants en alcool). Après une exposition dans l'oxyde de propylène, l'échantillon est inclus dans une résine Epon qui va polymériser à 60°C pendant 48 à 72h. Des coupes fines de 70 nm (Ultracut-S ultramicrotome, Leica Microsystems SAS, Rueil-Malmaison, France) sont observées au microscope électronique à transmission Jeol 2011 (Jeol, Croissy sur Seine, France) à 140 kV.

6. Expression des résultats et tests statistiques

Les résultats sont exprimés de la manière suivante : moyenne \pm s.e.m (erreur standard de la moyenne) et un test statistique d'analyse de variance (test ANOVA à 1 ou 2 facteurs) a été utilisé pour connaître la significativité des résultats obtenus ($p < 0,05$).

III/ Suivi in vivo du recrutement lymphocytaire en IRM

1. Injection autologue des lymphocytes marqués

Les lymphocytes périphériques sont prélevés 3 jours après inoculation en sous cutané de 3 millions de cellules C6. Après activation non spécifique et marquage magnétique par les nanoparticules d'oxydes de fer NTMBP, 8 à 10 millions de cellules sont injectées par la veine de la queue chez le rat Sprague Dawley femelle donneur. Le protocole d'amplification nécessitant 4 jours, la réinjection des cellules marquées a lieu 7 jours post-inoculation des cellules tumorales. L'animal est ensuite passé en IRM et l'infiltration lymphocytaire de la tumeur suivie sur 3 jours.

2. Suivi IRM

L'Imagerie par Résonance Magnétique est réalisée au Service Commun d'Analyses Spectroscopiques (SCAS) de l'Université d'Angers avec un imageur Bruker Avance DRX 300 (Bruker Biospin SA, Wissembourg, France) à aimant supraconducteur vertical, fonctionnant à un champ magnétique de 7,05 Teslas. Les gradients écrantés sont d'une puissance maximale de 144 mT / m. L'antenne utilisée est une antenne de surface. L'acquisition et le traitement des images se font sur une station de travail Silicon Graphic O2 avec le logiciel d'imagerie Paravision (version 2.1.1 ; Bruker Biospin SA, Wissembourg, France).

Les animaux sont anesthésiés par un mélange isoflurane / oxygène (5 – 1,5% / 2 L.min⁻¹) et l'anesthésie est maintenue pendant toute la durée de l'examen IRM.

B. Résultats

Nous nous sommes intéressés à 4 types particuliers (HEDP, NTMBP, D10000 et DPS1) se distinguant par la nature des molécules utilisées comme agents de recouvrement. Ces 4 types particuliers ont été caractérisés (taille du noyau d'oxydes de fer, taille hydrodynamique, potentiel zéta, concentration en fer, relaxivités longitudinale et transversale) puis sélectionnés pour leur capacité de marquage des lymphocytes (compromis entre viabilité cellulaire et efficacité de marquage). Cette sélection a été réalisée sur une lignée lymphoblastique B (BLCL) à fort pouvoir prolifératif, ce qui nous a permis une évaluation rapide des différents agents de contraste.

Après cette étape de « screening », nous nous sommes intéressés au marquage des lymphocytes périphériques murins isolés chez le rat Sprague Dawley femelle sain ou porteur d'une tumeur C6 et, dans ce dernier cas, nous avons étudié l'influence d'une activation non spécifique (protocole Concanavalline A / Il-2) sur ce marquage. Nous avons donc évalué la viabilité des cellules, le pourcentage de cellules marquées, la charge cellulaire en nanoparticules, la localisation des nanoparticules au sein des cellules ainsi que l'effet de ces nanoparticules sur le signal RM. Pour cette évaluation, nous avons développé une nouvelle méthodologie IRM basée sur la quantification du marquage cellulaire à partir de cartographies 3D T2*, évaluation qui repose sur la détermination du pourcentage de cellules marquées et sur la détermination de la taille moyenne des hypersignaux générés. Cette méthodologie a fait l'objet d'une publication dans *NMR in Biomedicine* que nous présenterons dans le chapitre 5. Enfin, nous avons suivi en IRM l'infiltration des lymphocytes périphériques murins activés et marqués au niveau d'une tumeur C6 implantée en sous-cutané.

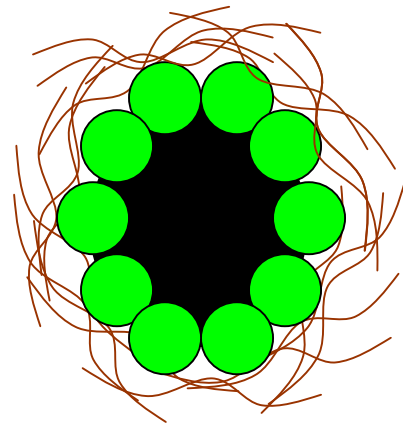
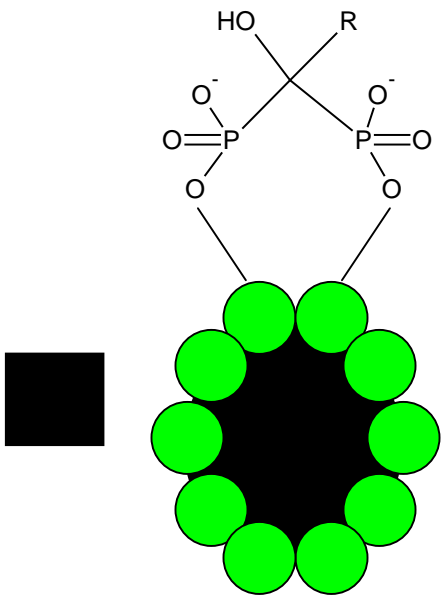
I/ Screening des nanoparticules d'oxydes de fer superparamagnétiques

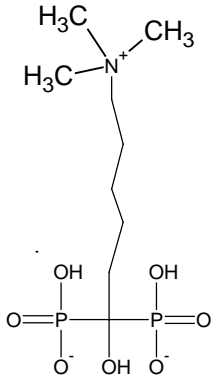
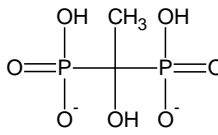
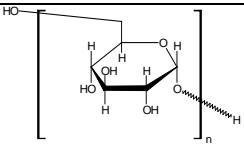
1. Caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules

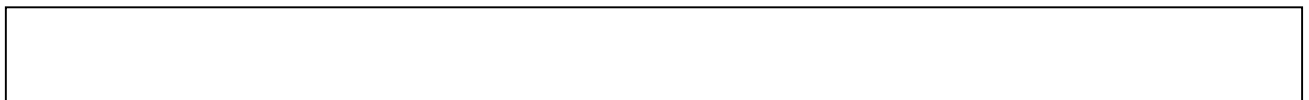
1.1. Nature des nanoparticules

Les nanoparticules que nous avons utilisées pour marquer les lymphocytes isolés chez le rat sont composées d'un cristal d'oxydes de fer stabilisé par adsorption de molécules de recouvrement à la surface. Les molécules de recouvrement testées sont de nature bisphosphonique (NTMBP, HEDP et DPS1 ; Cf. **tableau 1**) ou polymérique (D10000 ; Cf. **tableau 1**).

Pour les composés présentant une fonction bisphosphonate, la stabilisation de l'oxyde de fer se fait grâce aux interactions des deux groupements phosphonates avec le cristal (**figure 1A**). En fonction de la nature de la chaîne R greffée sur le carbone portant les deux groupements phosphonates (**tableau 1**), il est possible de modifier la charge globale des particules. Nous avons testé également un recouvrement de nature polymérique rendant ainsi les nanoparticules D10000 neutres (**tableau 1**). Pour le recouvrement polymérique, les chaînes de glucose viennent s'adsorber sur la structure cristalline (**figure 1B**).



Molécule de recouvrement	Nature du recouvrement	Charges (autres que celles portées par les 2 groupements phosphonates)	Nomenclature	Nom
	Bisphosphonate avec une chaîne alkyl portant une amine quaternaire	1 charge positive	6-hydroxy-6,6-bisphosphono-hexyl-1-triméthylammonium	NTMBP
	Bisphosphonate avec un groupement méthyl		1-hydroxyéthylidène bisphosphonate	HEDP
	Polymère	aucune	Dextran 10000 g/mol	D10000

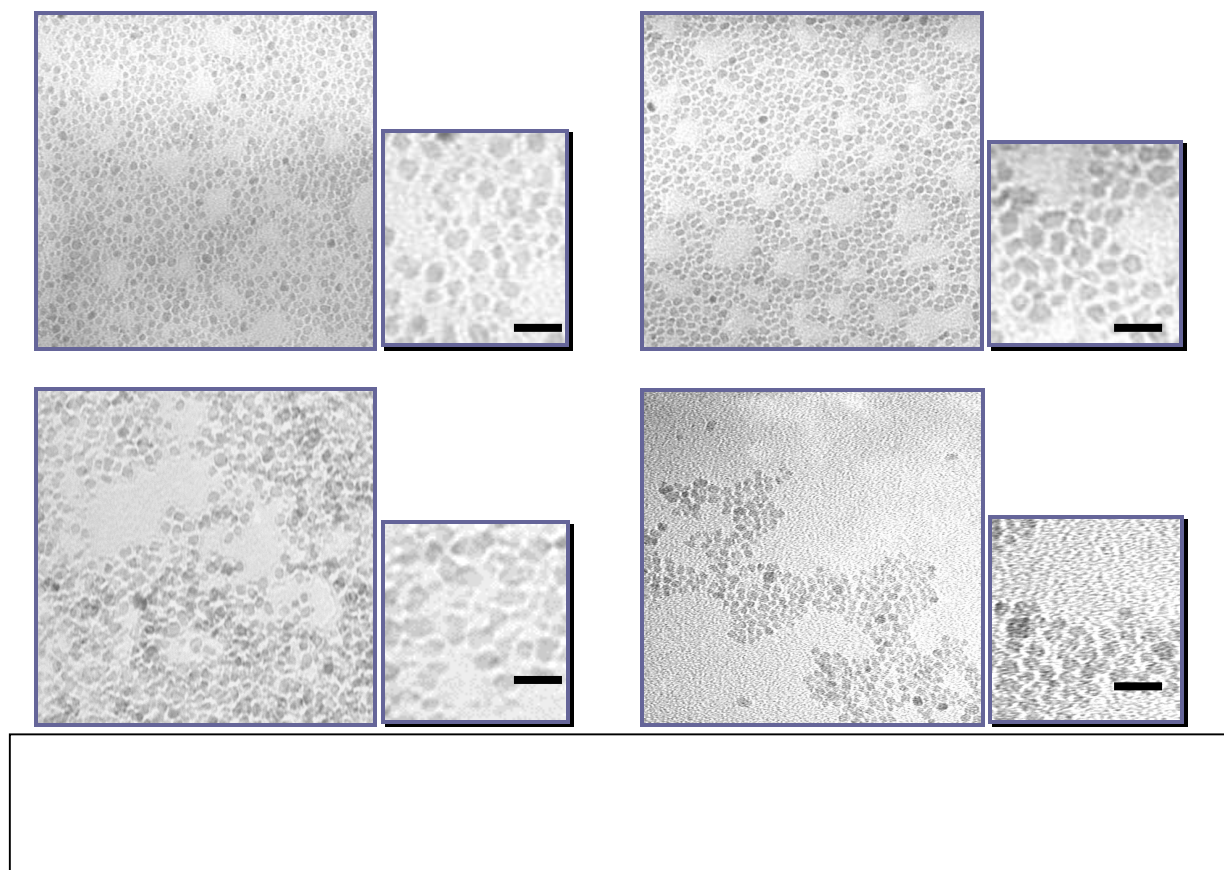


1.2. Caractéristiques physiques et physico-chimiques des nanoparticules

La caractérisation physico-chimique des nanoparticules consiste à mesurer leur taille (taille du cristal d'oxydes de fer, taille hydrodynamique des particules recouvertes), leur charge de surface (potentiel zéta), leurs propriétés magnétiques (relaxivités) et leur concentration en fer.

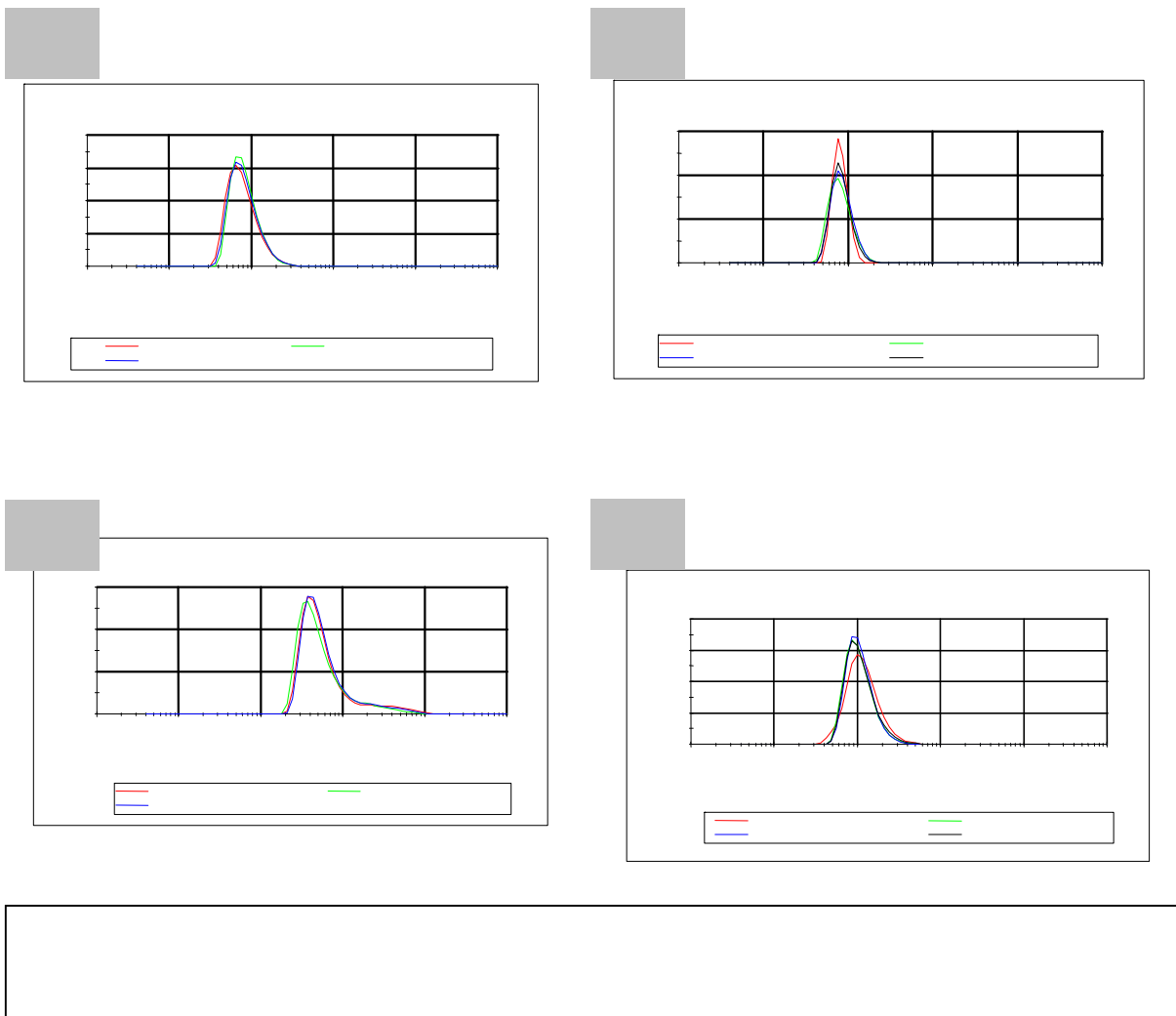
1.2.1. Taille des cristaux d'oxydes de fer

La taille des cristaux d'oxydes de fer mesurée d'après les clichés de Microscopie Electronique à Transmission (**figure 2**) est de $6,3 \pm 0,7$ nm ($n = 8$) pour les particules HEDP, de $6,9 \pm 0,8$ nm ($n = 8$) pour les particules NTMBP, de $7,1 \pm 0,7$ nm ($n = 8$) pour les particules D10000 et de $6,0 \pm 0,5$ nm ($n = 8$) pour les particules DPS1. La standardisation du protocole de synthèse avec l'ajout de la molécule de recouvrement quelques minutes après le début de la nucléation conduit à la formation de particules dont les cristaux sont homogènes en taille.



1.2.2. Taille hydrodynamique des nanoparticules

Les nanoparticules recouvertes d'HEDP et de NTMBP (**figures 3A et 3B**) ont des tailles hydrodynamiques proches, respectivement $8,5 \pm 0,1$ nm ($n = 3$) et $8,4 \pm 0,1$ nm ($n = 4$). Les nanoparticules D10000 (**figure 3C**) quant à elles ont une taille hydrodynamique plus importante ($39,1 \pm 0,8$ nm ; $n = 6$). Ceci peut s'expliquer par le fait que la synthèse des particules D10000 est différente de celle des particules bisphosphonatées : elle se fait à pH basique tout le long même lors de l'ajout dans la suspension colloïdale de la molécule de recouvrement ce qui favorise le phénomène de nucléation de l'oxyde de fer et confère donc au noyau de fer une taille plus importante. Concernant les particules DPS1 (**figure 3D**), la taille hydrodynamique est de $11,7 \pm 0,3$ nm ($n = 4$).



1.2.3. Potentiel zéta des nanoparticules

La charge de surface portée par les différentes particules est évaluée par mesure du potentiel zéta.

Les nanoparticules recouvertes d'HEDP (**figure 4A**) ont un potentiel de $-36,20 \pm 1,10$ mV ($n = 3$). Les particules NTMBP (**figure 4B**) ont un potentiel de $6,28 \pm 0,06$ mV ($n = 8$), les particules D10000 (**figure 4C**) un potentiel de $0,98 \pm 0,03$ mV ($n = 3$) et les particules DPS1 (**figure 4D**) un potentiel de $-29,18 \pm 1,59$ mV ($n = 4$).

Les particules HEDP présentent à leur surface deux charges négatives (Cf. **tableau 1**) d'où un potentiel zéta négatif ($-36,20$ mV), les particules D10000 qui possèdent un recouvrement de nature polymérique neutre ont un potentiel qui peut-être considéré comme nul ($0,98$ mV). Cependant, concernant les particules NTMBP qui devraient avoir une charge globale négative (Cf. formule du recouvrement, **tableau 1**), un potentiel légèrement positif est trouvé ($6,28$ mV).

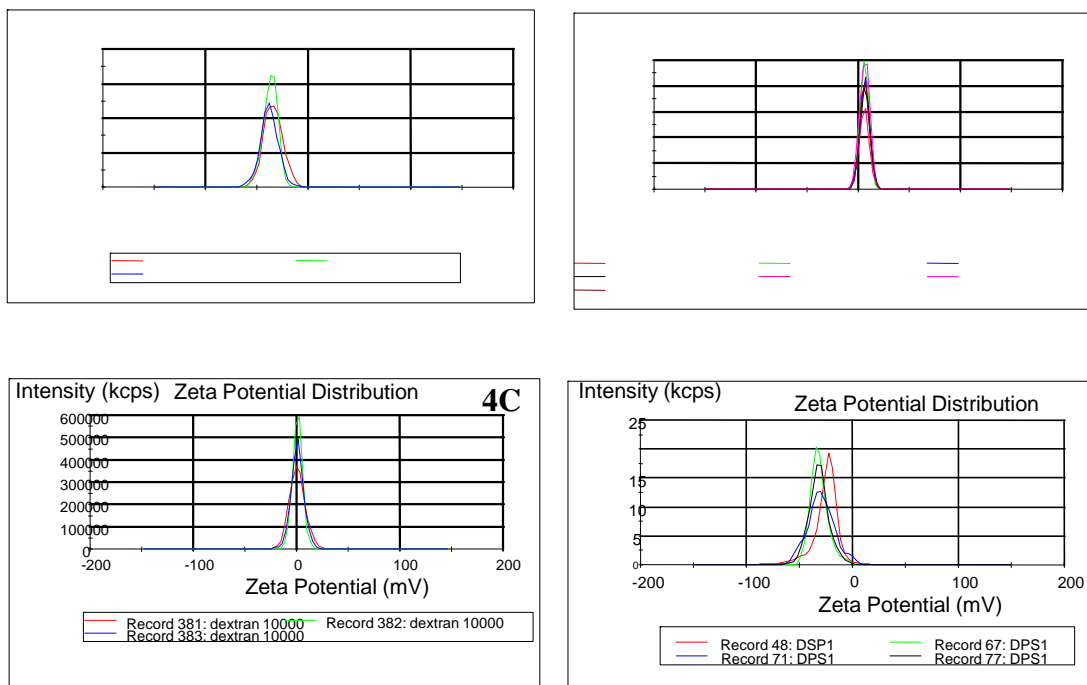


Figure 4 : mesure du potentiel zéta des particules HEDP (A), NTMBP (B), D10000 (C) et DPS1 (D).

1.2.4. Propriétés magnétiques des nanoparticules : relaxivités

Les relaxivités longitudinale (r_1) et transversale (r_2) des différentes nanoparticules sont mesurées à 4°C et à 0,4 Tesla. Pour les particules HEDP, $r_2 = 100,4 \pm 6,4 \text{ L.mmol}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ($n = 7$) et $r_1 = 30,8 \pm 1,3 \text{ L.mmol}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ($n = 7$). Pour les particules NTMBP, $r_2 = 84,3 \pm 6,5 \text{ L.mmol}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ($n = 7$) et $r_1 = 27,2 \pm 2,2 \text{ L.mmol}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ($n = 7$). Pour les particules D10000 $r_2 = 122,8 \pm 26,3 \text{ L.mmol}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ($n = 4$) et $r_1 = 25,7 \pm 8,8 \text{ L.mmol}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ($n = 5$). Pour les particules DPS1 $r_2 = 113,1 \pm 2,2 \text{ L.mmol}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ($n = 5$) et $r_1 = 37,1 \pm 2,4 \text{ L.mmol}^{-1}.\text{s}^{-1}$ ($n = 5$) (Cf. tableau 2).

1.2.5. Concentrations en fer des nanoparticules

La détermination de la concentration en fer permet de calculer les relaxivités r_1 et r_2 des particules et aussi le volume de particules à ajouter dans le milieu de culture pour arriver à la concentration finale en fer désirée. Les concentrations en fer des différentes nanoparticules sont similaires. Les particules HEDP ont une concentration en fer égale à $0,9 \pm 0,3 \text{ g.L}^{-1}$ ($n = 5$), les particules NTMBP une concentration en fer égale à $0,9 \pm 0,4 \text{ g.L}^{-1}$ ($n = 5$), les particules D10000 une concentration en fer égale à $1,2 \pm 0,4 \text{ g.L}^{-1}$ ($n = 5$) et les particules DPS1 une concentration en fer égale à $1,0 \pm 0,1$ ($n = 5$) (Cf. tableau 2).

	concentration en fer (g.L^{-1})	relaxivité longitudinale r_1 ($\text{L.mmol}^{-1}.\text{s}^{-1}$)	relaxivité transversale r_2 ($\text{L.mmol}^{-1}.\text{s}^{-1}$)	rapport r_2/r_1
HEDP	$0,9 \pm 0,3$ ($n = 5$)	$30,8 \pm 1,3$ ($n = 7$)	$100,4 \pm 6,4$ ($n = 7$)	$3,3 \pm 0,2$ ($n = 7$)
NTMBP	$0,9 \pm 0,4$ ($n = 5$)	$27,2 \pm 2,2$ ($n = 7$)	$84,3 \pm 6,5$ ($n = 7$)	$3,1 \pm 0,2$ ($n = 7$)
D10000	$1,2 \pm 0,4$ ($n = 5$)	$25,7 \pm 8,8$ ($n = 5$)	$122,8 \pm 26,3$ ($n = 4$)	$6,3 \pm 0,5$ ($n = 4$)
DPS1	$1,0 \pm 0,1$ ($n = 5$)	$37,1 \pm 2,4$ ($n = 5$)	$113,1 \pm 2,2$ ($n = 5$)	$3,1 \pm 0,3$ ($n = 5$)

Tableau 2 : concentrations en fer et propriétés relaxométriques des particules HEDP, NTMBP et D10000.

2. Test in vitro de la capacité de marquage de différentes particules

Les cellules appelées BLCL pour **B** Lymphoblastoïd Cell Line, infectées par le virus d'Epstein Barr, présentent l'intérêt de se cultiver très facilement et de proliférer rapidement (temps de doublement de 48h). Il s'agit donc d'un bon modèle cellulaire pour tester rapidement et facilement nos différents types de particules (HEDP, NTMBP, D10000 et DPS1). Chaque particule testée est évaluée en tenant compte de son influence sur la viabilité cellulaire, la quantité moyenne de fer incorporée et enfin sur le pourcentage de cellules marquées.

2.1. Evaluation de la viabilité des BLCL

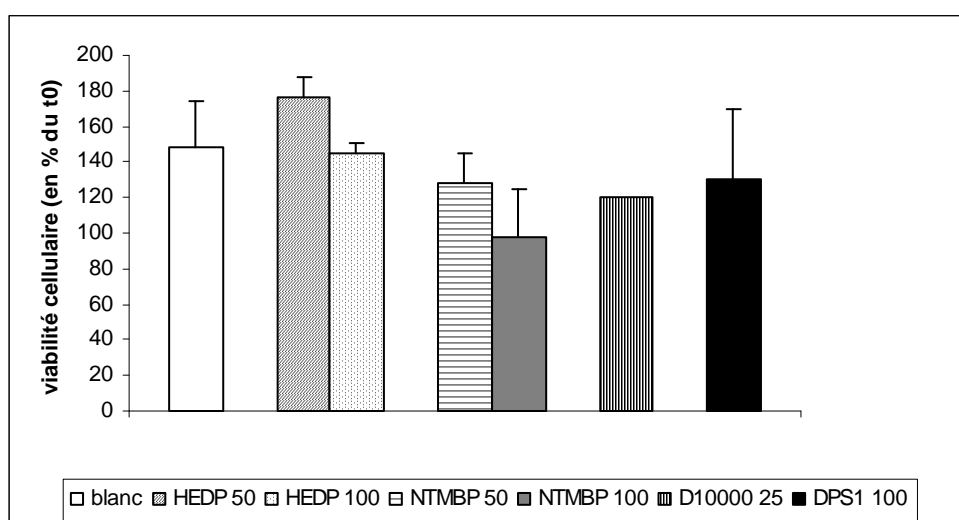


Figure 5 : effet des différents types de particules testés sur la viabilité des BLCL après une incubation de 18h.

Ce graphique représente la viabilité des BLCL après 18h d'incubation avec les différents types de nanoparticules utilisés. En absence de particule dans le milieu d'incubation, une prolifération cellulaire est observée (viabilité cellulaire de $148,3 \pm 25,7\%$; $n = 4$). L'ajout dans le milieu de culture de particules HEDP aux doses de 50 et 100 μg de fer / mL n'altère pas la fonction proliférative (viabilité cellulaire de $176,9 \pm 10,7\%$; $n = 4$; $p = 0,269$ vs blanc à la dose de 50 μg de fer / mL et de

144,5 ± 5,8% ; n = 4 ; p = 0,882 vs blanc à la dose de 100 µg de fer / mL). De même l'ajout de particules NTMBP maintient la fonction proliférative des cellules quelque soit la dose de fer utilisée (viabilité cellulaire de 128,3 ± 16,8% ; n = 3 ; p = 0,471 vs blanc à la dose de 50 µg de fer / mL et de 97,5 ± 27,5% ; n = 2 ; p = 0,119 vs blanc à la dose de 100 µg de fer / mL). Les particules D10000 et DPS1 quant à elles permettent de maintenir également une certaine prolifération des BLCL (viabilité cellulaire de 120% ; n = 1 et 130 ± 40% ; n = 2 ; p = 0,559 vs blanc, respectivement pour les particules D10000 et DPS1). Concernant les particules D10000, un seul point a été réalisé puisque ce type de particules précipite dans le milieu de culture, comme nous le verrons au paragraphe suivant. Il n'y a donc aucune différence significative des différents types de particules et de la dose de fer utilisée sur la viabilité. En conséquence, le « screening » ne se fera pas d'après ce critère.

2.2. Evaluation qualitative du marquage des BLCL

L'évaluation qualitative du marquage des BLCL est réalisée après avoir mis les cellules en contact avec le ferrocyanide de potassium en milieu acide (bleu de Prusse). Une coloration caractéristique bleue est alors obtenue lorsque des nanoparticules d'oxydes de fer sont présentes (**figure 6**).

Pour les particules D10000 additionnées au milieu de culture à la dose de 25 µg de fer / mL de milieu d'incubation et pour les particules NTMBP à la dose de 100 µg de fer / mL, nous observons de nombreux agrégats qui restent présents malgré de nombreux lavages. Cette agrégation élimine donc les nanoparticules D10000 utilisées à faible dose et les nanoparticules NTMBP utilisées à forte dose. A la dose de 50 µg de fer / mL de milieu d'incubation, l'agrégation des particules NTMBP est beaucoup plus discrète.

A partir de ces colorations, il est toutefois possible de définir un pourcentage de marquage en calculant le ratio nombre de cellules positives à la coloration / nombre de cellules total. Cette analyse est présentée à la **figure 7**.

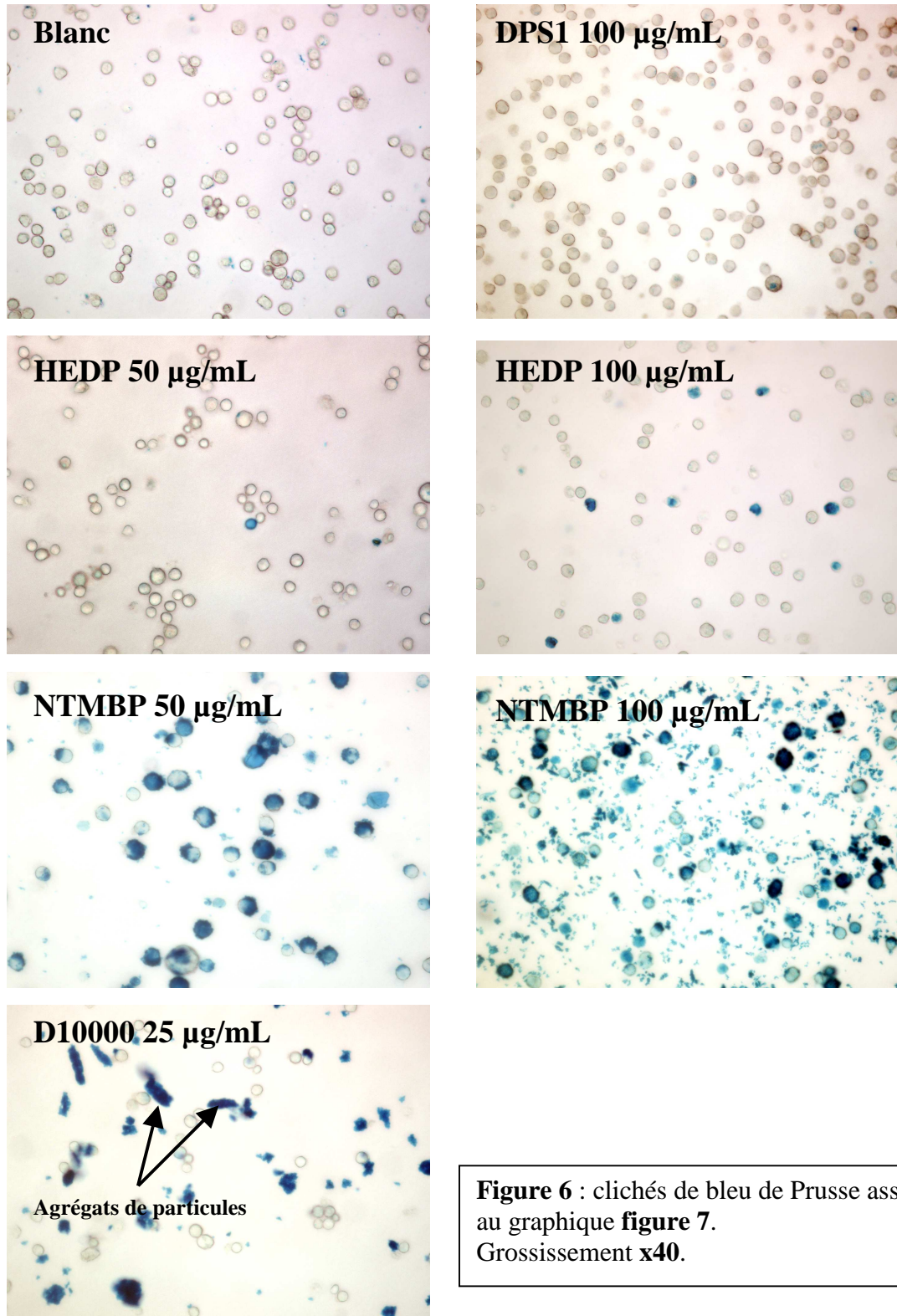


Figure 6 : clichés de bleu de Prusse associés au graphique **figure 7**.
Grossissement x40.

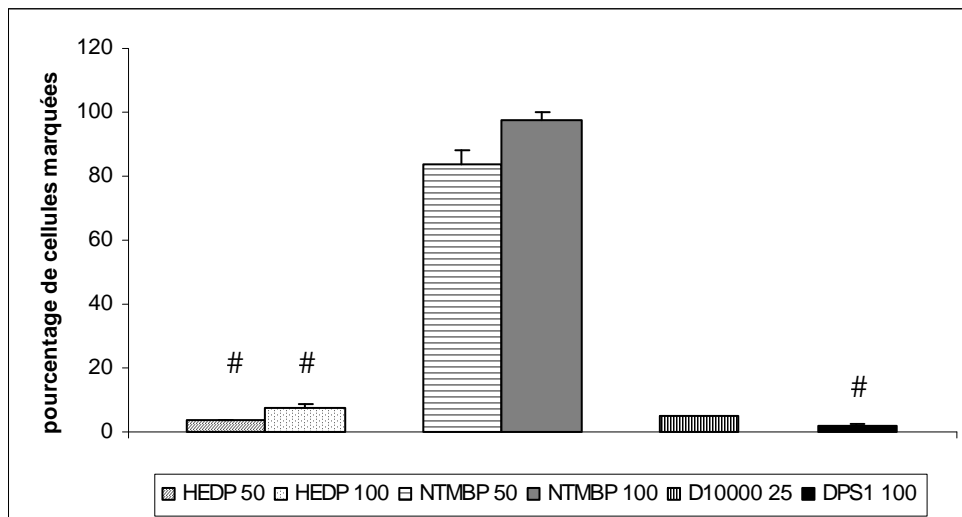


Figure 7 : effet des différents types de particules testés sur le pourcentage de marquage des BLCL après une incubation de 18h.

$p < 0,001$ vs NTMBP

Il apparaît que l'ajout de particules NTMBP aux doses de 50 et 100 μg de fer / mL de milieu d'incubation permet le marquage de $84 \pm 4\%$ ($n = 3$) et $97,5 \pm 2,5\%$ ($n = 2$) des cellules. La présence de particules HEDP aux doses de 50 et 100 μg de fer / mL de milieu de culture ne permet de marquer que $3,5 \pm 0,4\%$ ($n = 4$) et $7,2 \pm 1,6\%$ ($n = 4$) des cellules, marquage significativement moins efficace qu'avec les particules NTMBP ($p < 0,001$). De même et à cause de l'agrégation, l'ajout de particules D10000 à la dose de 25 μg de fer / mL de milieu d'incubation ne permet de marquer que 5% des cellules ($n = 1$). Pour les particules DPS1 à la dose de 100 μg de fer / mL, seules $1,9 \pm 0,7\%$ des cellules ($n = 2$) sont marquées ($p < 0,001$ versus NTMBP).

2.3. Evaluation quantitative du marquage des BLCL

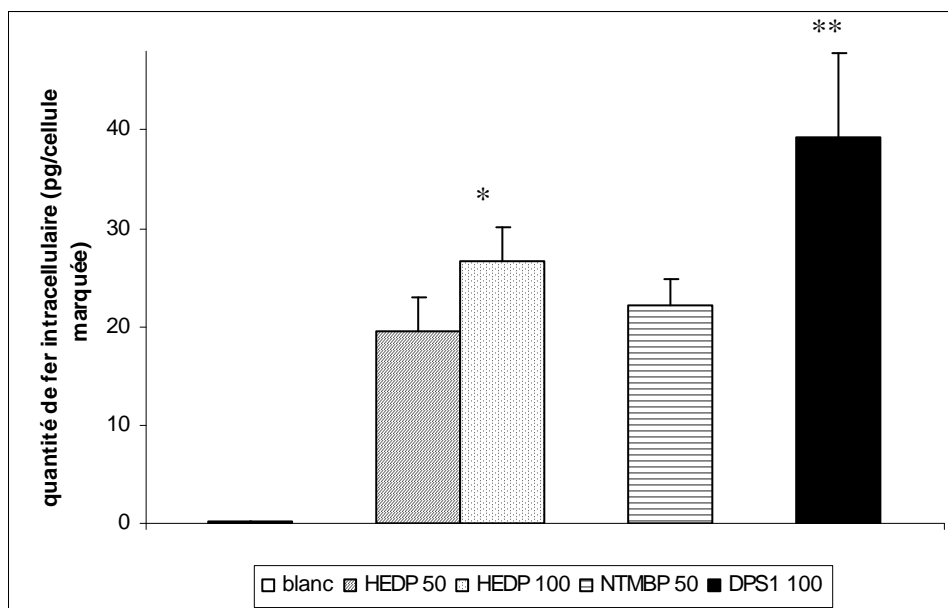


Figure 8 : effet des différents types de particules testés sur la quantité de fer par BLCL marqué après 18h d'incubation.

* $p < 0,05$ vs blanc ; ** $p < 0,01$ vs blanc

Comme nous l'avons observé lors de l'analyse qualitative, l'ajout de particules NTMBP à fortes doses (100 μg de fer / mL) ou de D10000 à faible dose (25 μg de fer / mL) s'accompagne de précipités importants que nous ne pouvons pas éliminer par lavage. Les quantités de fer données par ICP-OES correspondent donc à ces agrégats (majoritaires) et au fer intracellulaire. En conséquence, ces conditions expérimentales sont exclues des résultats présentés ici.

Ce graphique nous montre la quantité de fer intracellulaire exprimée en pg / cellule marquée, c'est-à-dire la quantité de fer donnée par ICP-OES corrigée du pourcentage de marquage, en fonction des quatre types de particules utilisés pour le marquage (HEDP, NTMBP, D10000 et DPS1) après 18h d'incubation. En absence de nanoparticule dans le milieu d'incubation, le taux basal mesuré par BLCL est de $0,11 \pm 0,03$ pg de fer ($n = 4$).

Après ajout de particules NTMBP à la dose de 50 µg de fer / mL de milieu d'incubation, ce taux augmente pour atteindre la valeur de $22,24 \pm 2,63$ pg de fer / cellule marquée (n = 3) (p = 0,052 versus blanc). Pour une incubation en présence de particules HEDP à la dose de 50 ou 100µg de fer / mL, la quantité de fer par cellule marquée est respectivement de $19,61 \pm 3,42$ pg (n = 4 ; p = 0,062 vs blanc) et de $26,63 \pm 3,50$ pg (n = 4 ; p = 0,016 vs blanc). Même si certaines valeurs sont à la limite de la significativité, un effet sur la quantité de fer incorporée est observé par rapport au blanc. Par contre, aucune différence significative entre les particules HEDP, DPS1 et NTMBP n'apparaît (p > 0,1). Tout se passe comme si les cellules incorporaient toujours la même quantité de fer quelque soit le type particulaire et la dose de fer utilisé. Les particules DPS1 à la dose de 100 µg de fer / mL de milieu d'incubation entraînent une augmentation significative de la quantité de fer intracellulaire ($39,21 \pm 8,68$ pg ; n = 2 ; p = 0,005 vs blanc). Cependant ce type de particules marque moins de cellules que les particules NTMBP (1,9 % de cellules marquées pour les particules DPS1 contre 84 % de cellules marquées pour les particules NTMBP à la dose de 50 µg de fer / mL).

2.4. Conclusion

Il apparaît que les 4 types de particules testés, HEDP, NTMBP, DPS1 et D10000 ne modifient pas de manière significative la viabilité des BLCL. Cependant, les particules NTMBP se démarquent par leur capacité à marquer de manière importante ces cellules (> 80% de cellules marquées) alors que les particules HEDP marquent moins efficacement (entre 3 et 8% de cellules marquées en fonction de la dose). Les autres types de particule utilisés (DPS1 et D10000) offrent un marquage nettement moindre (1,9% de cellules marquées avec les particules DPS1 et 5% de cellules marquées avec les particules D10000). Par rapport à la quantité de fer intracellulaire, il n'y a pas de différence notable entre les quatre types de particules.

Les particules NTMBP présentent donc tous les avantages puisqu'elles permettent de préserver la fonction proliférative des cellules tout en les marquant efficacement. Nous allons donc les utiliser à la dose de 50 µg de fer / mL (agrégation à la dose de 100 µg / mL) pour le marquage des lymphocytes périphériques murins tout en continuant à travailler avec le recouvrement commercial de base (HEDP) qui nous servira de référence.

II/ Marquage des lymphocytes périphériques murins

Nous venons de voir que les particules NTMBP à la dose de 50 µg de fer / mL marquent de manière importante ($84 \pm 4\%$) les BLCL tout en préservant leur viabilité ($128,3 \pm 16,8\%$). Les BLCL nous ont donc permis de sélectionner sans ambiguïté ce type particulière ainsi que la dose de fer à ajouter dans le milieu d'incubation. Toutefois, l'intérêt de cette étude est de marquer des lymphocytes périphériques murins dans le but d'une injection autologue chez l'animal porteur d'une tumeur.

1. Effet des particules HEDP et NTMBP sur la viabilité des lymphocytes périphériques

En absence de particule dans le milieu d'incubation, la viabilité cellulaire est de $77,6 \pm 3,5\%$ ($n = 6$). L'ajout dans le milieu de culture de particules HEDP à la dose de 50 µg de fer / mL diminue de manière significative la viabilité cellulaire ($p = 0,002$ vs blanc) qui passe à $55,8 \pm 4,8\%$ ($n = 5$). De même, l'ajout de particules NTMBP à la dose de 50 µg de fer / mL altère de manière significative ($p = 0,0003$ vs blanc) la viabilité des lymphocytes qui est de $49,0 \pm 4,3\%$ ($n = 5$). Par contre, il n'y a pas de différence significative en terme de viabilité entre les particules HEDP et NTMBP pour la même dose de fer utilisée ($p = 0,282$). Ces résultats sont présentés à la **figure 9**.

Le graphique ci-dessous représente la viabilité des lymphocytes périphériques murins isolés chez le rat Sprague Dawley femelle sain après 18h d'incubation avec les particules HEDP et NTMBP à la dose de 50 µg de fer / mL de milieu d'incubation.

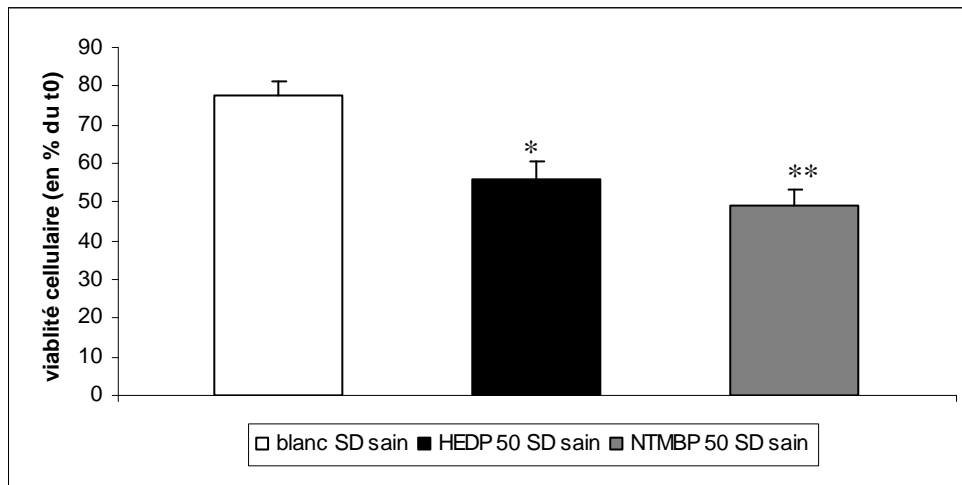


Figure 9 : effet des particules HEDP et NTMBP sur la viabilité des lymphocytes périphériques après une incubation de 18h.

* $p < 0,005$ vs blanc ; ** $p < 0,0005$ vs blanc

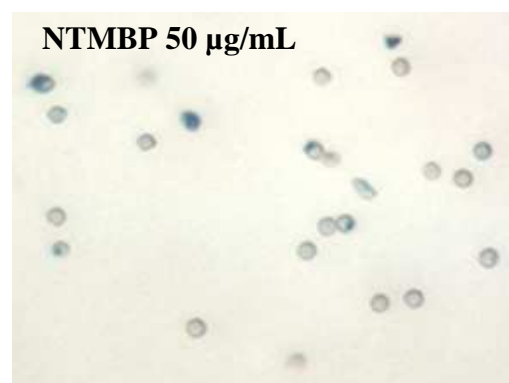
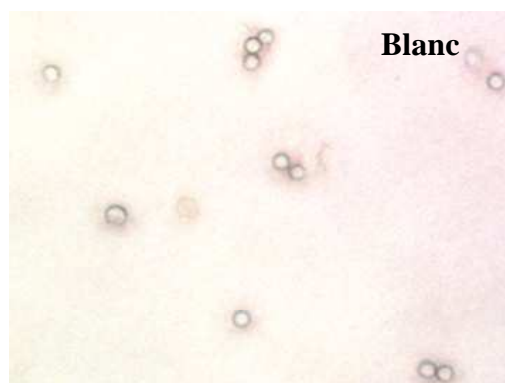


Figure 10 : clichés de bleu de Prusse associés au graphique figure 11.
Grossissement x40.

2. Effet des particules HEDP et NTMBP sur le pourcentage de lymphocytes périphériques marqués

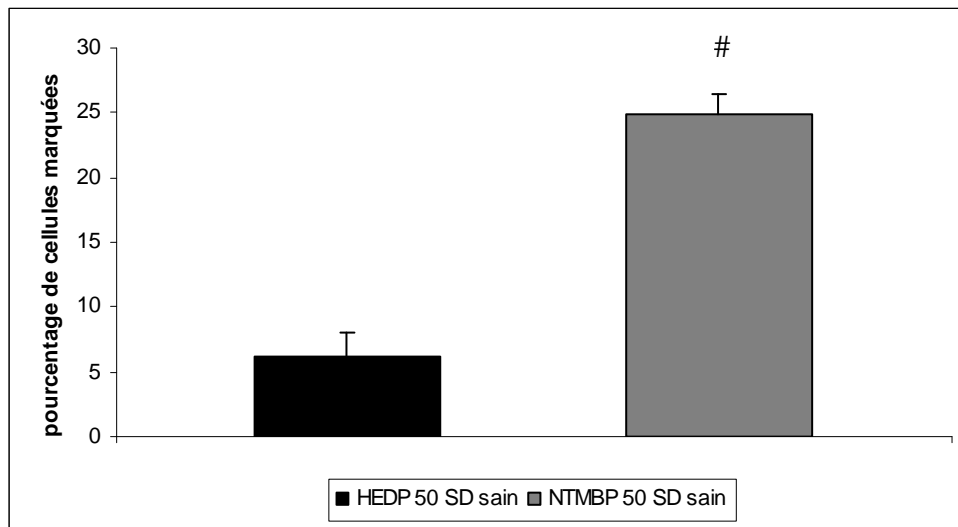


Figure 11 : effet des particules HEDP et NTMBP sur le pourcentage de lymphocytes périphériques marqués après une incubation de 18h.

$p < 0,0005$ vs HEDP

Les clichés de la **figure 10** correspondent à une coloration au bleu de Prusse de lymphocytes périphériques murins après incubation avec les particules HEDP et NTMBP à la dose de 50 μg de fer / mL.

L'analyse quantitative (**figure 11**) de ces clichés montre que les particules HEDP à la dose de 50 μg / mL permettent de marquer $6,1 \pm 1,9\%$ ($n = 5$) des cellules alors que les particules NTMBP à la même dose permettent d'accroître de manière significative le pourcentage de marquage ($p = 0,0001$) qui passe à $24,8 \pm 1,7\%$ ($n = 5$).

3. Effet des particules HEDP et NTMBP sur la quantité de fer par lymphocyte périphérique marqué

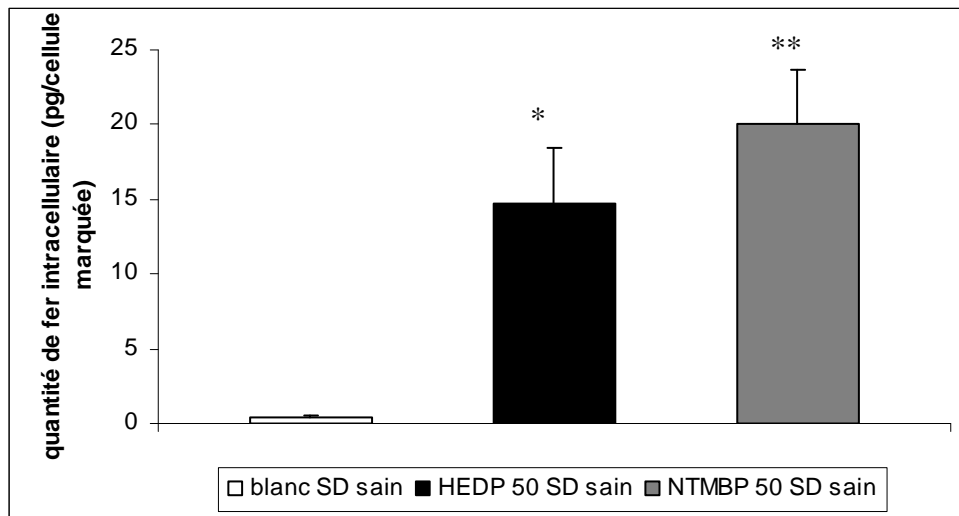


Figure 12 : effet des particules HEDP et NTMBP sur la quantité de fer par lymphocyte marqué après une incubation de 18h.

* $p < 0,005$ vs blanc ; ** $p < 0,0005$ vs blanc

La quantité de fer intracellulaire exprimée en pg / cellule marquée correspond à la quantité de fer intracellulaire obtenue par ICP-OES corrigée du pourcentage de cellules marquées (6,1% de marquage avec les particules HEDP à la dose de 50 μ g de fer / mL et 24,8% de marquage avec les particules NTMBP à la même dose).

Ce graphique nous montre la quantité de fer intracellulaire exprimée en pg / cellule marquée en fonction des particules utilisées pour le marquage (HEDP et NTMBP) après 18h d'incubation. En absence de particule dans le milieu d'incubation, le taux basal mesuré par lymphocyte périphérique est de $0,46 \pm 0,02$ pg de fer ($n = 6$). Après ajout de particules NTMBP à la dose de 50 μ g de fer / mL de milieu d'incubation, ce taux augmente de manière significative ($p = 0,0002$ vs blanc) et atteint la valeur de $20,11 \pm 3,56$ pg de fer / cellule marquée ($n = 5$). En présence de particules HEDP à la dose de 50 μ g de fer / mL, la quantité de fer par cellule atteint $14,77 \pm 3,67$ pg ($n = 5$;

$p = 0,003$ vs blanc et $p = 0,206$ vs NTMBP 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$). Les valeurs sont statistiquement significatives par rapport au blanc mais la différence entre les particules HEDP et NTMBP est négligeable.

4. Conclusion

Quelque soit le type cellulaire à marquer (BLCL ou lymphocytes périphériques murins non activés) et quelques soient les agents particulaires utilisés pour le marquage, la quantité de fer intracellulaire reste la même (**tableau 3**). Par contre, en terme de pourcentage de marquage, une différence importante apparaît entre les particules HEDP et NTMBP. Pour les particules HEDP, le pourcentage de cellules marquées reste faible et globalement identique quelque soit le type cellulaire alors que pour les particules NTMBP une différence nette entre les BLCL et les lymphocytes périphériques est observée. Ces particules marquent préférentiellement les BLCL (84%) par rapport aux lymphocytes périphériques murins (25%) (**tableau 3**).

Comme pour les BLCL, les particules NTMBP à la dose de 50 μg de fer / mL de milieu d'incubation marquent mieux les lymphocytes périphériques murins que les particules HEDP. Prendre les BLCL pour sélectionner un type particulaire s'est donc avéré être un choix judicieux puisque les conclusions en terme d'efficacité de marquage sont les mêmes pour les deux types cellulaires choisis. Seulement, à la différence des BLCL qui prolifèrent naturellement dans un milieu de culture de base (RPMI 1640), les lymphocytes périphériques murins cultivés en absence de chimiokines et/ou de facteurs de croissance semblent fragilisés et leur nombre décroît au cours du temps pour atteindre 50% de viabilité au bout de 18h d'incubation. Ceci pose le problème du nombre et du bon état des cellules à injecter en autologue chez l'animal pour suivre l'infiltration lymphocytaire de la tumeur en IRM. Dans le chapitre suivant, nous tenterons de remédier

à ce problème en activant les lymphocytes périphériques murins de manière non spécifique (Concanavoline A) en présence d'Interleukine-2.

Marquage NTMBP 50 µg de fer / mL	Pourcentage de cellules marquées (en %)	Quantité de fer intracellulaire (en pg de fer / cellule marquée)
BLCL	84,0 ± 4,0 (n = 3)	22,24 ± 2,63 (n = 3)
Lymphocytes périphériques naïfs (rats Sprague Dawley femelles sains)	24,8 ± 1,7 (n = 5)	20,11 ± 3,56 (n = 5)

Marquage HEDP 50 µg de fer / mL	Pourcentage de cellules marquées (en %)	Quantité de fer intracellulaire (en pg de fer / cellule marquée)
BLCL	3,5 ± 0,4 (n = 4)	19,61 ± 3,42 (n = 4)
Lymphocytes périphériques naïfs (rats Sprague Dawley femelles sains)	6,1 ± 1,9 (n = 5)	14,77 ± 3,67 (n = 5)

Tableau 3 : comparaison de la viabilité cellulaire, du pourcentage de marquage et de la quantité de fer intracellulaire entre la lignée cellulaire BLCL et les lymphocytes périphériques isolés chez le rat Sprague Dawley femelle sain après une incubation de 18h en présence de particules HEDP et NTMBP à la dose de 50 µg de fer / mL de milieu d'incubation.

III/ Marquage des lymphocytes périphériques murins activés de manière non spécifique

Comme nous venons de le voir, les particules NTMBP marquent plus efficacement les lymphocytes périphériques que les particules HEDP. Toutefois, après 18h d'incubation, le nombre de cellules reste insuffisant pour envisager une injection autologue chez l'animal porteur d'une tumeur. D'autre part, les cellules semblent fragilisées en raison des conditions d'incubation qui se font sans l'intervention de facteurs comme l'Il-2 permettant de maintenir les cellules dans un bon état fonctionnel. Nous allons donc maintenant étudier l'activation non spécifique des lymphocytes périphériques murins (Concanavaline A / Il-2) ainsi que l'influence de cette activation sur la viabilité cellulaire et sur l'efficacité de marquage. En effet, l'activation des lymphocytes entraîne des modifications phénotypiques et physiologiques importantes de la cellule, ce qui pourrait modifier la capacité d'endocytose des lymphocytes activés par rapport à celle des lymphocytes naïfs.

1. Viabilité des lymphocytes périphériques murins au cours de l'activation, pendant et après le marquage NTMBP

La viabilité des lymphocytes périphériques murins (viabilité normalisée à 1 par rapport à celle du point $t = -96h$) en fonction des différentes phases d'incubation (activations non spécifiques, marquage NTMBP 50 μg de fer / mL, post-marquage) a été évaluée (**figure 13**). Le temps t_0 indique le début de l'incubation en présence de particules NTMBP. Les temps indiqués en négatif correspondent donc aux deux phases d'activation non spécifiques (1^{ère} phase de 24h avec 2 $\mu g/mL$ Concanavaline A / 4 ng/mL Il-2 ; 2^{ème} phase de 60h avec 3 $\mu g/mL$ Concanavaline A / 4 ng/mL Il-2). Les temps $t = 42h, 66h, 90h$ nous renseignent sur la viabilité des lymphocytes marqués lorsqu'ils sont remis à incuber dans du milieu de culture dépourvu de nanoparticules. Ceci correspond donc à l'évaluation de la toxicité du fer intracellulaire, évaluation effectuée sur 72h.

Pendant la 1^{ère} phase d'activation (24h), le nombre de cellules reste inchangé mais augmente d'un facteur 2,4 pendant la 2^{ème} phase d'activation (**figure 13**). Pendant la phase de marquage magnétique et malgré la présence de fer dans le milieu d'incubation, les lymphocytes continuent à proliférer. Leur nombre augmente de $2,40 \pm 0,64$ à $4,83 \pm 1,53$ ($n = 3$), augmentation comparable à celle observée en absence de nanoparticules ($2,40 \pm 0,65$ à $4,00 \pm 1,32$; $n = 3$). Pendant la phase post - marquage, le nombre de lymphocytes varie peu. La présence de fer dans les cellules ne semble donc pas avoir d'effet sur la viabilité cellulaire.

En conclusion, l'activation non spécifique des lymphocytes périphériques nous permet d'augmenter significativement le nombre de cellules et la présence de nanoparticules n'a pas d'impact sur la viabilité cellulaire.

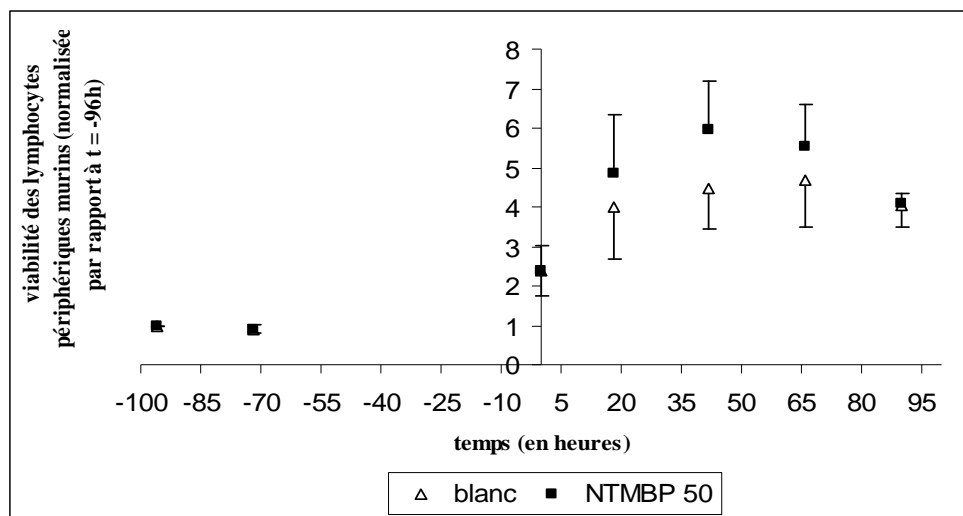


Figure 13 : viabilité des lymphocytes périphériques murins pendant les deux phases d'activation Concanavaline A puis pendant et après la période de 18h d'incubation en présence ou non de particules NTMBP à la dose de 50 μg de fer / mL.

Les résultats sont normalisés à 1 par rapport au nombre de cellules initialement prélevé (t = -96h).

2. Localisation des particules NTMBP dans les lymphoblastes

Les clichés ci-dessous représentent les coupes semi fines permettant d'identifier les zones où sont localisées les nanoparticules, zones qui seront explorées par la suite en MET. Les lymphocytes périphériques activés (lymphoblastes) de manière non spécifique (Concanavaline A) sont mis en évidence par coloration au bleu de méthylène / bleu azur 2 et le fer apparaît de couleur marron sur les images.

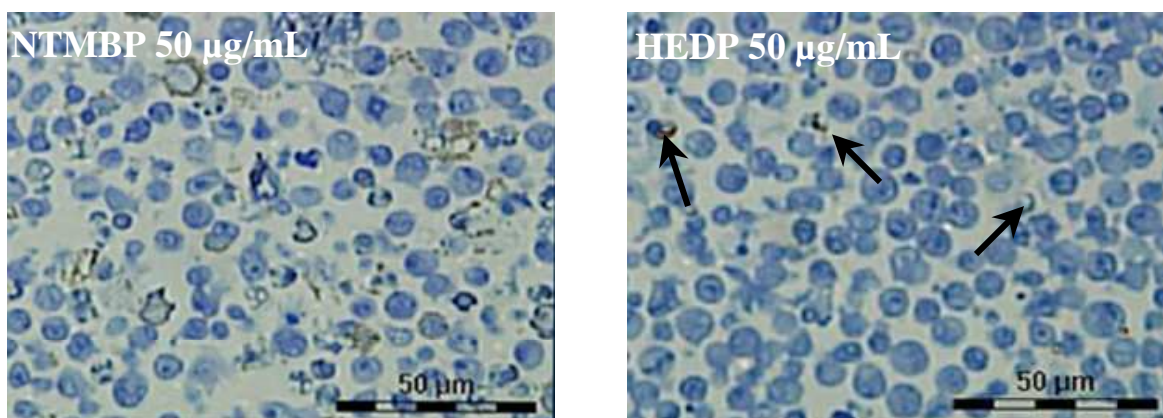


Figure 14 : localisation sur les coupes semi fines des particules HEDP et NTMBP au sein de lymphocytes périphériques murins activés. Incubation à la dose de 50 µg de fer / mL pendant une période d'incubation de 18h. Coloration des cellules au bleu de méthylène / bleu azur 2.

L'image de gauche correspond à une incubation des cellules avec les particules NTMBP à la dose de 50 µg / mL pendant une période de 18h. Il nous montre la présence de fer au niveau des cellules. L'image de droite correspond à une incubation des lymphocytes avec les particules HEDP à la dose de 50 µg / mL pendant la même période. Sur ce cliché, seules trois zones laissent apparaître la présence de nanoparticules alors que sur le cliché correspondant au NTMBP, le nombre de cellules marquées est largement supérieur comme le confirme l'analyse quantitative présentée au paragraphe 3.

Les clichés de Microscopie Electronique à Transmission (MET) permettent de localiser les particules NTMBP au niveau des lymphoblastes. Les particules apparaissent au niveau de la membrane plasmique mais aussi confinées au sein d'endosomes. Ici le cytoplasme paraît plus importante que pour les lymphocytes périphériques naïfs (Cf. cliché MET publication *Evaluating SPIO-labelled cell MR efficiency by 3D quantitative T2* MRI, NMR in Biomedicine*), ce qui constitue une des modifications morphologiques spécifique de l'état d'activation des lymphocytes.

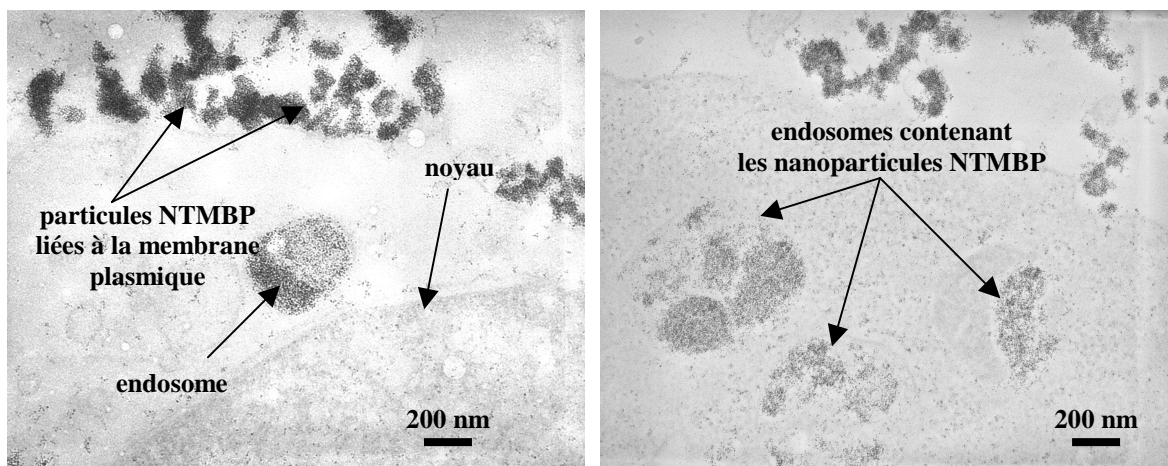


Figure 15 : localisation en MET des particules NTMBP au sein d'endosomes situés au niveau du cytoplasme des lymphoblastes. Incubation avec des particules NTMBP à la dose de 50 μg de fer / mL pendant une période d'incubation de 18h.

3. Effet des particules NTMBP sur le pourcentage de lymphoblastes marqués et étude de la stabilité du marquage

En activant de manière non spécifique les lymphocytes périphériques murins, nous avons doublé le pourcentage de cellules marquées. En effet, celui-ci passe de $24,8 \pm 1,7\%$ ($n = 5$) pour les lymphocytes périphériques murins naïfs à $48,7 \pm 3,9\%$ ($n = 5$) pour les lymphocytes périphériques murins activés de manière non spécifique. Ce dernier pourcentage de marquage a été déterminé par analyse quantitative des cartographies 3D

T2* obtenues par micro-IRM. Nous développerons dans le **chapitre V** cette nouvelle méthodologie.

Le graphique suivant nous montre la quantité de fer intracellulaire par lymphoblaste marqué à la fin des 18h d'incubation en présence de particules NTMBP à la dose de 50 μg de fer / mL puis une fois les cellules remises à incuber dans du milieu dépourvu de nanoparticules (t = 42h, 66h et 90h). A la fin du marquage (t = 18h), le taux de fer dans les cellules marquées est de $5,87 \pm 0,15$ pg (n = 3) puis il reste stable jusqu'à t = 90h (**figure 16**).

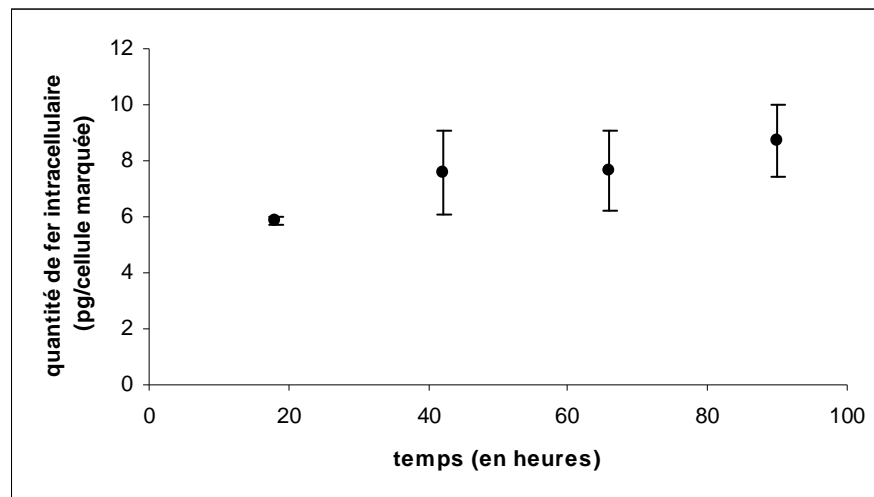


Figure 16 : étude de la stabilité du marquage 42h, 66h et 90h après incubation avec les particules NTMBP à la dose de 50 μg de fer / mL.

4. Conclusion

L'activation des lymphocytes périphériques murins permet de multiplier par 4 le nombre de cellules en vue d'une injection autologue chez l'animal porteur d'une tumeur. Par ailleurs, en activant de manière non spécifique les lymphocytes (Concanavaleine A/II-2), le pourcentage de marquage est doublé (48,7%) mais la quantité de fer intracellulaire diminue en contre partie d'un facteur 4 ($5,87 \pm 0,15$ pg). Les modifications entraînées suite à l'activation modifient donc la capacité d'endocytose des lymphocytes puisque ces derniers incorporent quatre fois moins de fer.

IV/ Nouvelle méthodologie d'évaluation de l'efficacité du marquage lymphocytaire

Suivre in vivo des cellules en IRM requière une haute sensibilité et donc la meilleure combinaison entre agent de contraste / type cellulaire / stratégie de marquage et protocole d'imagerie. L'évaluation quantitative de l'efficacité de marquage est essentielle pour optimiser cette « meilleure » combinaison. Certaines méthodes comme la Microscopie Electronique à Transmission (MET), l'immunofluorescence [220] et le radiomarquage [230] permettent une évaluation de la capture de l'agent de contraste par les cellules et une évaluation de la localisation de l'agent de contraste dans les cellules. Cependant, il n'est pas possible de lier directement la charge en particules dans les cellules avec l'effet induit sur l'image RM puisque l'internalisation dans les cellules modifie radicalement la relaxivité des particules [220, 180]. L'efficacité RM des cellules marquées peut seulement être évaluée par une acquisition basée sur les propriétés magnétiques. La magnétophorèse [221] et la relaxométrie [231] peuvent être une première étape pour répondre à ce problème mais, si la réponse est basée sur les propriétés magnétiques des cellules marquées, les techniques mentionnées plus haut utilisent habituellement un champ magnétique qui est plus faible que celui utilisé en imagerie. Donc, l'efficacité RM peut seulement être obtenue par IRM.

Plusieurs articles traitant de la détection in vitro de cellules marquées individualisées [220, 232, 226, 233, 199] utilisent l'IRM 2D ou 3D pondérée T2*. Cependant, aucune de ces études n'utilise l'imagerie quantitative T2* malgré la hausse significative de sensibilité qui peut être gagnée. En effet, les effets superparamagnétiques et donc l'intensité et le volume des hyposignaux sont dépendants de la pondération T2*, illustrés par une augmentation du contraste avec l'augmentation du temps d'écho [220]. En conséquence, seule une cartographie quantitative T2* peut produire un hyposignal dont le

volume de la perturbation est indépendant de la pondération T2* et peut être comparé d'un scan à un autre ou potentiellement d'un système IRM à un autre système similaire.

Ce travail dont le titre est : **Evaluating SPIO-labelled cell MR efficiency by 3D quantitative T2* MRI** a fait l'objet d'un article accepté pour publication dans *NMR in Biomedicine*. Il propose une nouvelle méthode pour mesurer quantitativement l'efficacité RM du marquage cellulaire via la microscopie RM quantitative 3D T2* de manière à avoir un outil objectif pour comparer le potentiel des différents agents de contraste à marquer un type cellulaire défini, ou pour comparer l'affinité d'un agent de contraste pour différents types cellulaires. Le nombre et le volume des hyposignaux générés par les cellules marquées sont estimés pour un couple type cellulaire / agents de contraste en utilisant différentes concentrations en fer. La méthodologie a été validée en la comparant avec les méthodes classiques d'évaluation du marquage cellulaire (MET, ICP-OES et coloration au bleu de Prusse) et a été utilisée pour comparer les affinités de deux types de particules pour un type cellulaire (lymphocytes périphériques murins).

V/ Suivi in vivo de l'infiltration tumorale par les lymphocytes périphériques murins activés et marqués NTMBP

Les lymphocytes périphériques sont activés de manière non spécifique (Concanavoline A) après avoir été prélevés chez un rat Sprague Dawley femelle portant une tumeur C6 en sous cutané au niveau de la patte droite (**Cf. modèle tumoral**). Précédemment, nous avons montré que les particules NTMBP à la dose de 50 µg de fer / mL de milieu d'incubation marquent 50% des lymphocytes périphériques murins activés de manière non spécifique. En activant les lymphocytes périphériques, le pourcentage de marquage obtenu est donc plus important qu'avec les lymphocytes périphériques murins naïfs (25%). Ainsi, nous avons amélioré le marquage et il nous faut maintenant étudier le devenir in vivo des lymphocytes périphériques activés et marqués après injection autologue chez le rat Sprague Dawley femelle portant une tumeur C6 en sous-cutané. Le but est de suivre en IRM l'infiltration de la tumeur par les lymphocytes.

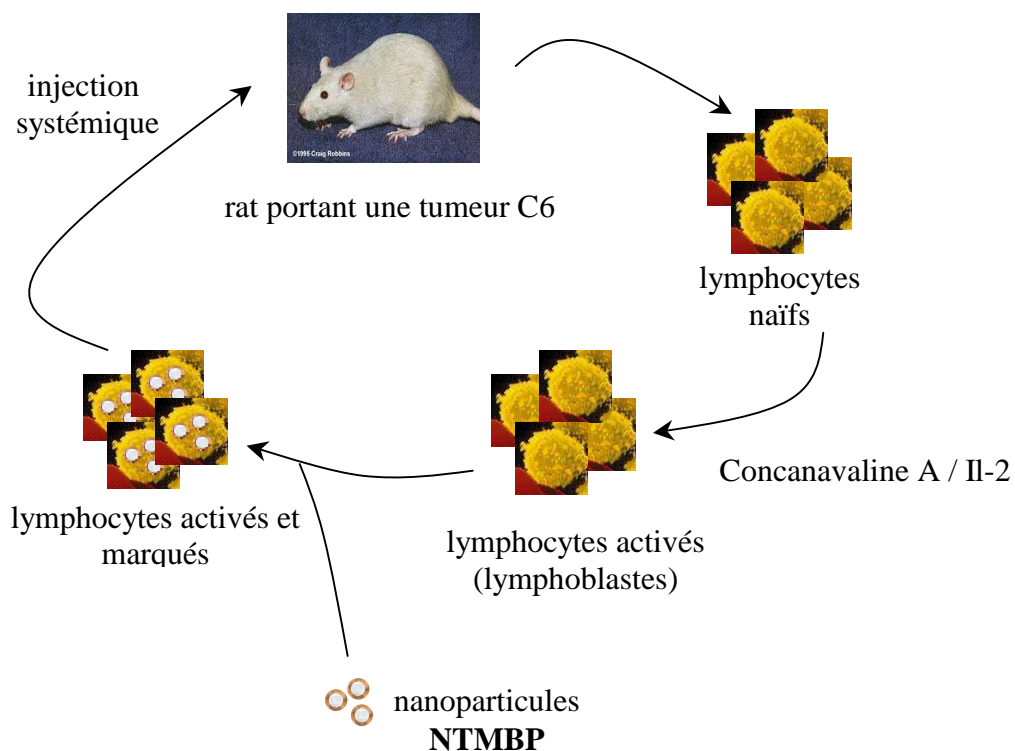


Figure 17 : schéma représentant le marquage de lymphocytes périphériques activés de manière non spécifique après prélèvement chez un rat portant une tumeur C6. Injection autologue des lymphocytes marqués.

1. Modèle tumoral

Le nombre de cellules sanguines / mm^3 en fonction du temps (en jours) avant et après inoculation de 2 millions de cellules C6 en sous-cutané au niveau de la patte droite du rat Sprague Dawley femelle a été étudié (**figure 18**).

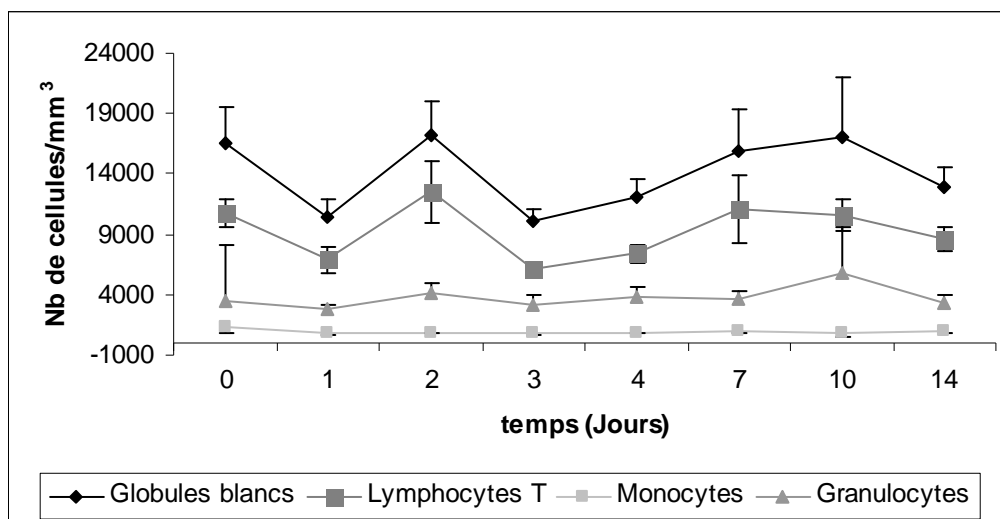


Figure 18 : cinétique du nombre de globules blancs, lymphocytes T, monocytes et granulocytes périphériques chez le rat Sprague Dawley femelle après inoculation de 2 millions de cellules C6 en sous cutané au niveau de la patte droite.

La numération faite à t_0 correspond au nombre de cellules / mm^3 de sang chez le rat sain. A ce temps, nous avons numéré 16520 ± 2120 globules blancs / mm^3 de sang ($n = 2$), 10800 ± 800 lymphocytes T / mm^3 de sang ($n = 2$), 1250 ± 250 monocytes / mm^3 de sang ($n = 2$) et 3500 ± 1050 granulocytes / mm^3 de sang ($n = 2$). Ensuite, le nombre de cellules / mm^3 de sang peut être considéré comme constant au cours du temps malgré l'implantation puis la prolifération des cellules C6 au niveau de la patte. La tumeur C6 ne semble donc pas être une tumeur très immunogène.

Chez le rat Sprague Dawley femelle sain, l'étude phénotypique (**figure 19**) des globules blancs isolés à partir du sang par Ficoll nous donne les résultats suivants : 70 % de lymphocytes T CD4+, 16% de lymphocytes T CD8+, 10% de lymphocytes B, 4% de monocytes.

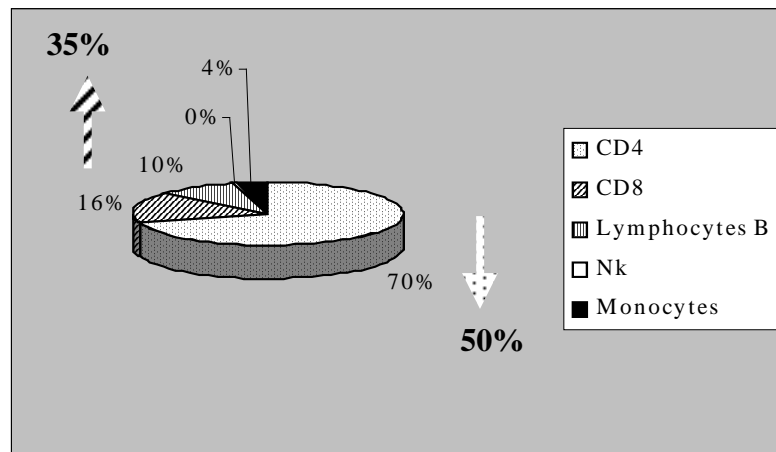


Figure 19 : phénotype des cellules mononuclées périphériques chez le rat Sprague-Dawley Femelle.

Les deux flèches indiquent les pourcentages de lymphocytes CD4+ et CD8+ mesurés 3 jours post-inoculation de 2 millions de cellules tumorales C6 au niveau de la patte droite.

3 jours après inoculation de 2 millions de cellules C6 en sous cutané au niveau de la patte droite du rat Sprague Dawley femelle (au moment du prélèvement des lymphocytes périphériques à partir du sang), la proportion entre lymphocytes T CD4+ et lymphocytes T CD8+ change. Les lymphocytes cytotoxiques CD8+ augmentent à 35% alors que les lymphocytes auxiliaires CD4+ diminuent à 50% (**figure 19**).

2. Suivi de l'infiltration tumorale par les lymphocytes périphériques activés

Des images IRM caractéristiques de tumeurs C6 implantées en sous-cutané ont été réalisées (**figures 20 et 21**). La première planche correspond à des images obtenues en écho de spin 3D (**figure 20**). Sur ces images, nous observons que la tumeur a une structure relativement homogène. Seule l'image n° 7 laisse apparaître une zone sombre en position centrale, zone qui pourrait correspondre à un foyer hémorragique.

La deuxième planche présente les mêmes plans de coupe obtenus en écho de gradient 3D (pondération T2*) (**figure 21**). Avec ce type de séquence, la sensibilité aux effets T2 est accrue. Les images laissent apparaître une hétérogénéité plus importante que sur les images obtenues en écho de spin.

D'autre part, ces images 3D nous ont permis de réaliser une analyse en volume des différentes tumeurs. Celle-ci nous montre que la taille de la tumeur est très variable puisque le volume mesuré varie de 50 à 200 μL , 7 jours post-implantation.

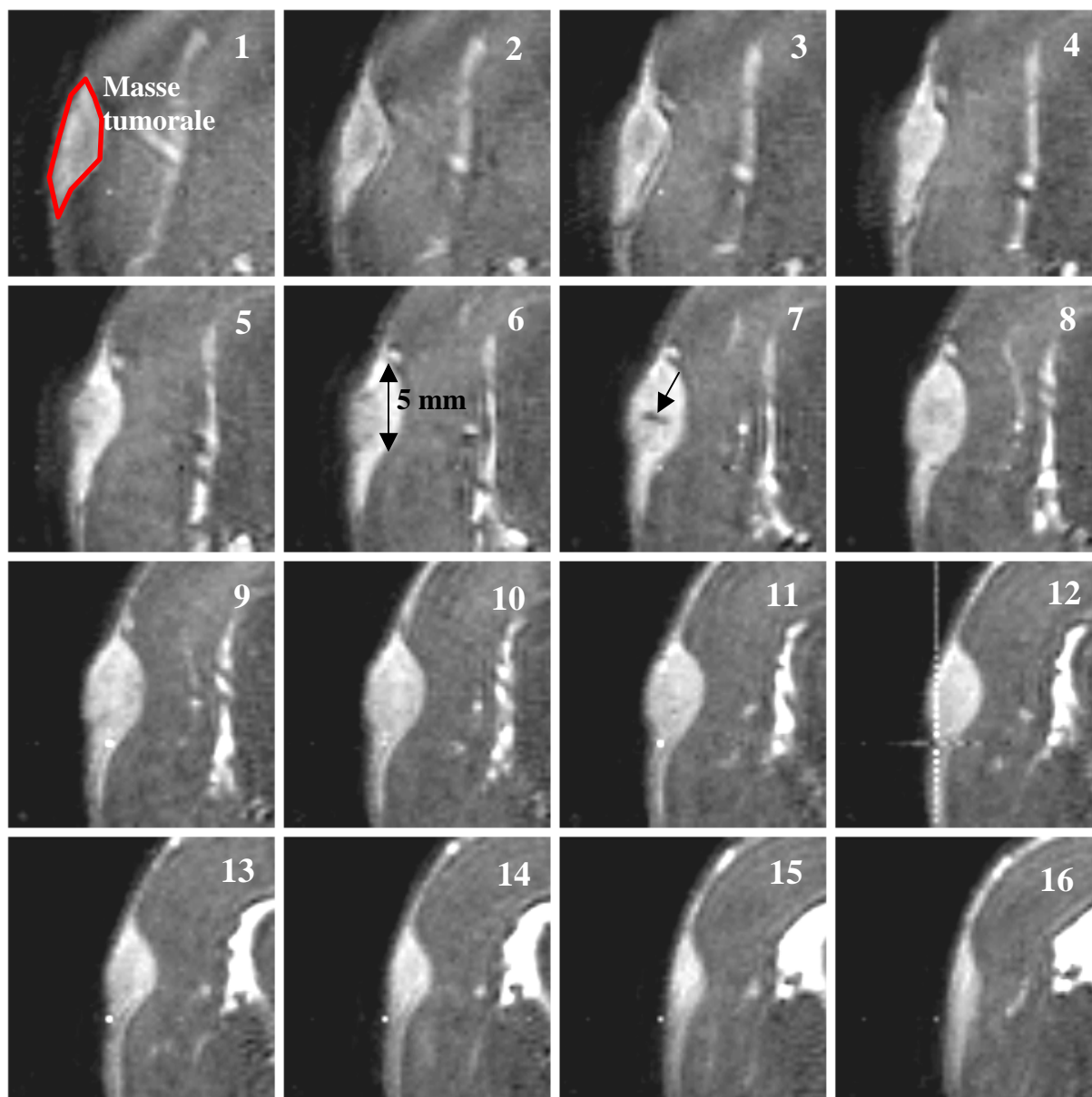


Figure 20 : IRM d'une tumeur C6 implantée en sous-cutanée au niveau de la patte droite d'un rat Sprague Dawley femelle.

Echo de spin 3D : NEX = 1 ; TR = 1500 ms ; TE₁ = 7 ms ; RF = 16

Résolution = 234 × 234 × 625 μm

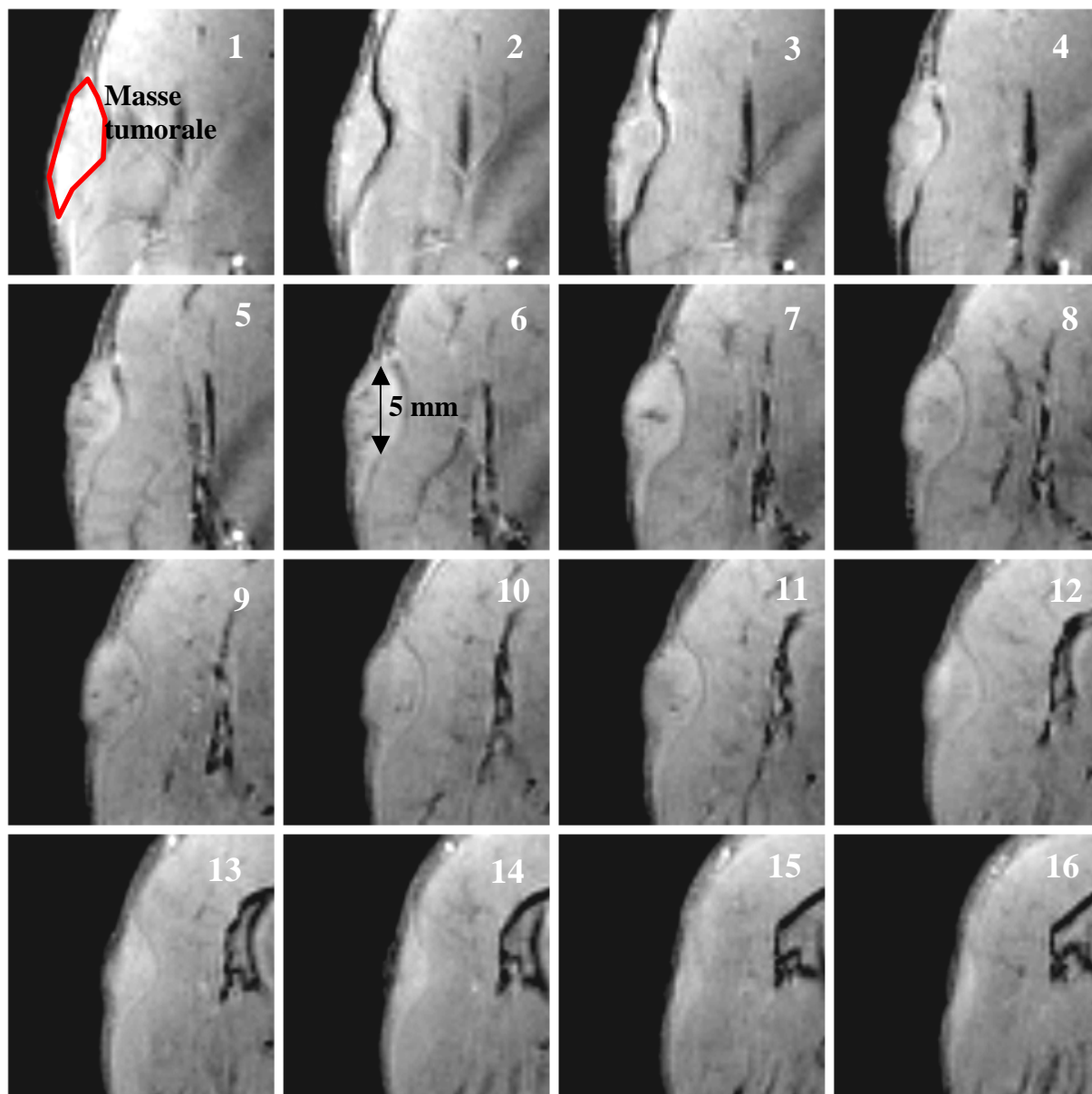


Figure 21 : IRM d'une tumeur C6 implantée en sous-cutané au niveau de la patte droite d'un rat Sprague Dawley femelle.

Echo de gradient 3D : NEX = 2 ; TR = 110 ms ; TE = 4,7 ms ; $\alpha = 20^\circ$

Résolution = $234 \times 234 \times 625 \mu\text{m}$

Deux images obtenues en écho de gradient 3D, avant **(a)** et après **(b)** injection de lymphocytes marqués, ont été réalisées (**figure 22**). 8 à 10 millions de cellules ont été injectés en autologue par voie intraveineuse après avoir été activés de manière non spécifique (Concanavoline A / Il-2) puis marqués avec les particules NTMBP à la dose de 50 μg / mL de milieu d'incubation.

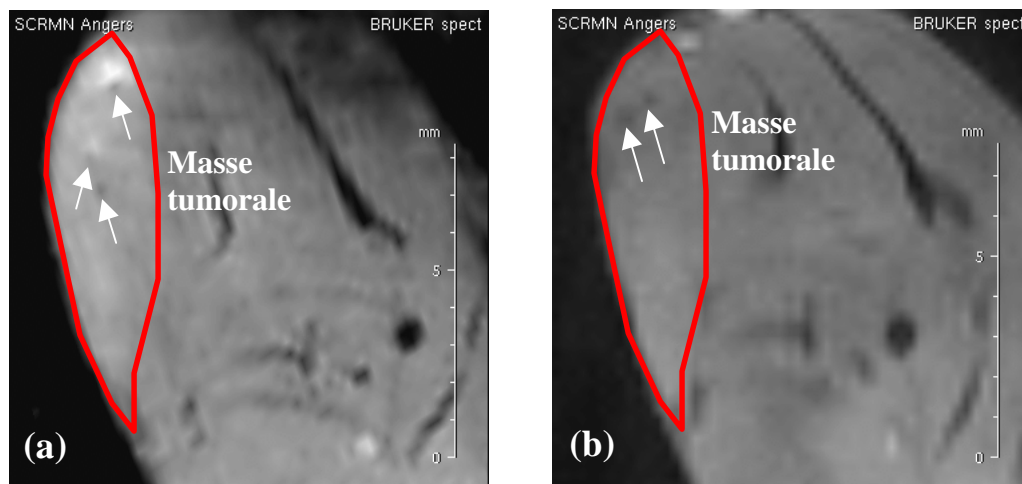


Figure 22 : IRM d'une tumeur C6 sous-cutanée, réalisée avant **(a)** et 2 jours après **(b)** injection de lymphocytes périphériques activés de manière non spécifique puis marqués avec les particules NTMBP à la dose de 50 μg de fer / mL de milieu d'incubation.

Echo de gradient 3D ; résolution = 234 \times 234 \times 465 μm

Sur les images avant **(a)** et après **(b)** injection de lymphocytes périphériques marqués avec les particules NTMBP à la dose de 50 μg de fer / mL, apparaissent quelques hyposignaux (flèches). L'image obtenue après injection **(b)** des lymphocytes marqués ne s'accompagne pas d'une baisse importante du signal au niveau de la tumeur ou d'une augmentation du nombre d'hyposignaux. Si une infiltration lymphocytaire existe, elle n'est donc pas massive et détectable dans nos conditions expérimentales. En conséquent, nous avons analysé ces tumeurs, in vitro, en microscopie IRM, après dissection (**figure 23**).

Sur les deux images ci-dessous, nous observons que cette tumeur est constituée de deux parties dont une à gauche plus volumineuse (**figure 23**). Au niveau des deux parties de la tumeur, se trouvent des hyposignaux. Certains sont très étendus et de forme irrégulière (partie gauche). Les autres (flèches), beaucoup plus petits et de forme sphérique, ne sont détectables qu'en pondération T2*.

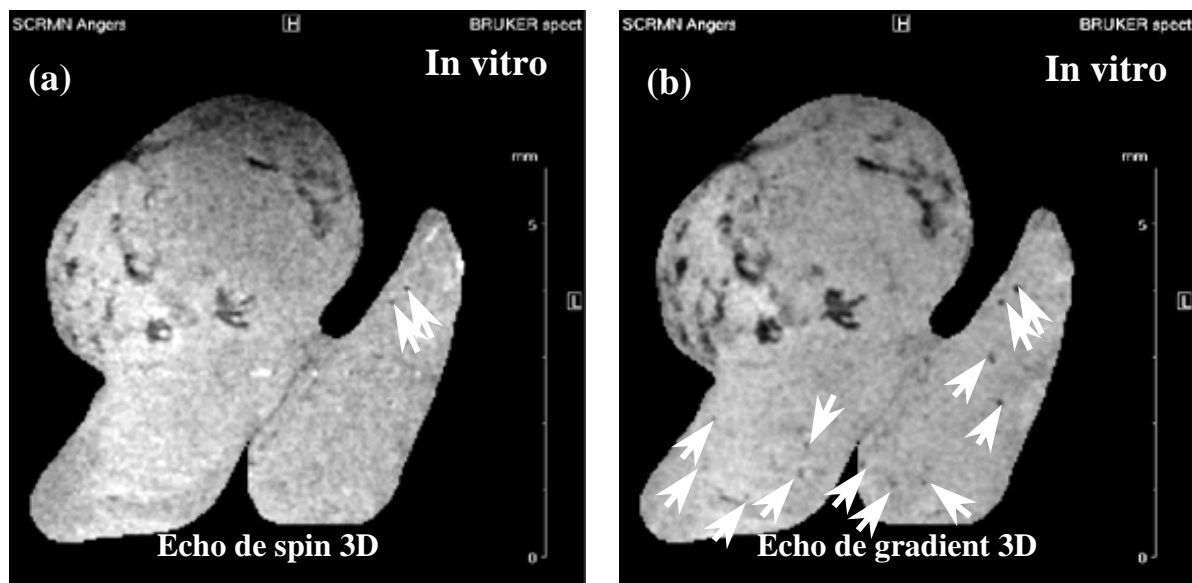


Figure 23 : microscopie IRM montrant la présence d'hyposignaux (flèches) au niveau de la tumeur 2 jours post-injection.

L'image de gauche est obtenue en écho de spin 3D (**a**) alors que l'image de droite est obtenue en écho de gradient 3D (**b**).

Résolution isotrope = 70 μm

3. Conclusion

Les nanoparticules NTMBP à la dose de 50 µg de fer / mL nous ont permis de marquer la moitié des lymphocytes périphériques murins activés de manière non spécifique mais le suivi de l'infiltration lymphocytaire de la tumeur, après injection des cellules en autologue par voie intraveineuse, est resté infructueux. En effet, les images in vivo de la tumeur ne montrent aucune diminution significative du signal RM post-injection, diminution qui irait dans le sens d'une infiltration lymphocytaire. C'est pourquoi nous avons réalisé des images in vitro permettant d'obtenir une résolution spatiale plus importante. Ces images laissent apparaître de petits hyposignaux qui pourraient correspondre à des lymphocytes marqués mais l'hétérogénéité de la tumeur (foyers hémorragiques) rend la détection difficile. Une analyse par immunohistochimie devrait être prochainement réalisée afin de confirmer ou non la présence de lymphocytes marqués au niveau du site tumoral.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Le diagnostic précoce de tumeurs primitives ou secondaires reste un problème important de santé publique. Dans ce cadre, le but de notre travail a été de proposer une approche originale reposant sur la vectorisation spécifique d'agents de contraste vers les cellules cancéreuses, vectorisation pouvant être assurée soit par une modification chimique de l'agent de contraste (greffage d'anticorps monoclonaux ou de peptides fonctionnalisés rendant l'agent de contraste « intelligent ») soit par une médiation cellulaire de contraste. Notre approche a consisté à marquer magnétiquement des lymphocytes périphériques et à les utiliser comme agents de contraste en IRM pour suivre l'infiltration tumorale.

Les objectifs spécifiques à cette étude ont été :

- de marquer des lymphocytes périphériques murins par des nanoparticules d'oxydes de fer tout en conservant la viabilité des cellules.
- de démontrer la faisabilité de ce système pour un diagnostic précoce de tumeurs dans un modèle murin.

Pour suivre en imagerie le recrutement de lymphocytes au niveau du site tumoral, il est nécessaire que les structures cellulaires apportées modifient le contraste des images obtenues. En IRM, deux classes principales d'agents de contraste peuvent être utilisées : les agents de contraste paramagnétiques (essentiellement aujourd'hui les chélates de Gadolinium) et les agents de contraste superparamagnétiques (SPIOs/USPIOs). Notre choix s'est porté sur l'utilisation des nanoparticules d'oxydes de fer superparamagnétiques principalement utilisées pour l'IRM cellulaire comme le montrent de nombreux travaux dans la littérature [8, 32, 178, 180, 215]. Avec ces agents de contraste utilisés avec des séquences pondérées T2 ou T2*, la sensibilité RM est meilleure qu'avec des agents de contraste paramagnétiques utilisés avec des séquences pondérées T1. Cependant, le gain de sensibilité obtenu avec les agents de contraste superparamagnétiques couplés aux

séquences adéquates pour de l'imagerie T2 ou T2* s'accompagne d'artéfacts de susceptibilité plus nombreux qu'en imagerie à contraste T1.

Pour mettre en place ce nouveau système de diagnostic, notre travail s'est articulé autour de 4 étapes principales :

- le choix des nanoparticules d'oxydes de fer pour le marquage des lymphocytes.
- le marquage de la lignée cellulaire BLCL utilisée comme modèle pour sélectionner le ou les types particuliers qui marquent le plus efficacement ces cellules (étape de « screening »).
- le marquage des lymphocytes périphériques murins.
- le suivi en IRM de l'infiltration tumorale des lymphocytes marqués.

Chacune de ces étapes mérite d'être discutée.

Choix des nanoparticules d'oxydes de fer :

Depuis plusieurs années, le laboratoire INSERM U646 s'est attaché à développer des nanoparticules d'oxydes de fer [228, 234, 235]. Parallèlement, dans la littérature, il a été montré que ces particules sont d'excellents agents de contraste IRM permettant la détection d'un grand nombre de cellules comprenant les macrophages endogènes [35], les cellules souches [98] et les lymphocytes T [41].

Quatre types de particules d'oxydes de fer superparamagnétiques de taille hydrodynamique inférieure à 50 nm, taille qui correspond à celle des USPIOs [151], ont été synthétisés au laboratoire. Il s'agit des particules HEDP, NTMBP, DPS1 et D10000. Nos particules se différencient entre elles par la nature des molécules qui les recouvrent : utilisation de composés bisphosphoniques pour les particules HEDP, NTMBP et DPS1 ; utilisation du dextran pour les particules D10000. Ces molécules de recouvrement leur apportent des propriétés de surface différentes (absence de charges pour les particules

D10000, charge positive de l'ammonium quaternaire et charges négatives du bisphosphonate pour les particules NTMBP, charges négatives du bisphosphonate pour les particules HEDP et DPS1).

L'intérêt d'utiliser des particules possédant des charges de surface différentes est d'étudier l'impact qu'auront ces charges sur le marquage cellulaire. Les particules chargées (HEDP, NTMBP et DPS1) devraient se fixer plus facilement à la membrane cellulaire grâce aux interactions électrostatiques et donc être plus facilement internalisées. Le pourcentage de marquage devrait donc être plus important avec ces particules qu'avec les particules neutres recouvertes de polymère (particules D10000).

Cette hypothèse est corroborée par certaines études de la littérature. Des particules portant à leur surface des charges négatives (particules anioniques AMNP) et présentant une bonne stabilité en suspension ont été décrites [236, 237, 238]. Ces particules anioniques montrent un haut degré de capture par différentes lignées cellulaires, capture qui est secondaire à l'accumulation électrostatique des particules sur la membrane [35]. Une plus grande capacité d'internalisation de ces particules comparée à celle de particules électriquement neutres pourrait s'expliquer par la présence de charges anioniques qui se fixeraient sur les sites cationiques présents au niveau de la membrane cellulaire [223]. Ces sites cationiques existent puisqu'il a été montré que de petits traceurs peptidiques portant des charges négatives peuvent marquer la membrane et être internalisés par voie d'endocytose [239]. De même, les complexes polycationiques comme les agents de transfection non viraux (Poly-L-Lysine, Poly-L-Arginine, lipofectamine...) s'incorporent avec efficacité dans pratiquement tous les types cellulaires, qu'ils soient phagocytaires ou non [186, 187, 188, 191, 215].

Ces études ont donc montré une capacité de marquage importante avec des composés possédant des charges. Ainsi, nous avons utilisé des particules d'oxydes de fer chargées

dans le but de marquer le plus efficacement possible les lymphocytes périphériques murins.

Marquage de la lignée cellulaire BLCL :

Le marquage des lymphocytes périphériques murins requiert tout d'abord une étape de prélèvement des cellules à partir du sang puis une étape d'incubation avec les nanoparticules d'oxydes de fer. Même si le prélèvement des lymphocytes périphériques murins est facile à mettre en place, plusieurs étapes de centrifugation et une étape de déplétion monocyttaire, allongeant le temps de l'expérimentation, sont nécessaires. C'est pourquoi, nous avons sélectionné, dans un premier temps, nos différents objets particuliers sur une lignée cellulaire modèle qui, contrairement aux lymphocytes périphériques murins, ne demande aucune préparation préalable. L'incubation avec les nanoparticules d'oxydes de fer peut donc être réalisée directement. Cette lignée appelée BLCL (B Lymphoblastoïd Cell Line) présente l'intérêt de se cultiver facilement dans un milieu de culture de base (RPMI 1640 / L-Glutamine) et prolifère rapidement (temps de doublement de 48h) [240, 241]. Le marquage des BLCL a donc permis de sélectionner rapidement les nanoparticules d'oxydes de fer qui marquent le plus efficacement les cellules tout en préservant bien sûr leur viabilité. Il s'agit de l'étape de « screening ».

Nous avons montré que, quelque soit le type particulière ajouté dans le milieu de culture, la viabilité des BLCL était la même par rapport aux cellules incubées sans particule. Le marquage avec ces particules d'oxydes de fer n'aurait donc aucune influence sur la viabilité et sur la fonctionnalité des cellules marquées (maintien de la fonction proliférative des BLCL malgré la présence de fer dans le milieu d'incubation). Ceci a été conforté par les travaux de P. Smirnov montrant qu'il n'y avait aucune différence de

sécrétion d'anticorps entre les hybridomes marqués par des particules d'oxydes de fer et les cellules contrôles [223].

Concernant l'efficacité de marquage, il apparaît que les particules NTMBP à la dose de 50 µg de fer / mL marquent préférentiellement les BLCL avec 80% de cellules marquées et une quantité de fer intracellulaire de 20 pg / cellule. Cette quantité de fer intracellulaire est proche de celle obtenue avec les particules HEDP mais le pourcentage de marquage avec ces particules reste insuffisant même en augmentant la concentration en fer dans le milieu d'incubation (3% de marquage à la dose de 50 µg de fer / mL et 8% à la dose de 100 µg de fer / mL). Seules les particules DPS1 à la dose de 100 µg de fer / mL ont une quantité de fer plus élevée par rapport aux particules NTMBP mais le pourcentage de cellules marquées reste lui aussi très insuffisant (2% de marquage). Les particules NTMBP sont donc les seules à pouvoir marquer de manière importante les BLCL sans compromettre leur fonction proliférative.

Une limite à l'utilisation des particules NTMBP est qu'elles s'agrègent et précipitent à fortes doses dans le milieu de culture (100 µg de fer / mL). Il a donc été impossible de travailler à de fortes doses de fer avec ces particules et d'accroître ainsi le pourcentage de marquage. L'agrégation des particules NTMBP à des doses élevées, liée au fait que la molécule de recouvrement se détache du noyau d'oxydes de fer, pourrait s'expliquer par la présence de forces de répulsion électrostatique entre les charges positives des groupements ammonium quaternaire très proches les uns des autres. Elle pourrait s'expliquer également par une instabilité du complexe particules/sérum causée par la diminution de la concentration sérique dans le milieu d'incubation. Ce phénomène d'agrégation concerne aussi les particules D10000 recouvertes de dextran. Contrairement aux particules NTMBP, les particules D10000 forment déjà des agrégats à faible dose de fer (25 µg / mL). L'agrégation de ces particules semble plus étrange puisque les particules

de nature polymérique sont généralement décrites comme stables, d'où leur commercialisation (Feridex[®]) [242].

Même si les particules NTMBP ne peuvent être utilisées qu'à des doses relativement peu élevées en raison des phénomènes d'agrégation observés à des doses supérieures, elles ont permis de marquer 4 cellules sur 5 sans modifier la fonction proliférative de la lignée. Ces particules possédant des charges positives à leur extrémité semblent donc avoir une bonne affinité pour les BLCL. Cependant, les autres particules chargées (HEDP et NTMBP), ne possédant que des charges négatives, ne marquent pas efficacement les cellules. Notre hypothèse de départ, basée sur le fait que les particules chargées négativement et positivement marqueraient plus efficacement les cellules par rapport aux particules neutres, n'est donc vérifiée que pour un type de particules, les NTMBP. Les interactions entre les charges positives de ces particules et les charges négatives des phospholipides membranaires seraient donc privilégiées.

Marquage des lymphocytes périphériques murins :

A l'issue du « screening » sur la lignée cellulaire BLCL, les particules NTMBP se sont montrées plus performantes par rapport aux autres types de particules. Nous avons donc continué à travailler avec ces particules, à la dose déterminée lors de l'étape précédente (50 µg de fer / mL), pour marquer les lymphocytes périphériques murins. Les lymphocytes T ont été choisis puisqu'ils interviennent dans les mécanismes spécifiques de défense immunitaire. En effet, d'autres effecteurs cellulaires du système immunitaire comme les monocytes/macrophages ou les lymphocytes B auraient pu être utilisés pour du ciblage tumoral dans la mesure où ces cellules interviennent également dans les mécanismes anti-tumoraux. Cependant, ces effecteurs ne sont pas capables de reconnaître spécifiquement les éléments du « non soi ». Les lymphocytes B participent aux réactions

de défense anti-tumorale en sécrétant les anticorps qui permettent de neutraliser l'élément étranger à l'organisme et facilitent ainsi son élimination (réponse humorale). Les monocytes/macrophages interviennent de manière non spécifique dans tous les processus inflammatoires en phagocytant les éléments du « non soi » et les débris cellulaires. Le ciblage de tumeurs passe donc par l'utilisation de lymphocytes T, cellules hautement spécialisées dans la reconnaissance des marqueurs tumoraux.

Dans le cadre d'une médiation cellulaire de contraste, la détection de tumeurs en IRM passe par le marquage des lymphocytes T. Cette étape reste un challenge puisque les lymphocytes ne sont pas connus pour leurs caractéristiques de phagocytose. Toutefois, le marquage des lymphocytes T est réalisable puisqu'il a déjà été décrit dans la littérature concernant des lymphocytes isolés chez l'animal à partir de la rate ou de ganglions lymphatiques [41, 42, 222]. Dans cette étude, nous avons privilégié l'utilisation de lymphocytes périphériques c'est-à-dire de lymphocytes isolés à partir du sang. L'avantage à travailler avec des lymphocytes périphériques réside dans le fait que la méthode d'obtention de ces cellules est non invasive et facile à mettre en place. A partir d'1 mL de sang, nous sommes arrivés à isoler 1 million de lymphocytes sans pour autant compromettre la viabilité de l'animal. Or, il est important de maintenir ce dernier en vie si une injection autologue des lymphocytes marqués veut être réalisée par la suite.

A la dose de 50 μg de fer / mL, les particules NTMBP ont permis de marquer 1 cellule / 4 et d'incorporer 20 pg de fer / cellule, après une période d'incubation de 18h. Cette quantité de fer intracellulaire est comparable à celle obtenue avec les BLCL mais nettement supérieure à celle trouvée dans des lymphocytes T de souris marqués avec des particules chargées (particules recouvertes de citrate) utilisées à la dose de 560 μg de fer / mL (10 mM) après 24h d'incubation (0,5 pg / cellule) [222]. En comparaison avec ces particules, les NTMBP issues du « screening » semblent donc avoir une bonne

efficacité de marquage puisqu'elles permettent d'incorporer dans les lymphocytes une quantité de fer importante.

Cependant, les lymphocytes périphériques mis en culture dans un milieu de base (RPMI 1640 / L-Glutamine) ont pu être fragilisés en absence de facteurs de croissance ou de chimiokines comme l'Interleukine-2 permettant de maintenir les cellules dans leur état fonctionnel. En effet, contrairement aux BLCL dont la viabilité est maintenue, les lymphocytes périphériques ont une viabilité diminuée de moitié en présence de particules NTMBP à la dose de 50 µg de fer / mL de milieu de culture. Ceci peut sembler normal puisqu'il s'agit d'une culture primaire mais pose le problème du nombre de cellules à injecter en autologue chez l'animal. En effet, Kircher et al. ont montré une baisse du signal RM au niveau d'une tumeur B16-OVA après injection chez la souris de 10 à 30 millions de clones CD8+ OT-1 marqués [41]. Afin d'obtenir un nombre de cellules à injecter comparable à celui-ci et afin d'améliorer les conditions de culture, nous avons activé de manière non spécifique (Concanavalline A / II-2) les lymphocytes périphériques que nous avons marqués ensuite avec les mêmes particules NTMBP.

En activant de manière non spécifique, le marquage a été amélioré puisque 2 lymphocytes / 4 ont été marqués et le nombre de cellules à injecter a été multiplié par 4 par rapport au nombre de cellules initialement disponibles. Cependant, la quantité de fer intracellulaire a diminué d'un facteur 4 par rapport à celle trouvée chez les lymphocytes naïfs. Ceci peut paraître surprenant dans la mesure où les lymphocytes activés ont un cytoplasme et un nombre de vésicules d'endocytose plus important par rapport aux cellules non activées [243]. Par ailleurs, la capacité d'endocytose serait fonction de la surface de la cellule [223, 35]. Les lymphocytes activés ayant une taille plus importante que les lymphocytes naïfs, la possibilité de fixation des particules à la surface de ces cellules devrait être plus grande et la capacité d'endocytose accrue.

Suivi en IRM de l'infiltration tumorale :

Nous venons de voir qu'il a été possible de marquer 50% des lymphocytes périphériques murins, après activation non spécifique, en utilisant les particules NTMBP à la dose de 50 µg de fer / mL et que le nombre de cellules a été multiplié par 4 passant ainsi à 4 millions de cellules / mL de sang. Ceci a permis d'injecter par voie intraveineuse entre 8 à 10 millions de cellules en autologue chez le rat Sprague Dawley femelle portant une tumeur C6 (modèle de gliome) en sous-cutané.

L'injection autologue par voie intraveineuse des lymphocytes activés et marqués n'a pas permis la détection en IRM d'une infiltration tumorale. Nous avons visualisé sur certaines images, 2 jours post-injection, des hyposignaux qui pourraient être identifiés à des cellules ayant infiltré la tumeur. En effet, les images in vitro de la tumeur, réalisées avec une haute résolution spatiale (70 µm isotrope), laissent apparaître de petits hyposignaux qui pourraient correspondre à des lymphocytes marqués mais l'hétérogénéité de la tumeur (foyers hémorragiques) rend la détection difficile.

Comme l'a montré P. Smirnov [42], les hyposignaux correspondant à des cellules marquées apparaissent sur les images réalisées en écho de gradient et disparaissent sur celles réalisées en écho de spin (isosignal). De cette façon, nous pouvons supposer que les petits hyposignaux mis en évidence sur les images en écho de gradient et absents sur les images en écho de spin sont des lymphocytes marqués alors que les hyposignaux toujours visibles sur les images en écho de spin sont des foyers hémorragiques. Une analyse par immunohistochimie devrait prochainement confirmer ou non la présence de lymphocytes marqués au niveau du site tumoral.

Le suivi in vivo du recrutement lymphocytaire au niveau de la tumeur a été infructueux puisque aucune diminution significative du signal RM n'a été observée sur les images post-injection. Ceci pourrait être dû au nombre encore insuffisant de lymphocytes

injectés chez l'animal. En effet, il a été montré que l'injection de 3 millions de cellules marquées permet de détecter une diminution du signal au niveau tumoral chez la souris dont le volume circulant est beaucoup plus faible que chez le rat [42]. Une autre hypothèse serait le manque de spécificité de nos vecteurs cellulaires envers la tumeur puisque le mode d'activation que nous avons choisi aboutit à la formation de clones lymphocytaires incapables de reconnaître spécifiquement les marqueurs tumoraux.

En conclusion, ce travail préliminaire a permis de marquer efficacement des lymphocytes périphériques murins tout en préservant la viabilité de ces derniers. 1 cellule / 2 a été marquée par les particules NTMBP après activation non spécifique des lymphocytes et la quantité de cellules à injecter est passée de 500 000 cellules / mL de sang initialement à 4 millions de cellules / mL de sang après activation. Cependant, l'infiltration tumorale des lymphocytes activés et marqués n'a pas fonctionné dans la mesure où aucune diminution significative du signal n'a été observée sur les images d'IRM.

Ces résultats ouvrent donc des perspectives intéressantes pour la suite du travail. Une voie probablement prometteuse, qui permettrait d'améliorer l'affinité entre les lymphocytes et la tumeur, consisterait à mettre en place un protocole de vaccination. L'injection chez l'animal de cellules tumorales irradiées va activer le système immunitaire et les lymphocytes impliqués dans les mécanismes anti-tumoraux vont apprendre à reconnaître les antigènes spécifiques à la tumeur. L'irradiation va permettre d'inactiver les cellules tumorales tout en préservant les antigènes de surface. Ainsi, des clones de lymphocytes mémoires capables de reconnaître spécifiquement la tumeur vont être formés. Une fois prélevés et marqués in vitro, ils pourraient être réinjectés chez l'animal non vacciné porteur de la tumeur en question. Ceci nécessiterait bien sûr l'utilisation

d'animaux consanguins afin d'éviter tout phénomène de rejet. Une autre méthode plus « artificielle » consisterait à prélever les lymphocytes périphériques chez le rat portant une tumeur puis de les mettre en contact, in vitro, avec les cellules tumorales préalablement irradiées. Les clones lymphocytaires adaptés à un ciblage spécifique de la tumeur seraient ensuite réinjectés en autologue, après marquage. La suite de mon travail pourrait donc consister à mettre en place ces systèmes d'activation spécifique des lymphocytes périphériques murins dans le but d'amener, avec une efficacité plus importante, les cellules marquées vers la cible tumorale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

¹ **Tratner I.**, De l'efficacité de la politique de prévention et de dépistage dans la lutte contre le cancer. *Med Sci.* 2003 ; **3** : 1-5.

² **Rapport de l'OMS**, La fréquence des cancers pourrait augmenter de 50% dans le monde, avec 15 millions de nouveaux cas par an en 2020. 3 avril 2003, Genève.

³ **Ito A. et al.**, Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *Jour of Biosci and Bioengin.* 2005 ; **100** : 1-11.

⁴ **Artemov D. et al.**, Magnetic resonance molecular imaging of the HER-2/neu receptor. *Cancer Res.* 2003 ; **63** : 2723-27.

⁵ **Bulte JW. et al.**, Specific MR imaging of human lymphocytes by monoclonal antibody-guided dextran-magnetite particles. *Magn Reson Med.* 1992 ; **25** : 148-57.

⁶ **Artemov D. et al.**, Molecular magnetic resonance imaging with targeted contrast agents. *Jour of Cell Biochem.* 2003 ; **90** : 518-24.

⁷ **Suzuki M. et al.**, Development of a target-directed magnetic resonance contrast agent using monoclonal antibody-conjugated magnetic particles. *Brain Tumor Pathol.* 1996 ; **13** : 127-32.

⁸ **Bulte JWM. et Kraitchman DL.**, Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. *NMR in Biomed.* 2004 ; **17** : 484-99.

⁹ **Dutton AH. et al.**, Iron-dextran antibody conjugates : general method for simultaneous staining of two components in high-resolution immunoelectron microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979 ; **76** : 3392-96.

¹⁰ **Sanderson CJ. et Wilson DV.**, A simple method for coupling proteins to insoluble polysaccharides. *Immunol.* 1971 ; **20** : 1061-65.

¹¹ **Renshaw PF. et al.**, Immunospecific NMR contrast agents. *Magn Reson Imag.* 1986 ; **4** : 351-57.

¹² **Cerdan S. et al.**, Monoclonal antibody-coated magnetite particles as contrast agents in magnetic resonance imaging of tumors. *Magn Reson Med.* 1989 ; **12** : 151-63.

¹³ **Suwa T. et al.**, Magnetic resonance imaging of esophageal squamous cell carcinoma using magnetite particles coated with anti-epidermal growth factor receptor antibody. *Int J Cancer.* 1998 ; **75** : 626-34.

¹⁴ **Tiefenauer LX. et al.**, Antibody-magnetite nanoparticles : in vitro characterization of a potential tumor-specific contrast agent for magnetic resonance imaging. *Bioconjug Chem.* 1993 ; **4** : 347-52.

¹⁵ **Tiefenauer LX. et al.**, In vivo evaluation of magnetite nanoparticles for use as a tumor contrast agent in MRI. *Magn Reson Imaging.* 1996 ; **14** : 391-402.

¹⁶ **Toma A. et al.**, Monoclonal antibody A7-superparamagnetic iron oxide as contrast agent of MR imaging of rectal carcinoma. *Br J Cancer.* 2005 ; **93** : 131-6.

-
- ¹⁷ **Huh YM. et al.**, In vivo magnetic resonance detection of cancer by using multifunctional magnetic nanocrystals. *J Am Chem Soc.* 2005 ; **127** : 12387-91.
- ¹⁸ **Remsen LG. et al.**, MR of carcinoma-specific monoclonal antibody conjugated to monocrySTALLINE iron oxide nanoparticles : the potential for non-invasive diagnosis. *Am J Neuroradiol.* 1996 ; **17** : 411-18.
- ¹⁹ **Reimer P. et al.**, Pancreatic receptors : initial feasibility studies with a targeted contrast agent for MR imaging. *Radiol.* 1994 ; **193** : 527-31.
- ²⁰ **Shen TT. et al.**, Magnetically labeled secretin retains receptor affinity to pancreas acinar cells. *Bioconjug Chem.* 1996 ; **7** : 311-16.
- ²¹ **Ichikawa T. et al.**, MRI of transgene expression : correlation to therapeutic gene expression. *Neoplasia.* 2002 ; **4** : 523-30.
- ²² **Moore A. et al.**, Measuring transferring receptor gene expression by NMR imaging. *Biochim Biophys Acta.* 1998 ; **1402** : 239-49.
- ²³ **Weissleder R. et al.**, In vivo magnetic resonance imaging of transgene expression. *Nat Med.* 2000 ; **6** : 351-55.
- ²⁴ **Kresse M. et al.**, Targeting of ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) particles to tumor cells in vivo by using transferrine receptor pathways. *Magn Reson Med.* 1998 ; **40** : 236-42.
- ²⁵ **Zhao M. et al.**, Non-invasive detection of apoptosis using magnetic resonance imaging and a targeted contrast agent. *Nat Med.* 2001 ; **7** : 1241-44.
- ²⁶ **Blieden TM. et al.**, Mechanism of cytolytic T lymphocyte killing of a low class I-expressing tumor. *The Jour of Immunol.* 1991 ; **147** : 1433-38.
- ²⁷ **Hiraoka K. et al.**, Concurrent infiltration by CD8+ T cells and CD4+ T cells is a favourable prognostic factor in non-small-cell lung carcinoma. *Brit Jour of Cancer.* 2006 ; **94** : 275-80.
- ²⁸ **Naito Y. et al.**, CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998 ; **58** : 3491-94.
- ²⁹ **Nakano O. et al.**, Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma : clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer Res.* 2001 ; **61** : 5132-36.
- ³⁰ **Schumacher K. et al.**, Prognostic significance of activated CD8(+) T cell infiltrations within esophageal carcinomas. *Cancer Res.* 2001 ; **61** : 3932-36.
- ³¹ **Oshikiri T. et al.**, Prognostic value of intratumoral CD8+ T lymphocyte in extrahepatic bile duct carcinoma as essential immune response. *J Surg Oncol.* 2003 ; **84** : 224-228.

-
- ³² **Yeh TC. et al.**, In vivo dynamic MRI tracking of rat T-cells labelled with superparamagnetic iron-oxide particles. *Magn Reson Med.* 1995 ; **33** : 200-8.
- ³³ **Yeh TC. et al.**, Intracellular labeling of T-cells with superparamagnetic contrast agents. *Magn Reson Med.* 1993 ; **30** : 617-25.
- ³⁴ **Billotey C. et al.**, T-cell homing to the pancreas in autoimmune mouse models of diabetes : in vivo MR imaging. *Radiol.* 2005 ; **236** : 579-87.
- ³⁵ **Wilhelm C. et al.**, Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. *Biomater.* 2003 ; **24** : 1001-11.
- ³⁶ **Vives E. et al.**, A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem.* 1997 ; **272** : 16010-17.
- ³⁷ **Mischiati C. et al.**, Extracellular HIV-1 Tat protein differentially activates the JNK and ERK/MAPK pathways in CD4 T cells. *Aids.* 1999 ; **13** : 1637-45.
- ³⁸ **Rusnati M. et al.**, Thrombospondin-1 / HIV-1 tat protein interaction : modulation of the biological activity of extracellular Tat [In Process Citation]. *FASEB J.* 2000 ; **14** : 1917-30.
- ³⁹ **Josephson L. et al.**, High-efficiency intracellular magnetic labeling with novel superparamagnetic Tat peptide conjugates. *Bioconjug Chem.* 1999 ; **10** : 186-91.
- ⁴⁰ **Berger C. et al.**, Feasibility and limits of magnetically labeling primary cultured rat T cells with ferumoxides coupled with commonly used transfection agents. *Mol Imaging.* 2006 ; **5** : 93-104.
- ⁴¹ **Kircher MF. et al.**, In vivo high resolution three-dimensional imaging of antigen-specific cytotoxic T-lymphocyte trafficking to tumors. *Cancer Res.* 2003 ; **63** : 6838-46.
- ⁴² **Smirnov P. et al.**, In vivo cellular imaging of lymphocyte trafficking by MRI : a tumor model approach to cell-based anticancer therapy. *Magn Reson Med.* 2006 ; **56** : 498-508.
- ⁴³ **Mowat P. et al.**, Evaluating SPIO-labelled cell MR-efficiency by 3D quantitative T2* MRI. *NMR in Biomed.* 2007 ; **20** : 21-27.
- ⁴⁴ **Walker PR. et al.**, T-cell immune responses in the brain and their relevance for cerebral malignancies. *Brain Res Rev.* 2003 ; **42** : 97-122.
- ⁴⁵ **Kagi D. et al.**, Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science.* 1994 ; **265** : 528-30.
- ⁴⁶ **Atkinson E. et Bleackley RC.**, Mechanisms of lysis by cytotoxic T cells. *Crit Rev Immunol.* 1995 ; **15** : 359-84.
- ⁴⁷ **Thomas L.**, Discussion. In cellular and humoral aspects of the hypersensitive states. Ed. HS Lawrence. 1959 ; 529-32.

-
- ⁴⁸ **Burnet FM.**, The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res.* 1970 ; **13** : 1-27.
- ⁴⁹ **Burnet FM.**, Immunological surveillance in neoplasia. *Transplant Rev.* 1971 ; **7** : 3-25.
- ⁵⁰ **Burnet FM.**, Immunological factors in the process of carcinogenesis. *Br Med Bull.* 1964 ; **20** : 154-58.
- ⁵¹ **Dighe AS. et al.**, Enhanced in vivo growth resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN γ receptors. *Immunity.* 1994 ; **1** : 447-56.
- ⁵² **Kaplan DH. et al.**, Demonstration of an interferon γ -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998 ; **95** : 7556-61.
- ⁵³ **Van den Broek MF. et al.**, Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J Exp Med.* 1996 ; **184** : 1781-90.
- ⁵⁴ **Smyth MJ. et al.**, Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med.* 2000 ; **192** : 755-60.
- ⁵⁵ **Dunn GP. et al.**, The three Es of cancer immunoediting. *An Rev of Immunol.* 2004 ; **22** : 329-60.
- ⁵⁶ **Doherty PC. et al.**, Immunological surveillance of tumors in the context of major histocompatibility complex restriction of T cell function. *Adv Cancer Res.* 1984 ; **42** : 1-65.
- ⁵⁷ **Bonn T. et Van Pel A.**, Teratocarcinoma cell variants rejected by syngeneic mice : protection of mice immunized with these variants against other variants and against the original malignant cell line. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1978 ; **75** : 1519-23.
- ⁵⁸ **Houghton AN.**, Cancer antigens : immune recognition of self and altered self. *J Exp Med.* 1994 ; **180** : 1-4.
- ⁵⁹ **Bonn T. et al.**, Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol.* 1994 ; **12** : 337-65.
- ⁶⁰ **Nguyen van Binh P. et Duc HT.**, Analyses and perspectives in cancer immunotherapy. *Biomed and Pharmacol.* 2006 ; **60** : 621-28.
- ⁶¹ **Kass E. et al.**, Induction of protective host immunity to carcinoembryonic antigen (CEA), a self-antigen in CEA transgenic mice, by immunizing with a recombinant vaccinia-CEA virus. *Cancer Res.* 1999 ; **59** : 676-83.
- ⁶² **Schmitz J. et al.**, Identification of an interferon-gamma-inducible carcinoembryonic antigen (CEA) CD8(+) T-cell epitope, which mediates tumor killing in CEA transgenic mice. *Cancer Res.* 2002 ; **62** : 5058-64.
- ⁶³ **Vollmer CM. et al.**, Alpha-fetoprotein –specific genetic immunotherapy for hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 1999 ; **59** : 3064-7.
- ⁶⁴ **Butterfield LH. et al.**, T cell responses to HLA-A *0201-restricted peptides derived from human alpha fetoprotein. *J Immunol.* 2001 ; **166** : 5300-8.

-
- ⁶⁵ **Ionnides CG. et al.**, Cytotoxic T cells isolated from ovarian malignant ascites recognize a peptide derived from the HER-2/neu proto-oncogen. *Cell Immunol.* 1993 ; **151** : 225-34.
- ⁶⁶ **Vissers JL. et al.**, The renal cell carcinoma-associated antigen G250 encodes a human leukocyte antigen (HLA)-A2.1 –restricted epitope recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res.* 1999 ; **59** : 5554-9.
- ⁶⁷ **Ho SB. et al.**, Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res.* 1993 ; **53** : 641-51.
- ⁶⁸ **Coggin Jr. JH. et al.**, 37 kDa oncofetal antigen and immature laminin receptor protein are identical, shared, universal auto-immunogenic proteins on primary rodent and human cancers. *Anticancer Res.* 1999 ; **19** : 5535-42.
- ⁶⁹ **Kawakami Y. et al.**, Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994 ; **91** : 3515-9.
- ⁷⁰ **Kawakami Y. et al.**, Identification of a human melanoma antigen recognized by tumor-infiltrating lymphocytes associated with in vivo tumor rejection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994 ; **91** : 6458-62.
- ⁷¹ **Van Den Eynde B. et al.**, A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J Exp Med.* 1995 ; **182** : 689-98.
- ⁷² **Robbins PF. et al.**, A mutated β catenin gene encodes a melanoma specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med.* 1996 ; **183** : 1185-92.
- ⁷³ **Mandrizzato S. et al.**, A CASP-8 mutation recognized by cytolytic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma. *J Exp Med.* 1997 ; **186** : 785-93.
- ⁷⁴ **Theobald M. et al.**, Targeting p53 as a general tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995 ; **92** : 11993-7.
- ⁷⁵ **Girardi M et al.**, Regulation of cutaneous malignancy by $\gamma\delta$ T cells. *Science.* 2001 ; **294** : 605-9.
- ⁷⁶ **Smyth MJ. et al.**, NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *Int Immunol.* 2001 ; **13** : 459-63.
- ⁷⁷ **Wang RF. et Rosenberg SA**, Human tumor antigens for cancer vaccine development. *Immunol Rev.* 1999 ; **170** : 85-100.
- ⁷⁸ **Jotereau F. et al.**, L'immunothérapie passive du mélanome. *Bulletin du cancer.* 2003 ; **90** : 583-6.
- ⁷⁹ **Rosenberg SA. et al.**, A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N Engl J Med.* 1987 ; **316** : 889-97.

-
- ⁸⁰ **Mihm MC. et al.**, The clinical diagnosis, classification and histogenetic concepts of the early stages of cutaneous malignant melanomas. *N Engl J Med.* 1971 ; **284** : 1078-82.
- ⁸¹ **Palma L et al.**, Lymphocytic infiltrates in primary glioblastomas and recidivous gliomas. Incidence, fate, and relevance to prognosis in 228 operated cases. *J Neurosurg.* 1978 ; **49** : 854-61.
- ⁸² **Kreider JW. et al.**, Relationship of tumor leucocytic infiltration to host defense mechanisms and prognosis. *Cancer Metastasis Rev.* 1984 ; **3** : 53-74.
- ⁸³ **Platsoucas CD.**, Human autologous tumor-specific T cells in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 1991 ; **10** : 151-76.
- ⁸⁴ **Herin M. et al.**, Production of stable cytolytic T-cell clones directed against autologous human melanoma. *Int J Cancer.* 1987 ; **39** : 390-6.
- ⁸⁵ **Anichini A. et al.**, Cytotoxic T lymphocyte clone from peripheral blood and from tumor site detect intratumor heterogeneity of melanoma cells. Analysis of specificity and mechanisms of interaction. *J Immunol.* 1989 ; **142** : 3692-701.
- ⁸⁶ **Miyatake S. et al.**, Specific cytotoxic activity of T-lymphocyte clones derived from a patient with gliosarcoma. *J Neurosurg.* 1988 ; **69** : 751-9.
- ⁸⁷ **Sawamura Y. et al.**, Isolation and in vitro growth of glioma-infiltrating lymphocytes, and an analysis of their surface phenotypes. *J Neurosurg.* 1988 ; **69** : 745-50.
- ⁸⁸ **Sawamura Y. et al.**, Antitumor activity and surface phenotypes of human glioma-infiltrating lymphocytes after in vitro expansion in the presence of interleukin 2. *Cancer Res.* 1989 ; **49** : 1843-9.
- ⁸⁹ **Quattrocchi KB. et al.**, Pilot study of local autologous tumor infiltrating lymphocytes for the treatment of recurrent malignant gliomas. *J Neurooncol.* 1999 ; **45** : 141-57.
- ⁹⁰ **Dudley ME. et Rosenberg SA.**, Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003 ; **3** : 666-75.
- ⁹¹ **Tuting T. et al.**, Autologous human monocyte-derived dendritic cells genetically modified to express melanoma antigens elicit primary cytotoxic T cell responses in vitro : enhancement by cotransfection of genes encoding the Th1-biasing cytokines IL-12 and IFN- α . *J Immunol.* 1998 ; **160** : 1139-47.
- ⁹² **Chen Y. et al.**, Living T9 glioma cells expressing membrane macrophage colony-stimulating factor produce immediate tumor destruction by polymorphonuclear leukocytes and macrophages via a "paraptosis"-induced pathway that promotes systemic immunity against intracranial T9 gliomas. *Blood.* 2002 ; **100** : 1373-80.
- ⁹³ **Paul DB. et al.**, Gamma interferon transduced 9L gliosarcoma. Gene therapy and its relevance to cellular therapy with alloreactive cytotoxic T lymphocytes. *J Neurooncol.* 2003 ; **64** : 89-99.
- ⁹⁴ **Dove A.**, Cell-based therapies go live. *Nat Biotechnol.* 2002 ; **20** : 339-343.

-
- ⁹⁵ **Gengxu H. et al.**, In vivo imaging of bone marrow mesenchymal stem cells transplanted into myocardium using magnetic resonance imaging : a novel method to trace the transplanted cells. *Int Jour Card.* 2007 ; **114** : 4-10.
- ⁹⁶ **Sykova E. et al.**, Magnetic resonance tracking of implanted adult and embryonic stem cells in injured brain and spinal cord. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 ; **1049** : 146-60.
- ⁹⁷ **Hoehn M. et al.**, 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 USA.* 2002 ; **99** : 16267-72.
- ⁹⁸ **Kraitchman DL. et al.**, In vivo magnetic resonance imaging of injected mesenchymal stem cells in myocardial infarction. *Circulation.* 2003 ; **107** : 2290-3.
- ⁹⁹ **Hill JM. et al.**, Serial cardiac magnetic resonance imaging of injected mesenchymal stem cells. *Circulation.* 2003 ; **108** : 1009-14.
- ¹⁰⁰ **Bulte JW. et al.**, Neurotransplantation of magnetically labelled oligodendrocyte progenitors : magnetic resonance tracking of cell migration and myelination. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999 ; **96** : 15256-261.
- ¹⁰¹ **Bulte JW. et al.**, Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells. *Nat Biotechnol.* 2001 ; **19** : 1141-47.
- ¹⁰² **Lepore AC. et al.**, MR imaging of lineage-restricted neural precursors following transplantation into the adult spinal cord. *Exp Neurol.* 2006 ; **201** : 49-59.
- ¹⁰³ **Harrower TP. et al.**, Long-term survival and integration of porcine expanded neural precursor cell grafts in a rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2006 ; **197** : 56-69.
- ¹⁰⁴ **Taylor A. et Minger SL.**, Regenerative medicine in Parkinson's disease : generation of mesencephalic dopaminergic cells from embryonic stem cells. *Curr Opi in Biotech.* 2005 ; **16** : 487-492.
- ¹⁰⁵ **Mohapel P. et Brundin P.**, Harnessing endogenous stem cells to treat neurodegenerative disorders of the basal ganglia. *Park and Relat Disor.* 2004 ; **10** : 259-64.
- ¹⁰⁶ **Tomita S. et al.**, Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2002 ; **123** : 1132-40.
- ¹⁰⁷ **Yau TM. et al.**, Beneficial effect of autologous cell transplantation on infarcted heart function : comparison between bone marrow stromal cells and heart cells. *Ann Thorac Surg.* 2003 ; **75** : 169-177.
- ¹⁰⁸ **Min JY. et al.**, Significant improvement of heart function by cotransplantation of human mesenchymal stem cells and fetal cardiomyocytes in postinfarcted pigs. *Ann Thorac Surg.* 2002 ; **74** : 1568-75.

-
- ¹⁰⁹ **Baumjohann D. et Lutz MB.**, Non-invasive imaging of dendritic cell migration in vivo. *Immunobiol.* 2006 ; **211** : 587-97.
- ¹¹⁰ **Marten K. et Hansell DM.**, Imaging of macrophage-related lung diseases. *Eur Radiol.* 2005 ; **15** : 727-41.
- ¹¹¹ **Stoll G. et al.**, In vivo monitoring of macrophage infiltration in experimental autoimmune neuritis by magnetic resonance imaging. *Jour of Neuroimmunol.* 2004 ; **149** : 142-46.
- ¹¹² **Kim YJ. et al.**, Multimodality imaging of lymphocytic migration using lentiviral-based transduction of a tri-fusion reporter gene. *Mol Imag and Biol.* 2004 ; **6** : 331-40.
- ¹¹³ **Bennink RJ. et al.**, Imaging of intestinal lymphocyte homing by means of pinhole SPECT in a TNBS colitis mouse model. *Nucl Med and Biol.* 2004 ; **31** : 93-101.
- ¹¹⁴ **Cahalan MD. et al.**, Real-time imaging of lymphocytes in vivo. *Cur Opi in Immunol.* 2003 ; **15** : 372-7.
- ¹¹⁵ **Hardy J. et al.**, Bioluminescence imaging of lymphocyte trafficking in vivo. *Exp Hemato.* 2001 ; **29** : 1353-1360.
- ¹¹⁶ **Dodd CH. et al.**, Normal T-cell response and in vivo magnetic resonance imaging of T cells loaded with HIV transactivator-peptide-derived superparamagnetic nanoparticles. *Jour of Immunol Met.* 2001 ; **256** : 89-105.
- ¹¹⁷ **Letvin NL. et al.**, Use of radiolabeled monoclonal anti-B1 antibody for B lymphocyte imaging in rhesus monkeys. *Int Jour of Rad Appli and Inst. Part B. Nucl Med and Biol.* 1987 ; **14** : 99-105.
- ¹¹⁸ **Igarashi T. et al.**, Enhanced cytotoxicity of allogeneic NK cells with killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility against melanoma and renal cell carcinoma cells. *Blood.* 2004 ; **104** : 170-17.
- ¹¹⁹ **Min JJ. et al.**, In vivo bioluminescence imaging of cord blood derived mesenchymal stem cell transplantation into rat myocardium. *Ann Nucl Med.* 2006 ; **20** : 165-70.
- ¹²⁰ **Winnard PT. et al.**, Non invasive optical tracking of red fluorescent protein-expressing cancer cells in a model of metastatic breast cancer. *Neoplas.* 2006 ; **8** : 796-806.
- ¹²¹ **Pittet MJ. et al.**, Labeling of immune cells for in vivo imaging using magnetofluorescent nanoparticles. *Nat Protoc.* 2006 ; **1** : 73-9.
- ¹²² **Ito S. et al.**, Real-time observation of micrometastasis formation in the living mouse liver using a green fluorescent protein gene-tagged rat tongue carcinoma cell line. *Int J Cancer.* 2001 ; **93** : 212-7.
- ¹²³ **Allport JR et Weissleder R.**, In vivo imaging of gene and cell therapies. *Exp Hematol.* 2001 ; **29** : 1237-46.

-
- ¹²⁴ **Ntziachristos V. et al.**, Concurrent MRI and diffuse optical tomography of breast after indocyanine green enhancement. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000 ; **97** : 2767-72.
- ¹²⁵ **Folli S. et al.**, Antibody-indocyanin conjugates for immunophotodetection of human squamous cell carcinoma in nude mice. *Cancer Res*. 1994 ; **54** : 2643-9.
- ¹²⁶ **Mahmood U. et al.**, Near-infrared optical imaging of protease activity for tumor detection. *Radiology*. 1999 ; **213** : 866-70.
- ¹²⁷ **Korlach J. et al.**, Characterization of lipid bilayer phases by confocal microscopy and fluorescence correlation spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999 ; **96** : 8461-6.
- ¹²⁸ **Rajadhyaksha M. et al.**, In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin : melanin provides strong contrast. *J Invest Dermatol*. 1995 ; **104** : 946-52.
- ¹²⁹ **Gonzalez S. et al.**, Characterization of psoriasis in vivo by reflectance confocal microscopy. *J Med*. 1999 ; **30** : 337-56.
- ¹³⁰ **Buehler C. et al.**, Innovations in two-photon deep tissue microscopy. *IEEE Eng Med Biol Mag*. 1999 ; **18** : 23-30.
- ¹³¹ **So PT. et al.**, New time-resolved techniques in two-photon microscopy. *Cell Mol Biol*. 1998 ; **44** : 771-93.
- ¹³² **Masters BR. et al.**, Multiphoton excitation fluorescence microscopy and spectroscopy of in vivo human skin. *Biophys J*. 1997 ; **72** : 2405-12.
- ¹³³ **Dellian M. et al.**, Vascular permeability in a human tumour xenograft : molecular charge dependence. *Br J Cancer*. 2000 ; **82** : 1513-8.
- ¹³⁴ **Monsky WL. et al.**, Augmentation of transvascular transport of macromolecules and nanoparticles in tumors using vascular endothelial growth factor. *Cancer Res*. 1999 ; **59** : 4129-35.
- ¹³⁵ **Vaylet F. et al.**, Intérêt de la tomographie à émission de positons au ¹⁸fluoro-déoxy-glucose dans la définition des champs de radiothérapie : exemple de la radiothérapie thoracique. *Cancer Radiother*. 2001 ; **5** : 685-90.
- ¹³⁶ **Rigo P. et al.**, Indications cliniques de la tomographie par émission de positons à la localisation « PRE » ¹⁸FDG en oncologie. Expérience préliminaire et revue de la littérature. *Med Nucl IFM*. 1995 ; **19** : 73-89.
- ¹³⁷ **Strauss LG. et al.**, The applications of PET in clinical oncology. *J Nucl Med*. 1991 ; **32** : 623-48.
- ¹³⁸ **Chatziioannou AF. et al.**, Performance evaluation of microPET : a high-resolution lutetium oxyorthosilicate PET scanner for animal imaging. *J Nucl Med*. 1999 ; **40** : 1164-75.
- ¹³⁹ **Ishizu K. et al.**, Ultra-high resolution SPECT system using four pinhole collimators for small animal studies. *J Nucl Med*. 1995 ; **36** : 2282-7.

-
- ¹⁴⁰ **Weber DA. et al.**, Pinhole SPECT : an approach to in vivo high resolution SPECT imaging in small laboratory animals. *J Nucl Med.* 1994 ; **35** : 342-8.
- ¹⁴¹ **Strand SE. et al.**, Small animal imaging with pinhole single-photon emission computed tomography. *Cancer.* 1994 ; **73** : 981-4.
- ¹⁴² **Pozzilli P. et al.**, Tracking of indium-111-oxine labelled lymphocytes in autoimmune thyroid disease. *Clin Endocrinol.* 1983 ; **19** : 111-6.
- ¹⁴³ **Kikkawa H. et al.**, Usefulness of positron emission tomographic visualization for examination of in vivo susceptibility to metastasis. *Cancer.* 2000 ; **89** : 1626-33.
- ¹⁴⁴ **Koike C. et al.**, Tumor cells with organ-specific metastatic ability show distinctive trafficking in vivo : analyses by positron emission tomography and bioimaging. *Cancer Res.* 1997 ; **57** : 3612-9.
- ¹⁴⁵ **Oku N. et al.**, Positron emission tomography analysis of metastatic tumor cell trafficking. *Cancer Res.* 1994 ; **54** : 2573-6.
- ¹⁴⁶ **Nasu K. et al.**, Vascular suppression technique in MRI using Gd-DTPA : improving image quality of MR myelography. *J Comput Assist Tomogr.* 1999 ; **23** : 346-50.
- ¹⁴⁷ **Chambon C. et al.**, Superparamagnetic iron oxides as positive MR contrast agents : in vitro and in vivo evidence. *Magn Reson Imaging.* 1993 ; **11** : 509-19.
- ¹⁴⁸ **Canet E. et al.**, Superparamagnetic iron oxide particles and positive enhancement for myocardial perfusion studies assessed by subsecond T1-weighted MRI. *Magn Reson Imaging.* 1993 ; **11** : 1139-45.
- ¹⁴⁹ **Cerdan S. et al.**, Monoclonal antibody-coated magnetite particles as contrast agents in magnetic resonance imaging of tumors. *Magn Reson Med.* 1989 ; **12** : 151-63.
- ¹⁵⁰ **Weissleder R. et al.**, Superparamagnetic iron oxide : pharmacokinetics and toxicity. *Am Jour Radio.* 1989 ; **152** : 167-73.
- ¹⁵¹ **Weissleder R. et al.**, Ultrasmall superparamagnetic iron oxide : characterization of a new class of contrast agents for MR imaging. *Radiology.* 1990 ; **175** : 489-93.
- ¹⁵² **Wang YX. et al.**, Superparamagnetic iron oxide contrast agents : physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *Eur Radiol.* 2001 ; **11** : 2319-31.
- ¹⁵³ **Sundstrom JB. et al.**, Magnetic resonance imaging of activated proliferating Rhesus macaque T cells labeled with superparamagnetic monocrystalline iron oxide nanoparticles. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2004 ; **35** : 9-21.
- ¹⁵⁴ **Reimer P. et Tombach B.**, Hepatic MRI with SPIO detection and characterization of focal liver lesions. *Eur Radiol.* 1998 ; **8** : 1198-1204.
- ¹⁵⁵ **Clement O. et Luciani A.**, Imaging the lymphatic system possibilities and clinical applications. *Eur Radiol.* 1998 ; **8** : 1198-1204.

-
- ¹⁵⁶ **Harisinghani MG. et al.**, Noninvasive detection of clinically occult lymphnode metastases in prostate cancer. *N Engl J Med.* 2003 ; **348** : 2491-99.
- ¹⁵⁷ **Wagner S. et al.**, Monomer-coated very small superparamagnetic iron oxide particles as contrast medium for magnetic resonance imaging : preclinical in vivo characterization. *Invest Radiol.* 2002 ; **37** : 167-77.
- ¹⁵⁸ **Taylor AM. et al.**, Safety and preliminary findings with the intravascular contrast agent NC100150 injection for MR coronary angiography. *J Magn Reson Imaging.* 1999 ; **9** : 220-7.
- ¹⁵⁹ **Tombach B. et al.**, First-pass and equilibrium-MRA of the aortoiliac region with a superparamagnetic iron oxide blood pool MR contrast agent SHU555C results of a human pilot study. *NRM Biomed.* 2004 ; **17** : 500-6.
- ¹⁶⁰ **Corot C. et al.**, Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006 ; **58** : 1471-1504.
- ¹⁶¹ **Karabulut N. et Elmas N.**, Contrast agents used in MR imaging of the liver. *Abd Imaging.* 2006 ; **12** : 22-30.
- ¹⁶² **Mendonca Dias MH. et Lauterbur PC.**, Ferromagnetic particles as contrast agents for magnetic resonance imaging of liver and spleen. *Magn Reson Med.* 1986 ; **3** : 328-30.
- ¹⁶³ **Olsson M. et al.**, Ferromagnetic particles as contrast agents in T2 NMR imaging. *Magn Reson Imaging.* 1986 ; **4** : 437-440.
- ¹⁶⁴ **Renshaw PF. et al.**, Ferromagnetic contrast agents : a new approach. *Magn Reson Med.* 1986 ; **3** : 217-25.
- ¹⁶⁵ **Wolf GL. et al.**, *Magnetic Resonance Annual*, Kressel H (ed.). Raven Press : New York. 1985 ; 231-66.
- ¹⁶⁶ **Zheng Q. et al.**, A new class of macrocyclic lanthanide complexes for cell labeling and magnetic resonance imaging applications. *J Am Chem Soc.* 2005 ; **127** : 16178-88.
- ¹⁶⁷ **Poeckler-Schoeniger C. et al.**, MRI with superparamagnetic iron oxide : efficacy in the detection and characterization of focal hepatic lesions. *Magn Reson Imaging.* 1999 ; **17** : 383-92.
- ¹⁶⁸ **Harisinghani MG. et al.**, Non-invasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer. *New Engl J Med.* 2003 ; **348** : 2491-9.
- ¹⁶⁹ **Weissleder R. et al.**, Ultrasmall superparamagnetic iron oxide : an intravenous contrast agent for assessing lymph nodes with MR imaging. *Radiology.* 1990 ; **175** : 494-8.
- ¹⁷⁰ **Seneterre E. et al.**, Bone marrow : ultrasmall superparamagnetic iron oxide for MR imaging. *Radiology.* 1991 ; **179** : 529-33.

-
- ¹⁷¹ **Xu S. et al.**, Study of relapsing remitting experimental allergic encephalomyelitis SJL mouse model using MION-46L enhanced in vivo MRI : early histopathological correlation. *J Neurosci Res.* 1998 ; **52** : 549-58.
- ¹⁷² **Dousset V. et al.**, Comparison of ultrasmall particles of iron oxide (USPIO)-enhanced T2-weighted, conventional T2-weighted, and gadolinium-enhanced T1-weighted MR images in rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Neuroradiol.* 1999 ; **20** : 223-7.
- ¹⁷³ **Dousset V. et al.**, In vivo macrophage activity imaging in the central nervous system detected by magnetic resonance. *Magn Reson Med.* 1999 ; **41** : 329-33.
- ¹⁷⁴ **Rausch M. et al.**, MRI-based monitoring of inflammation and tissue damage in acute and chronic relapsing EAE. *Magn Reson Med.* 2003 ; **50** : 309-14.
- ¹⁷⁵ **Sipe JC. et al.**, Method for intracellular magnetic labelling of human mononuclear cells using approved iron contrast agents. *Magn Reson Imaging.* 1999 ; **17** : 1521-3.
- ¹⁷⁶ **Zelivyanskaya ML. et al.**, Tracking superparamagnetic iron oxide labeled monocytes in brain by high-field magnetic resonance imaging. *J Neurosci Res.* 2003 ; **73** : 284-95.
- ¹⁷⁷ **Moore A. et al.**, Uptake of dextran-coated monocrySTALLINE iron oxides in tumor cells and macrophages. *J Magn Reson Imag.* 1997 ; **7** : 1140-5.
- ¹⁷⁸ **Weissleder R. et al.**, Magnetically labeled cells can be detected by MR imaging. *J Magn Reson Imag.* 1997 ; **7** : 258-63.
- ¹⁷⁹ **Franklin RJ. et al.**, Magnetic Resonance Imaging of transplanted oligodendrocyte precursors in the rat brain. *Neuroreport.* 1999 ; **10** : 3961-5.
- ¹⁸⁰ **Billotey C. et al.**, Cell internalization of anionic maghemite nanoparticles : quantitative effect on magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med.* 2003 ; **49** : 646-54.
- ¹⁸¹ **Wilhelm C. et al.**, Interaction of anionic superparamagnetic nanoparticles with cells : kinetic analysis of membrane adsorption and subsequent internalization. *Langmuir.* 2002 ; **18** : 8148-55.
- ¹⁸² **Li WH. et al.**, Mechanistic studies of a calcium-dependant MRI contrast agent. *Inorg Chem.* 2002 ; **41** : 4018-24.
- ¹⁸³ **Modo M. et al.**, Tracking transplanted stem cell migration using bifunctional, contrast agent-enhanced, magnetic resonance imaging. *Neuroimage.* 2002 ; **17** : 803-11.
- ¹⁸⁴ **Kalish H. et al.**, Combination of transfection agents and magnetic resonance contrast agents for cellular imaging : relationship between relaxivities, electrostatic forces, and chemical composition. *Magn Reson Med.* 2003 ; **50** : 275-82.
- ¹⁸⁵ **Frankamp BL et al.**, Direct control of the magnetic interaction between iron oxide nanoparticles through dendrimer-mediated self-assembly. *J Am Chem Soc.* 2005 ; **127** : 9731-5.

-
- ¹⁸⁶ **Yocum GT. et al.**, Effect of human stem cells labeled with ferumoxides-poly-L-lysine on hematologic and biochemical measurements in rats. *Radiology*. 2005 ; **235** : 547-52.
- ¹⁸⁷ **Montet-Abou K. et al.**, Transfection agent induced nanoparticle cell loading. *Mol Imaging*. 2005 ; **4** : 165-71.
- ¹⁸⁸ **Arbab A. et al.**, Efficient magnetic cell labeling with protamine sulfate complexed to ferumoxides for cellular MRI. *Blood*. 2004 ; **104** : 1217-23.
- ¹⁸⁹ **Bulte JWM. et al.**, Tagging of T cells with superparamagnetic iron oxide : uptake kinetics and relaxometry. *Acad Radiol*. 1996 ; **3(Suppl. 2)** : S301-S303.
- ¹⁹⁰ **Allen MJ. et al.**, Cellular delivery of MRI contrast agents. *Chem Biol*. 2004 ; **11** : 301-7.
- ¹⁹¹ **Arbab AS. et al.**, Comparison of transfection agents in forming complexes with ferumoxides, cell labeling efficiency, and cellular viability. *Mol Imaging*. 2004 ; **3** : 24-32.
- ¹⁹² **Frank JA. et al.**, Clinically applicable labeling of mammalian and stem cells by combining superparamagnetic iron oxides and transfection agents. *Radiology*. 2003 ; **228** : 480-7.
- ¹⁹³ **Anderson SA. et al.**, Magnetic resonance imaging of labeled T-cells in a mouse model of multiple sclerosis. *Ann Neuro*. 2004 ; **55** : 654-9.
- ¹⁹⁴ **Cahill KS. et al.**, Non-invasive monitoring and tracking of muscle stem cells. *Proc Int Soc Magn Reson Med*. 2003 ; **11** : 368.
- ¹⁹⁵ **Zhang ZY. et al.**, High-generation polycationic dendrimers are unusually effective at disrupting anionic vesicles : membrane bending model. *Bioconjug Chem*. 2000 ; **11** : 805-14.
- ¹⁹⁶ **Jefferies WA. et al.**, Transferrin receptor on endothelium of brain capillaries. *Nat*. 1984 ; **312** : 162-3.
- ¹⁹⁷ **Bulte JWM. et al.**, MR microscopy of magnetically labeled neurospheres transplanted into the Lewis EAE rat brain. *Magn Reson Med*. 2003 ; **50** : 201-5.
- ¹⁹⁸ **Ahrens ET. et al.**, Receptor-mediated endocytosis of iron-oxide particles provides efficient labeling of dendritic cells for in vivo MR imaging. *Magn Reson Med*. 2003 ; **49** : 1006-13.
- ¹⁹⁹ **Lewin M. et al.**, Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nature Biotech*. 2000 ; **18** : 410-4.
- ²⁰⁰ **Kaufman CL. et al.**, Superparamagnetic iron oxide particles transactivator protein-fluorescein isothiocyanate particle labeling for in vivo magnetic resonance imaging detection of cell migration : uptake and durability. *Transplantation*. 2003 ; **76** : 1043-6.
- ²⁰¹ **Zhao M. et al.**, Differential conjugation of tat peptide to superparamagnetic nanoparticles and its effect on cellular uptake. *Bioconjug Chem*. 2002 ; **13** : 840-4.

-
- ²⁰² **Bhorade R. et al.**, Macrocyclic chelators with paramagnetic cations are internalized into mammalian cells via a HIV-tat derived membrane translocation peptide. *Bioconjug Chem.* 2000 ; **11** : 301-5.
- ²⁰³ **Johnson KM. et al.**, Gadolinium-bearing red cells as blood pool MRI contrast agents. *Magn Reson Med.* 1998 ; **40** : 133-42.
- ²⁰⁴ **Walczak P. et al.**, Instant MR labeling of stem cells using magnetoelectroporation. *Magn Reson Med.* 2005 ; **54** : 769-74.
- ²⁰⁵ **Walczak P. et al.**, Magnetoelectroporation : improved labeling of neural stem cells and leukocytes for cellular magnetic resonance imaging using a single FDA approved agent. *Nanomed : Nanotechnol, Biol, and Med.* 2006 ; **2** : 89-94.
- ²⁰⁶ **Van den Bos EJ. et al.**, Improved efficacy of stem cell labeling for magnetic resonance imaging studies by the use of cationic liposomes. *Cell Trans.* 2003 ; **12** : 743-56.
- ²⁰⁷ **Arbab AS. et al.**, Characterization of biophysical and metabolic properties of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and transfection agent for cellular MR imaging. *Radiology.* 2003 ; **229** : 838-46.
- ²⁰⁸ **Walter GA. et al.**, Noninvasive monitoring of stem cell transfer for muscle disorders. *Magn Reson Med.* 2004 ; **51** : 273-77.
- ²⁰⁹ **Calzolari A. et al.**, Transferrin receptor 2 is frequently expressed in human cancer cell lines. *Blood Cells Mol Dis.* 2007 ; *in press*.
- ²¹⁰ **Raynal I. et al.**, Macrophage endocytosis of superparamagnetic iron oxide nanoparticles : mechanisms and comparison of ferumoxides and ferumoxtran-10. *Invest Radiol.* 2004 ; **39** : 56-63.
- ²¹¹ **Arbab AS. et al.**, A model of lysosomal metabolism of dextran coated superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles : implications for cellular magnetic resonance imaging. *NMR in Biomed.* 2005 ; **18** : 383-9.
- ²¹² **Schulze E. et al.**, Cellular uptake and trafficking of a prototypical magnetic iron oxide label in vitro. *Invest Radiol.* 1995 ; **30** : 604-10.
- ²¹³ **Link G. et al.**, Iron loading of cultured cardiac myocytes modifies sarcolemmal structure and increases lysosomal fragility. *J Lab Clin Med.* 1993 ; **121** : 127-34.
- ²¹⁴ **Yu Z. et al.**, Intralysosomal iron : a major determinant of oxidant-induced cell death. *Free Radic Biol Med.* 2003 ; **34** : 1243-52.
- ²¹⁵ **Arbab AS. et al.**, Intracytoplasmic tagging of cells with ferumoxides and transfection agent for cellular magnetic resonance imaging after cell transplantation : methods and techniques. *Transplant.* 2003 ; **76** : 1123-30.
- ²¹⁶ **Shapiro EM. et al.**, In vivo detection of single cells by MRI. *Magn Reson Med.* 2006 ; **55** : 242-9.

-
- ²¹⁷ **Shapiro EM. et al.**, Sizing it up : cellular MRI using micron-sized iron oxide particles. *Magn Reson Med.* 2005 ; **53** : 329-38.
- ²¹⁸ **Heyn C. et al.**, In vivo magnetic resonance imaging of single cells in mouse brain with optical validation. *Magn Reson Med.* 2006 ; **55** : 23-9.
- ²¹⁹ **Stroh A. et al.**, In vivo detection limits of magnetically labeled embryonic stem cells in the rat brain using high-field (17,6 T) magnetic resonance imaging. *Neuroimage.* 2005 ; **24** : 635-45.
- ²²⁰ **Dodd SJ. et al.**, Detection of single mammalian cells by high-resolution magnetic resonance imaging. *Biophys J.* 1999 ; **76** : 103-9.
- ²²¹ **Wilhelm C. et al.**, Magnetophoresis and ferromagnetic resonance of magnetically labeled cells. *Eur Biophys J.* 2002 ; **31** : 118-25.
- ²²² **Hu DE. et al.**, Monitoring T-lymphocyte trafficking in tumors undergoing immune rejection. *Magn Reson Med.* 2005 ; **54** : 1473-9.
- ²²³ **Smirnov P. et al.**, In vivo cellular imaging of magnetically labeled hybridomas in the spleen with a 1,5-T clinical MRI system. *Magn Reson Med.* 2004 ; **52** : 73-9.
- ²²⁴ **Moore A. et al.**, MRI of insulinitis in autoimmune diabetes. *Magn Reson Med.* 2002 ; **47** : 751-8.
- ²²⁵ **Majors PD. et al.**, MR microscopy of magnetodendrimer uptake in single cells. *Proc Int Soc Magn Reson Med.* 2002 ; **10** : 2571.
- ²²⁶ **Foster-Gareau P. et al.**, Imaging single mammalian cells with a 1,5 T clinical MRI scanner. *Magn Reson Med.* 2003 ; **49** : 968-71.
- ²²⁷ **Heyn C. et al.**, Single cell detection with FIESTA : effect of iron loading and distribution. *Proc Int Soc Magn Reson Med.* 2003 ; **11** : 805.
- ²²⁸ **Babes L. et al.**, Synthesis of iron oxide nanoparticles used as MRI contrast agents : a parametric study. *J Colloid Interface Sci.* 1999 ; **212** : 474-82.
- ²²⁹ **Massart R.**, Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *Trans of the Inst of Electrical and Electronic Eng on Magn (Mag).* 1981 ; **17** : 1247-48.
- ²³⁰ **Moore A. et al.**, Tumoral distribution of long-circulating dextran-coated iron oxide nanoparticles in a rodent model. *Radiology.* 2000 ; **214** : 568-74.
- ²³¹ **Rety F. et al.**, MR lymphography using iron oxide nanoparticles in rats : pharmacokinetics in the lymphatic system after intravenous injection. *J Magn Reson Imag.* 2000 ; **12** : 734-39.
- ²³² **Shapiro EM. et al.**, MRI detection of single particles for cellular imaging. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2004 ; **101** : 10901-906.

-
- ²³³ **Hinds KA. et al.**, Highly efficient endosomal labeling of progenitor and stem cells with large magnetic particles allows magnetic resonance imaging of single cells. *Blood*. 2003 ; **102** : 867-72.
- ²³⁴ **Pouliquen D. et al.**, Investigation of the magnetic properties of iron oxide nanoparticles used as contrast agent for MRI. *Magn Reson Med*. 1992 ; **24** : 75-84.
- ²³⁵ **Portet D. et al.**, Nonpolymeric coatings of iron oxide colloids for biological use as Magnetic Resonance Imaging contrast agents. *J Colloid Interface Sci*. 2001 ; **238** : 37-42.
- ²³⁶ **Halbreich A. et al.**, Biomedical applications of maghemite ferrofluid. *Biochimie*. 1998 ; **80** : 379-90.
- ²³⁷ **Fauconnier N. et al.**, Thiolation of maghemite nanoparticles by dimercaptosuccinic acid. *J Colloid Interface Sci*. 1997 ; **194** : 427-33.
- ²³⁸ **Bacri JC. et al.**, Magnetic colloidal properties of ionic ferrofluids. *J Mag Mag Mat*. 1986 ; **62** : 36-46.
- ²³⁹ **Ghinea N. et al.**, Anionized and cationized hemeundecapeptides as probes for cell surface charge and permeability studies : differentiated labeling of endothelial plasmalemmal vesicles. *J Cell Biol*. 1985 ; **100** : 606-12.
- ²⁴⁰ **Gallot G. et al.**, Selection of Epstein-Barr virus specific cytotoxic T lymphocytes can be performed with B lymphoblastoid cell lines created in serum-free media. *Clin Exp Immunol*. 2006 ; **144** : 158-68.
- ²⁴¹ **Pope JH. et al.**, Transformation of foetal human leukocytes in vitro by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus. *Int J Cancer*. 1968 ; **3** : 857-66.
- ²⁴² **Di Marco M. et al.**, Colloidal stability of ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) particles with different coatings. *Int J Pharm*. 2007 ; **331** : 197-203.
- ²⁴³ **Ling NR. et al.**, The activation and reactivation of peripheral lymphocytes in culture. *J Cell Sci*. 1967 ; **2** : 57-70.

ANNEXES

LISTE DES ABREVIATIONS

2D : Deux Dimensions

3D : Trois Dimensions

ACE : Antigène Carcino-Embryonnaire

ADCC : Antibody Dependent Cell Cytotoxicity

AFP : Alpha-Foeto-Protéine

AMNP : Anionic Maghemite NanoParticles

BCR : B Cell Receptor

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

BLCL : B Lymphoblastoid Cell Line

CD4 : Cluster of Differentiation 4

CD8 : Cluster of Differentiation 8

CLIO : Cross-Linked Iron Oxide

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellules Présentatrices de l'Antigène

CPMG : Carr-Purcell-Meiboom-Gill

D10000 : Dextran 10000 g/mol

DMBA : 7,12-DiMethyl-Benz[a]Anthracene

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's

DOPA : 3,4 DihydrOxyPhenylAlanine

EBV : Epstein Barr Virus

EDTA : EthyleneDiamine Tetra-Acetic acid

ERO : Espèces Réactives Oxygénées

FIESTA : Fast Imaging Employing STeady-state Acquisition

FITC : Fluoresceine Iso Thio Cyanate

Gd-DOTA : Gadolinium- tetraazacyclododecanetetraacetic acid

Gd-DTPA : Gadolinium- diethylenetriaminepentaacetic acid

Gd-DTPA-BMA : Gadolinium diethylenetriaminepentaacetic acid bismethylamide

Gd-HP-DO3A : Gadolinium 1,4,7- tris(carboxymethyl)-10-(2'-hydroxypropyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane

GFP : Green Fluorescent Protein

GLUT-1 : GLUcose Transporter-1

HEDP : acide 1-hydroxy-ethylidene bisphosphonique

HIV-1 : Human Immunodeficiency Virus-1

ICP-OES : Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy

IE : Temps Inter-Echo

Ig G : Immunoglobuline G

Il-10 : Interleukine-10

Il-13 : Interleukine-13

Il-2 : Interleukine-2

Il-4 : Interleukine-4

Il-5 : Interleukine-5

INF γ : Interféron gamma

INSERM : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

KO : Knock Out

LAK : Lymphokine-Activated Killer

MCA : MethylCholAnthrene

MD : MagnétoDendrimères

MET : Microscopie Electronique à Transmission

MION : Monocrystalline Iron Oxide Nanopreparation

NEX : Nombre d'Excitations

NIR : Near InfraRed

NK : Natural Killer

NKT : Natural Killer T

NTMBP : 6-hydroxy-6,6-bisphosphonohexyl-1-trimethyl ammonium

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells

PBS : Phosphate Buffered Saline

PET : Positron Emission Tomography

PET - CT : Positron Emission Tomography - Computed Tomography

PFA : ParaFormAldéhyde

PLL : Poly-L-Lysine

PNN : PolyNucléaires Neutrophiles

r_1 : relaxivité longitudinale

r_2 : relaxivité transversale

RM : Résonance Magnétique

RME : Receptor Mediated Endocytosis

RPMI : Roswell Park Memorial Institute

SCAS : Service Commun d'Analyses Spectroscopiques

SCIAM : Service Commun d'Imageries et d'Analyses Microscopiques

SPECT : Single Photon Emission Computed Tomography

SPIO : Superparamagnetic Iron Oxide

SR : Scavenger Receptor

SVF : Sérum de Veau Fœtal

T_1 : Temps de relaxation longitudinal

T_2 : Temps de relaxation transversal

T_2^* : T_2 étoile

$T_2^*_{th}$: T_2 étoile threshold (valeur seuil)

TAA : Tumor Associated Antigen

TCR : T Cell Receptor

TDM : TomoDensitoMètre (scanner)

TE : Temps d'Echo

TEMP : Tomographie à Emission Mono-Photonique

TEP : Tomographie par Emission de Positons

TEP-TDM : Tomographie par Emission de Positons-Tomodensitométrie

TES : acide 2-[(2-hydroxy-1,1-bis(hydroxyméthyl)éthyl)amino]-éthane sulfonique

TI : Temps d'Inversion

TILs : Tumor-Infiltrating T Lymphocytes

TMAOH : Hydroxyde de TétraMéthylAmmonium

TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha

TPA : 12-O-TetradecanoylPhorbol-13-Acetate

TR : Temps de Répétition

USPIO : Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide

COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE

◆ RPMI 1640 / L-Glutamine (milieu de base / 500 mL)

MILIEU RPMI								
Composant mg/l	CM0RPM00 Poudre	CM1RPM02 Liquide1X	CM1RPM00 Liquide1X	CM1RPM03 Liquide1X	CM1RPM06 Liquide1X	CM1RPM A6 Liquide1X	CM1RPM B6 Liquide1X	CM3RPM00 Liquide10X
SELS INORGANIQUE								
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	100	100	100	100	100	100	100	1000
CaCl ₂ 2 H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	4000
KCl	400	400	400	400	400	400	400	-
MgSO ₄ anh.	48,9	-	-	-	-	-	-	-
MgSO ₄ 7 H ₂ O	-	100	100	100	100	100	100	1000
NaCl	6000	6000	6000	6000	5500	5500	5500	60000
NaH ₂ PO ₄ anh.	-	-	-	-	-	-	-	-
Na ₂ HPO ₄ anh.	800	800	800	800	800	800	800	8000
NaHCO ₃	-	2000	2000	2000	-	850	2000	-
ACIDES AMINÉS								
L-arginine	200	200	200	200	200	200	200	2000
L-asparagine	50	50	50	50	50	50	50	500
L-aspartique	20	20	20	20	20	20	20	200
L-cystine	-	50	50	50	50	50	50	500
L-cystine -2HCl	65	-	-	-	-	-	-	-
L-glutamine	300	300	-	-	-	-	-	-
L-glutamique	20	20	20	20	20	20	20	200
Glycocolle	10	10	10	10	10	10	10	100
L-histidine	15	15	15	15	15	15	15	150
L-hydroxy- proline	20	20	20	20	20	20	20	200
L-isoleucine	50	50	50	50	50	50	50	500
L-leucine	50	50	50	50	50	50	50	500
L-lysine HCl	40	40	40	40	40	40	40	400
L-méthionine	15	15	15	15	15	15	15	150
L-phénylalanine	15	15	15	15	15	15	15	150
L-proline	20	20	20	20	20	20	20	200
L-serine	30	30	30	30	30	30	30	300
L-thréonine	20	20	20	20	20	20	20	200
L-tryptophane	5	5	5	5	5	5	5	50

L-tyrosine	-	20	20	20	20	20	20	200
L-tyrosine 2Na	29	-	-	-	-	-	-	-
L-valine	20	20	20	20	20	20	20	200
AUTRES COMPOSANTS								
D-glucose	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000	20000
Glutathion (réduit)	1	1	1	1	1	1	1	10
HEPES	-	-	-	-	5958	5958	5958	-
Rouge de phénol	5	5	5	-	5	5	5	50
VITAMINES								
Biotine	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	2
D-Ca-panthothénate	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	3
Chlorure de Choline	3	3	3	3	3	3	3	30
Acide Folique	1	1	1	1	1	1	1	10
I-inositol	35	35	35	35	35	35	35	350
Nicotinamide	1	1	1	1	1	1	1	10
Acide p-aminobenzoïque	1	1	1	1	1	1	1	10
Pyridoxal HCl	1	1	1	1	1	1	1	10
Riboflavine	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	2
Thiamine HCl	1	1	1	1	1	1	1	10
Vitamine B12	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,05
Ajouter								
L-glutamine (mg)	-	-	300	300	300	300	300	300
GLU3100 (ml)	-	-	10,2	10,2	10,2	10,2	10,2	-
NaHCO3 (mg)	2000	-	-	-	850 / 2000	-	-	2000
BIC3000 (ml)	28	-	-	-	12,1 / 28	-	-	28

http://www.eurobio.fr/FR/secteur_production/life_science/Milieux/Produits/Milieu_RPMI_16_40_15.htm

◆ **Milieu utilisé pour la culture des BLCL :**

RPMI 1640 / L-Glutamine (milieu de base / 500 mL)

SVF 10%

Antibiotiques 1% (Amphotéricine B, Pénicilline, Streptomycine)

◆ **Milieu utilisé pour la culture des lymphocytes périphériques murins (RPMI 1640 / L-Glutamine complet) :**

RPMI 1640 / L-Glutamine (milieu de base / 500 mL)

SVF 10%

Antibiotiques 1% (Amphotéricine B, Pénicilline, Streptomycine)

Acides Aminés Non Essentiels (NEAA) 1%

Pyruvate de sodium 1 mmol.L⁻¹

β-mercapto-éthanol 50 μmol.L⁻¹

◆ DMEM high Glucose / L-Glutamine (milieu de base / 500 mL)

MILIEU DE BASE MODIFICATION DE DUBEL								
Composant mg/l	CM0DME60 Poudre	CM0DME66 Poudre	CM1DME62 Liquide 1X	CM1DME60 Liquide 1X	CM1DME66 Liquide 1X	CM2DME60 Liquide 2X	CM2DME66 Liquide 2X	CM3DME60 Liquide 10X
SELS INORGANIQUES								
CaCl ₂ anh.	200	200	-	-	-	-	-	-
CaCl ₂ 2H ₂ O	-	-	266	266	266	532	532	2660
Fe(NO ₃) ₃ 9H ₂ O	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	1
KCl	400	400	400	400	400	800	800	4000
MgSO ₄ anh.	97,7	97,7	-	-	-	-	-	-
MgSO ₄ 7 H ₂ O	-	-	200	200	200	400	400	2000
NaCl	6400	3500	6400	6400	3500	12800	7000	64000
NaH ₂ PO ₄ anh.	109	109	109	109	109	218	218	1090
NaHCO ₃	-	-	3700	3700	3700	-	7400	-
ACIDES AMINÉS								
L-arginine-HCl	84	84	84	84	84	168	168	840
L-cystine	-	-	48	48	48	96	96	480
L-cystine - 2HCl	63	63	-	-	-	-	-	-
L-glutamine	584	584	584	-	-	-	-	-
Glycocolle	30	30	30	30	30	60	60	300
L-histidine HCl H ₂ O	42	42	42	42	42	84	84	420
L-isoleucine	105	105	105	105	105	210	210	1050
L-leucine	105	105	105	105	105	210	210	1050
L-lysine HCl	146	146	146	146	146	292	292	1460
L-méthionine	30	30	30	30	30	60	60	300
L- phénylalanine	66	66	66	66	66	132	132	660
L-serine	42	42	42	42	42	84	84	420
L-thréonine	95	95	95	95	95	190	190	950
L-tryptophane	16	16	16	16	16	32	32	160
L-tyrosine	-	-	-	72	72	144	144	720
L-tyrosine 2Na	104	104	104	-	-	-	-	-
L-valine	94	94	94	94	94	188	188	940
AUTRES COMPOSANTS								
D-glucose	4500	4500	4500	4500	4500	9000	9000	45000
HEPES	-	5958	-	-	5958	-	11916	-
Rouge de phénol	15	15	15	15	15	30	30	150
Vitamines								
D-Ca- panthothénate	4	4	4	4	4	8	8	40
Chlorure de Choline	4	4	4	4	4	8	8	40
Acide Folique	4	4	4	4	4	8	8	40
I-inositol	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	14,4	14,4	72
Nicotinamide	4	4	4	4	4	8	8	40

Pyridoxal HCl	4	4	4	4	4	8	8	40
Riboflavine	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,8	0,8	4
Thiamine HCl	4	4	4	4	4	8	8	40
Ajouter								
L-glutamine (mg)	-	-	-	584	584	584	584	584
GLU3100 (ml)	-	-	-	20	20	20	20	20
NaHCO₃ (mg)	3700	3700	-	-	-	3700	-	3700
BIC3000 (ml)	53	53	-	-	-	53	-	53

http://www.eurobio.fr/FR/secteur_production/life_science/Milieux/Produits/Milieu_Ess_Min_Mod_de_Dulbecco_4.htm#

◆ **Milieu utilisé pour la culture du gliome C6 :**

DMEM high Glucose / L-Glutamine (milieu de base / 500 mL)

SVF 10%

Antibiotiques 1% (Amphotéricine B, Pénicilline, Streptomycine)

LISTES DES TRAVAUX

• Publications

Franconi F., Mowat P., Lemaire L., Richomme P., Le Jeune JJ., Single-scan quantitative T2* methods with susceptibility artifact reduction, NMR in biomedicine, Août 2006 ; 19 : 527-34

Mowat P., Franconi F., Chapon C., Lemaire L., Dorat J., Hindré F., Benoit JP., Richomme P., Le Jeune JJ., Evaluating SPIO-labelled cell MR efficiency by three dimensional quantitative T2* MRI, NMR in biomedicine, Février 2007 ; 20 : 21-7

• Communications orales

Mowat P., Lemaire L., Franconi F., Hindré F., Montero-Menei C., Denizot B., Le Jeune JJ., Préparation de magnéto-lymphocytes détectables par IRM, XI^{ème} Congrès du GRAMM, Nancy 21-23 Mars 2005

Franconi F., Lemaire L., Mowat P., Richomme P., Le Jeune JJ., Imagerie quantitative T2* avec compensation des artéfacts de susceptibilité, XI^{ème} Congrès du GRAMM, Nancy 21-23 Mars 2005

• Affiches

Mowat P., Lemaire L., Franconi F., Hindré F., Dorat J., Montero-Menei C., Menard M., Benoit JP., Le Jeune JJ., Bis-Phosphonates coated iron nanoparticles for T-Lymphocytes labelling, XXIII^{ème} Congrès Européen de l'ESMRMB, Varsovie 21-23 Septembre 2006

Franconi F., Mowat P., Lemaire L., Chapon C., Denizot B., Tanguy G., Hindré F., Le Jeune JJ., Evaluation de l'efficacité RMN du marquage cellulaire par imagerie T2* quantitative, XI^{ème} Congrès du GRAMM, Nancy 21-23 Mars 2005

Mowat P., Lemaire L., Franconi F., Hindré F., Montero-Menei C., Denizot B., Le Jeune JJ., Utilisation de nanoparticules superparamagnétiques pour l'IRM cellulaire, Club des nanomatériaux pour les sciences du vivant, Paris 11 Mars 2005

Mowat P., Lemaire L., Franconi F., Hindré F., Denizot B., Le Jeune JJ., Lymphocytes labelling using HEDP coated iron oxide nanoparticles, XIX^{èmes} journées scientifiques du GTRV, Paris 16-17 Décembre 2004

RÉSUMÉ

Le cancer tue en France 150.000 personnes chaque année, chiffre qui justifie pleinement de faire de la lutte contre cette maladie un axe de recherche majeur. Lutter contre le cancer passe tout d'abord par un dépistage précoce. Dans ce contexte, nous avons tenté de mettre au point un système innovant de diagnostic qui consiste à cibler une tumeur par des lymphocytes marqués magnétiquement et utilisés comme agents de contraste en IRM.

L'objectif de notre étude est de marquer le plus efficacement possible des lymphocytes périphériques, grâce à des nanoparticules d'oxydes de fer superparamagnétiques (USPIOs), sans compromettre la viabilité cellulaire, afin de suivre l'infiltration tumorale en IRM. L'efficacité de marquage a été évaluée en déterminant le pourcentage de cellules marquées et la quantité de fer intracellulaire. L'efficacité du marquage sur les images d'IRM a également été évaluée grâce à une nouvelle méthodologie basée sur la quantification des hyposignaux à partir des cartographies 3D T2*.

La mise en place de ce système original de diagnostic précoce des tumeurs requiert plusieurs étapes :

- (1) Choisir parmi les différentes particules synthétisées au laboratoire celle qui marque le plus efficacement les cellules en utilisant une lignée BLCL (B Lymphoblastoïd Cell Line) comme modèle.
- (2) Marquer les lymphocytes périphériques murins, après les avoir activés de manière non spécifique (Concanavaleine A / Il-2), en vue d'une injection autologue par voie intraveineuse chez le rat Sprague Dawley femelle portant une tumeur.
- (3) Suivre en IRM l'infiltration tumorale des lymphocytes activés et marqués.

Mots Clés :

IRM cellulaire - Marquage lymphocytaire - Nanoparticules d'oxydes de fer - Infiltration tumorale - Diagnostic en cancérologie

Spécialité : Imagerie médicale

Laboratoire d'accueil :

INSERM U646 - Bâtiment IBT

10, rue André Boquel, 49100 ANGERS, FRANCE