



HAL
open science

Agrégats multicellulaires magnétiques: mécanique des tissus et biodégradation des nanomatériaux

François Mazuel

► **To cite this version:**

François Mazuel. Agrégats multicellulaires magnétiques: mécanique des tissus et biodégradation des nanomatériaux . Biophysique [physics.bio-ph]. Université Sorbonne Paris Cité - Université Paris Diderot (Paris 7), 2016. Français. NNT: . tel-01393079

HAL Id: tel-01393079

<https://theses.hal.science/tel-01393079>

Submitted on 6 Nov 2016

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

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



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

**THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE SORBONE PARIS CITE
Université Paris Diderot**

Spécialité : Physique

École doctorale : 564 « Physique en Île-de-France »

réalisée

au Laboratoire Matière et Systèmes Complexes, UMR 7057

présentée par

François MAZUEL

pour obtenir le grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS DIDEROT

Sujet de la thèse :

**Agrégats multicellulaires magnétiques: mécanique des tissus et
biodégradation des nanomatériaux**

soutenu le 22 septembre 2016

devant le jury composé de :

M.	Atef ASNACIOS	Président
M.	Giovanni CAPPELLO	Examinateur
M.	Pierre NASSOY	Rapporteur
Mme	Myriam REFFAY	Co-directrice (invitée)
Mme	Charlotte RIVIERE	Examinatrice
M.	Olivier SANDRE	Rapporteur
Mme	Claire WILHELM	Directrice de thèse

Table des matières

1	Introduction générale	1
2	Préliminaires	3
2.1	Les agrégats multicellulaires	3
2.1.1	Un tissu biologique modèle	3
2.1.2	Applications	4
2.1.3	Méthodes de formation	7
2.2	Les nanoparticules magnétiques	9
2.2.1	Les nanomatériaux magnétiques et leurs applications au vivant	9
2.2.2	Description des nanoparticules utilisées	10
2.2.3	Internalisation par les cellules	12
2.2.4	Questions de la toxicité et la bio-transformation des nanomatériaux	14
I	Mécanique des tissus biologiques	17
3	Etat de l'art	19
3.1	De la cellule au tissu : un matériau complexe	19
3.2	Rhéologie d'une cellule unique	22
3.2.1	Méthodes expérimentales pour étudier la mécanique d'une cellule	22
3.2.2	Loi puissance	24
3.2.3	Réponse non linéaire	27
3.3	Physique et rhéologie des agrégats multicellulaires	27
3.3.1	Tension de surface des agrégats multicellulaires	28
3.3.2	Comportement rhéologique	29
3.3.3	Non linéarités	31
3.3.4	Méthodes expérimentales pour étudier la mécanique des agrégats multicellulaires	31
3.4	Approche proposée	34
4	Outils magnétiques pour l'étude de la mécanique des tissus	35
4.1	Moulage magnétique d'agrégats multicellulaires	35
4.1.1	Protocole	36
4.1.2	Cellules utilisées	36
4.1.3	Caractéristiques des agrégats obtenus	38
4.2	Le tensiomètre magnétique	41
4.2.1	Dispositif expérimental	42
4.2.2	Preuve de principe et étalonnage	42

4.2.3	Mesure de la tension de surface d'un agrégat multicellulaire	44
4.3	Le rhéomètre magnétique	44
4.3.1	Dispositif expérimental	44
4.3.2	Etalonnage	46
4.3.3	Traitement des films	51
4.3.4	Comparaison des deux dispositifs	51
5	Comportement liquide des tissus biologiques	53
5.1	Mesure de la tension de surface de sphéroïdes	53
5.2	Transition élasto-capillaire	55
5.2.1	Observation expérimentale	56
5.2.2	Rayon critique	58
5.3	Discussion	61
5.4	Conclusion	62
6	Rhéologie des tissus biologiques	63
6.1	Comportement en loi puissance	63
6.1.1	Régime temporel : expérience de fluage	64
6.1.2	Régime fréquentiel : déformations sinusoïdales	64
6.2	Effets d'inhibiteurs	68
6.3	Non linéarité	71
6.3.1	Réponse à une rampe croissante	71
6.3.2	Réponse à des créneaux d'amplitude variable	72
6.4	Discussion	76
6.5	Conclusion et perspectives	77
II	Biodégradation de nanoparticules magnétiques	79
7	Etat de l'art	81
7.1	Dégradation des nanoparticules d'oxyde de fer dans l'environnement cellulaire	81
7.2	Toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer ?	83
7.2.1	Une faible cytotoxicité dépendant de la dose	83
7.2.2	Mais des effets adverses sur les cellules	83
7.2.3	Des études in vivo contradictoires et peu nombreuses	84
7.2.4	Paramètres influençant la toxicité	84
7.2.5	Nécessité d'une uniformisation des études de toxicité	85
7.3	Homéostasie du fer	85
7.3.1	Fonctionnement	86
7.3.2	Perturbations dues aux nanoparticules d'oxyde de fer	89
7.4	Approche proposée	89
8	Méthodes développées pour l'étude de la biodégradation	91
8.1	Formation des agrégats	91
8.2	Quantification du fer	93
8.2.1	Mesure de la quantité de fer magnétique	93
8.2.2	Mesure de la quantité de fer totale	95
8.3	Caractérisation des nanomatériaux	95

8.3.1	Microscopie électronique en transmission	95
8.3.2	Analyse des courbes d'aimantation	96
8.4	Quantification de l'expression génique	97
8.5	Modèle endosome	97
8.5.1	Extraction des endosomes	97
8.5.2	Mesure de l'aimantation des endosomes	98
8.6	Conclusion	99
9	Une dégradation massive et rapide de nanoparticules d'oxyde de fer	101
9.1	Les sphéroïdes : un modèle de tissu viable à long terme	101
9.2	Quantification multi échelle de la dégradation	106
9.2.1	A l'échelle du tissu	106
9.2.2	A l'échelle nanométrique	107
9.2.3	Une dégradation d'origine endosomale	111
9.2.4	Effet de la dose sur la dégradation	114
9.3	Réponse biologique des cellules	114
9.4	Conclusion	116
10	Application à des nanomatériaux de structure plus complexe.	117
10.1	Biodégradation de nanocubes et nanodimères Fer-Or magnétiques	117
10.1.1	Architecture et synthèse	117
10.1.2	Suivi de la dégradation des nanocubes et nanodimères	118
10.1.3	Conclusion et perspectives	123
10.2	Protection de nanofleurs d'oxyde de fer par enrobage d'or	125
10.2.1	Stratégie de protection et nanomatériaux utilisés	125
10.2.2	Modulation de la dégradation	127
10.2.3	Conclusion et perspectives	132
11	Conclusion générale	135
	Annexes	139
A	Protocoles classiques	141
A.1	Culture cellulaire	141
A.2	Marquage magnétique	141
A.3	Maturation des agrégats	142
A.4	Magnétophorèse des cellules	142
A.5	Fixation et préparation des coupes	142
A.6	Histologie	142
A.7	Immunofluorescence	143
A.8	Traitement superhydrophobe des lamelles	144
B	Calcul du profil d'une goutte pesante	145
C	Images supplémentaires de microscopie électronique en transmission	147
C.1	Nanoparticules	147
C.2	Nanocubes et nanodimers	147

D Article 1	151
E Article 2	157
Bibliographie	182

1 | Introduction générale

L'ingénierie tissulaire, au carrefour des sciences du vivant, des sciences de l'ingénieur et de la biophysique a pour objectif de réparer ou de remplacer les tissus déficients. Ce but ambitieux nécessite des développements technologiques innovants ainsi qu'une meilleure compréhension des processus qui déterminent l'assemblage et l'organisation des tissus.

Il est maintenant communément admis que les forces mécaniques et les propriétés rhéologiques des cellules et des tissus jouent un rôle essentiel aussi bien pour le développement embryonnaire que pour le fonctionnement et le maintien des tissus adultes. Etudier et caractériser la réponse mécanique des tissus biologiques constituent donc des enjeux fondamentaux majeurs, autant pour la compréhension des propriétés tissulaires, que pour la reconstruction d'organes complexes.

L'interface de la physique et de la biologie apporte le formalisme et le cadre théorique pour pouvoir comprendre et interpréter le comportement d'un tissu en réponse à une stimulation mécanique. Les tissus biologiques sont des milieux complexes cellulaires, hétérogènes et actifs. Les concepts de la physique de la matière molle permettent d'analyser une grande partie de leurs propriétés (tension de surface, visco-élasticité, ...). Cependant de nombreuses pistes restent encore à explorer, à la fois sur le plan expérimental et théorique, notamment les questions de la réponse fréquentielle, des non linéarités et du lien entre mécanique des cellules individuelles et mécanique des tissus.

Un des défis technologiques actuels de l'ingénierie tissulaire et de la biomécanique des tissus reste de contrôler l'organisation spatiale de cellules individuelles afin de produire des tissus purement cellulaires, sans matrice de soutien, organisés, stimulables et de grande taille. L'approche classique pour mettre les cellules en interaction et les organiser est une approche 2D sur substrats microstructurés, loin d'un environnement tissulaire 3D. Des techniques récentes visent à s'affranchir du substrat en restant à 2D (feuilletts cellulaires) ou à organiser les cellules dans l'espace dans une matrice (impression 3D). Dans cette perspective, les agrégats multicellulaires constituent une piste intéressante car ils permettent la culture 3D sans utiliser de matrice.

Pour pouvoir créer un assemblage purement cellulaire, organisé à 3D, épais et de grande taille, il faut pouvoir agir à distance sur les cellules, pour les faire interagir, les organiser et les stimuler. Les forces magnétiques, créées à distance par des champs externes, sont des candidats idéaux pour une telle application, sous réserve de magnétiser au préalable les cellules, via l'internalisation de nanoparticules magnétiques. L'équipe a ainsi récemment démontré qu'il était possible d'utiliser des forces magnétiques pour développer des approches tissulaires 3D, et s'affranchir du substrat. En particulier, des cellules souches magnétiques ont pu être confinées par des micro-aimants, puis organisées en tissu épais sous forme de sphéroïdes.

L'utilisation de nanoparticules magnétiques comme outils pour la médecine régénératrice, et plus parti-

culièrement l'imagerie cellulaire IRM, commence à être très largement acceptée. Déjà utilisées comme agents de contraste en clinique, les nanoparticules d'oxyde de fer (utilisées correctement) sont souvent décrites comme biocompatibles. Néanmoins, les études de cytotoxicité des nanoparticules magnétiques, bien que nombreuses, ne font pas consensus, en particulier du fait de la diversité des modèles biologiques (jamais en environnement tissulaire 3D) et des techniques de mesures utilisées. A l'opposé, l'attention portée à la bio-stabilité (biodégradation, biotransformation) sur le long terme des nanoparticules magnétiques dans leur cible intracellulaire est nouvelle dans le domaine de la nanomédecine. Aucune étude quantitative d'une biodégradation intracellulaire des nanoparticules dans des structures tissulaires n'a été effectuée.

Cette thèse souhaite contribuer au développement de nouvelles stratégies tissulaires 3D, aussi bien pour les manipulations biophysiques, que pour le suivi de la nanotoxicité en environnement tissulaire. Elle a donc pour but, de proposer d'une part, de nouveaux outils magnétiques pour former et déformer des structures tissulaires 3D purement cellulaires, dans le contexte de l'étude de la rhéologie des tissus, et d'autre part d'aborder la biodégradation de nanoparticules de manière quantitative dans un environnement tissulaire.

...

Cette thèse se compose de deux parties indépendantes. Un chapitre de préliminaires présente les éléments communs aux deux parties et nécessaires à la lecture de cette thèse : les agrégats multicellulaires et les nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer.

La Partie **I** de cette thèse se concentre sur l'étude des propriétés mécaniques statiques et dynamiques d'agrégats cellulaires formés et stimulés magnétiquement. Le Chapitre **I.3** présente l'état des connaissances et des techniques actuelles sur le sujet. Une méthode de moulage magnétique pour former des agrégats magnétiques de grande taille et de forme contrôlée, et deux dispositifs expérimentaux de mesures ont été mis au point durant cette thèse. Le Chapitre **I.4** présente leur développement. Le Chapitre **I.5** regroupe les résultats obtenus avec le tensiomètre magnétique sur les mesures de tension de surface et l'observation de la réponse mécanique des agrégats en fonction de leur taille. Enfin, le Chapitre **I.6** présente les mesures rhéologiques effectuées avec le rhéomètre tissulaire magnétique sur les comportements en loi puissance et non linéaires des agrégats.

La Partie **II** traite de la question du devenir des nanoparticules magnétiques au coeur des cellules d'un tissu. Après une revue au Chapitre **II.7** de l'état de l'art, l'ensemble des méthodes mises en place pour quantifier de manière précise la biodégradation de ces matériaux, est présenté au Chapitre **II.8**. Une dégradation impressionnante de nanoparticules de maghémite dans les tissus, est mise en évidence au Chapitre **II.9**. Enfin, le Chapitre **II.10** montre que les méthodes développées dans cette partie sont généralisables à n'importe quel nanomatériau magnétique en considérant le cas de nanocubes et de nanodimers puis en posant la question de la protection d'un coeur magnétique face à la dégradation.

2 | Préliminaires

Sommaire

2.1 Les agrégats multicellulaires	3
2.1.1 Un tissu biologique modèle	3
2.1.2 Applications	4
2.1.3 Méthodes de formation	7
2.2 Les nanoparticules magnétiques	9
2.2.1 Les nanomatériaux magnétiques et leurs applications au vivant	9
2.2.2 Description des nanoparticules utilisées	10
2.2.3 Internalisation par les cellules	12
2.2.4 Questions de la toxicité et la bio-transformation des nanomatériaux	14

Les différents travaux exposés dans cette thèse ont comme point commun l'utilisation d'agrégats multicellulaires magnétiques. Il convient donc de définir ce que sont ces agrégats et comment on peut les rendre magnétiques. On présentera d'abord pourquoi les agrégats multicellulaires sont des objets incontournables en biophysique, à la fois pour les études fondamentales sur la morphogénèse et la mécanique des tissus, ou bien plus appliquées avec les problématiques liées à l'ingénierie tissulaire. On s'attachera ensuite à montrer brièvement pourquoi les nanomatériaux magnétiques connaissent de plus en plus d'applications en lien avec le vivant et comment ils permettent de magnétiser les cellules. Ces nouvelles utilisations à visées thérapeutiques soulèvent de nombreuses questions relatives à l'impact de ces matériaux sur le vivant et à leur devenir dans l'environnement biologique.

2.1 Les agrégats multicellulaires

Les agrégats multicellulaires ou sphéroïdes sont des assemblages de cellules à trois dimensions (voir Figure .2.1) qui sont de plus en plus utilisés en biologie, biophysique et en recherche biomédicale. Ils constituent un modèle simplifié de tissus biologique. Les revues de R. Lin et S. Nath résument les avancées récentes dans les techniques de formation et les applications des sphéroïdes [1, 2].

2.1.1 Un tissu biologique modèle

Dans un organisme vivant, les cellules sont connectées entre elles et avec une matrice de support appelée matrice extracellulaire qui est constituée de protéines (collagène, élastine, laminine, ...). Ces interactions cellules-cellules et cellules-matrice constituent un réseau complexe de communication gouverné par des signaux biochimiques et mécaniques. C'est cette organisation complexe à trois dimensions que l'on appelle tissu biologique. L'environnement tissulaire est très important au bon fonctionnement des cellules.

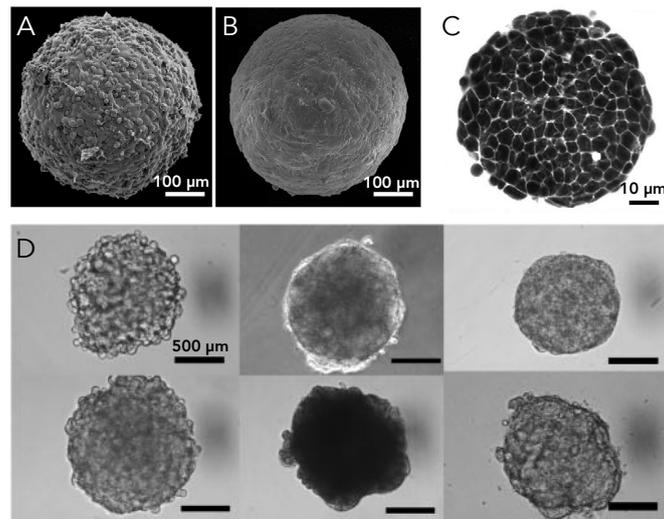


FIGURE .2.1 – **Allure d’agrégats multicellulaires** Image de microscopie électronique à balayage d’agrégats (A) de CHO (cellules d’ovaire de hamster) et (B) de cellules de la veine du cordon ombilical. (C) Image en microscopie 2 photons d’un agrégat de F9, l’espace extracellulaire est marqué à la sulforhodamine B. (D) Allure de sphéroïdes d’hépatocytes de rat. Adapté de [1, 3, 4].

En témoigne la plupart des cellules qui, cultivées de manière classique en monocouche dans des flasques de culture, perdent certaines de leurs propriétés spécifiques et présentent des niveaux d’expression génique et protéique aberrants. Les cellules cultivées en monocouche ne sont donc pas un bon modèle car elles ne sont pas représentatives des comportements *in vivo* [5, 6, 7].

Dans un agrégat multicellulaire, les cellules sont cultivées dans un environnement à trois dimensions dans lequel les protéines de la matrice extracellulaire peuvent être incluses. Bien qu’ils ne possèdent pas de vascularisation, ils présentent des propriétés biologiques proches de celles des tissus. Le sphéroïde vise donc à reproduire les conditions natives des cellules en environnement tissulaire [1, 2].

2.1.2 Applications

On peut facilement contrôler (type et nombre de cellules) et manipuler ces tissus modèles. Ces agrégats sont par conséquent utilisés dans un nombre croissant d’applications, de la biophysique à la recherche biomédicale, en particulier pour l’ingénierie tissulaire et la médecine régénérative.

Recherche biomédicale

C’est dans le domaine de la recherche biomédicale que la culture d’agrégats à trois dimensions issus d’une suspension de cellules a été initialement développée pour pallier les limites de la culture en monocouche [11, 12]. Ils sont très utilisés en recherche sur le cancer, par exemple pour développer et tester de nouveaux traitements [2, 13]. En effet, les sphéroïdes constituent un excellent modèle des tumeurs en reproduisant certaines des caractéristiques de l’environnement tumoral [8].

Les flux de nutriments et d’oxygène vers le cœur de l’agrégat ainsi que les flux de dioxyde de carbone et de déchets métaboliques vers l’extérieur sont similaires à ceux observés sur les tissus non vascularisés et les tumeurs (voir Figure .2.2). Pour les gros sphéroïdes (typiquement pour des tailles supérieures à

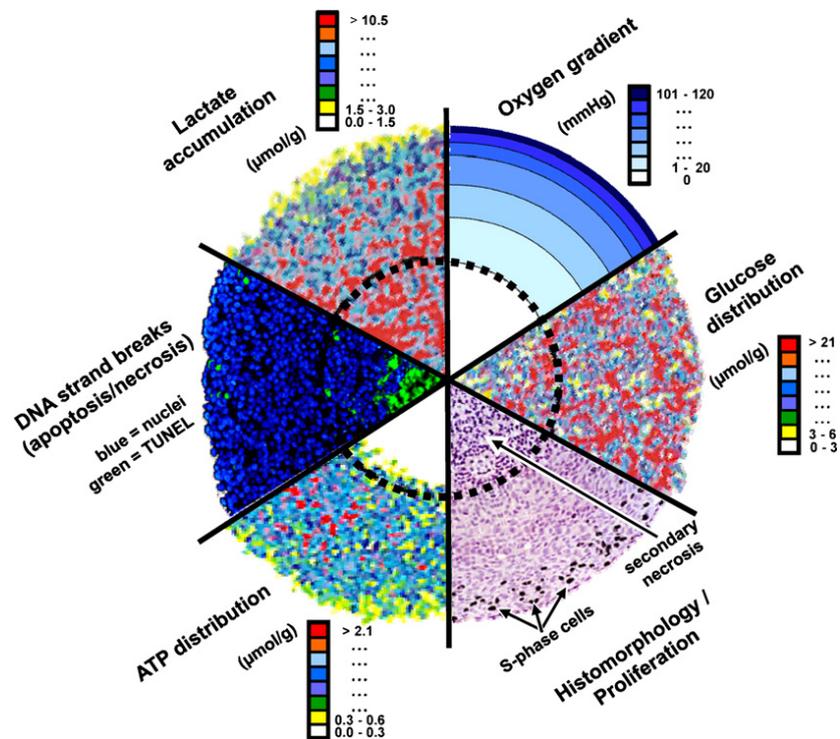


FIGURE .2.2 – **Caractéristiques d’un sphéroïde** Illustration de l’évolution de certains paramètres biologiques en fonction de la distance au centre d’un agrégat multicellulaire. Extrait de [8].

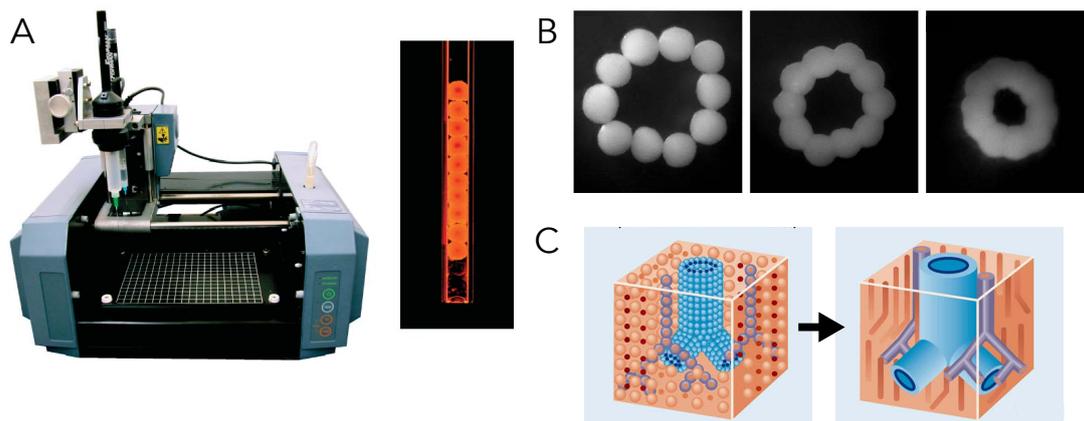


FIGURE .2.3 – **Bio-impression 3D de tissus** (A) Prototype de bio-imprimante 3D et sa cartouche contenant des agrégats cellulaires de 500 μm de diamètre. (B) Anneau bio-imprimé avec des sphéroïdes de muscle lisse, les agrégats fusionnent entre eux pour former ce motif élémentaire. (C) Principe de construction d’un tissu complexe avec plusieurs types cellulaires. Adapté de [9, 10].

500 μm), la diffusion peut devenir limitante. Ceci provoque l'apparition d'un coeur nécrotique au centre de l'agrégat, d'une couche intermédiaire où les cellules sont quiescentes et d'une zone périphérique de prolifération, comme cela est souvent le cas pour les tumeurs [2].

L'expression génique, la cinétique de croissance et les voies de transduction dans les sphéroïdes sont représentatives de vraies tumeurs.

De plus, les agrégats sont relativement faciles à produire en quantité et de manière reproductible, ce qui en fait des outils de choix pour le criblage de principes actifs ou les essais de traitements anti-tumoraux. Ils sont également utilisés dans de nombreuses études pour la compréhension des mécanismes d'invasion tumorale [14].

Ingénierie tissulaire et médecine régénérative

L'ingénierie tissulaire vise à construire à partir de cellules individuelles des tissus et des organes complexes fonctionnels afin de réparer ou de remplacer des tissus ou organes endommagés. Elle permet également de construire des modèles de tests pour les essais thérapeutiques. Parmi les voies de recherche actuelles dans ce domaine, certaines utilisent des agrégats multicellulaires.

L'impression à trois dimensions constitue l'une des approches prometteuses de l'ingénierie tissulaire. Les agrégats multicellulaires sont alors utilisés comme briques élémentaires (ou gouttes d'encre biologique) déposées de manière contrôlée au sein d'une matrice de soutien [10]. Les agrégats peuvent ensuite fusionner pour former le tissu. La Figure .2.3 présente un prototype d'une bio-imprimante 3D et illustre le principe de ces méthodes.

Une autre approche vise à utiliser des forces magnétiques pour assembler des tissus. Cet assemblage magnétique peut être réalisé à différentes échelles. Des cellules individuelles peuvent être magnétisées avec des nanoparticules magnétiques, leur assemblage en tissu est ensuite contrôlé dans l'espace et dans le temps par des champs magnétiques extérieurs [15, 16, 17]. Sur le même principe des agrégats de cellules peuvent être aimantés en mélangeant billes magnétiques et cellules lors de leur formation. La position des agrégats est ensuite contrôlée grâce à des champs magnétiques pour créer des structures plus complexes [18, 19, 20].

Biophysique

En tant que tissu modèle les agrégats multicellulaires sont des objets de choix en biophysique. Les tissus biologiques sont des milieux complexes hors équilibre. Les physiciens se sont attachés à comprendre leurs propriétés en utilisant des concepts de la physique de la matière molle, à la fois de manière théorique et expérimentale [21]. Les sphéroïdes sont généralement décrits comme des liquides visco-élastiques complexes. A la grande différence de la matière inerte, les agrégats ont une réponse active aux stimuli extérieurs. Ceci enrichit les phénomènes observés. Les cellules sont capables de ressentir leur environnement extérieur et d'adapter leur comportement en fonction. Par exemple la croissance d'un sphéroïde est affectée par la contrainte de compression qu'il subit [22, 23, 24].

Pour étudier la morphogénèse, un processus complexe où mécanique et génétique sont imbriquées, les agrégats cellulaires sont utiles pour isoler certains types de cellules de l'embryon et les caractériser de manière contrôlée [25].

Par ailleurs, biophysique et ingénierie tissulaire se rejoignent dans le but commun de mieux comprendre et de caractériser les propriétés physiques de ces agrégats afin de contrôler leur organisation [9].

L'état de l'art des connaissances ainsi que les différents dispositifs expérimentaux existants pour étudier les propriétés mécaniques et rhéologiques des agrégats multicellulaires sont présentés en détails dans le Chapitre I.3.

2.1.3 Méthodes de formation

Il existe différentes techniques pour former des agrégats cellulaires. Elles visent toutes à augmenter localement la concentration de cellules en suspension pour favoriser la création de contacts cellule-cellule et la formation d'une structure à trois dimensions. Voici un aperçu, illustré par la Figure .2.4, des techniques les plus utilisées.

- La technique de la *goutte pendante* utilise l'effet de la gravité dans des gouttes liquides de quelques dizaines de microlitres (typiquement 15 à 30 μL) déposées sur un couvercle retourné de boîte de pétri ou dans des plaques spéciales récemment commercialisées, pour concentrer les cellules (voir Figure .2.4.A). Elles forment alors un agrégat. Cette technique offre un bon contrôle de la taille des sphéroïdes ainsi formés, mais uniquement pour des petits agrégats ($R < 200\mu\text{m}$). Elle nécessite un grand nombre de manipulations.
- La *centrifugation* à faible vitesse permet de concentrer les cellules dans un culot. Elles vont ensuite se structurer en agrégat par développement des contacts cellule-cellule (Figure .2.4.B).
- L'*encapsulation* de cellules dans des sphères en hydrogel (par exemple d'alginate en utilisant une méthode de coextrusion [24]) de diamètre typique 200-300 μm et d'épaisseur 5 à 35 μm permet d'obtenir après croissance des cellules encapsulées des sphéroïdes dont la taille est finement contrôlée (Figure .2.4.C). La capsule en hydrogel est perméable aux nutriments.
- Des cellules en suspension sous *agitation permanente* peuvent s'agréger spontanément, mais la taille des agrégats obtenus par cette technique reste mal contrôlée (Figure .2.4.D).
- Le dépôt de cellules sur une *surface non adhérente* permet de favoriser les contacts entre cellules et donc la formation d'agrégats. La surface peut être rendue non adhérente par différents traitements, par exemple le dépôt d'une fine couche d'agarose ou un greffage par des polymères (PEG par exemple). Ces surfaces peuvent également être microtexturées avec des puits pour contrôler la forme des structures formées (Figure .2.4.F). Cette méthode nécessite de nombreuses étapes de manipulation.
- La *condensation et lévitation magnétique* concentrent à l'aide de champs magnétiques des cellules qui ont été rendues magnétiques avec des nanoparticules d'oxyde de fer (Figure .2.4.E).

Toutes ces méthodes reposent sur la division et la croissance des cellules après les avoir mises en contact, pour faire grossir l'agrégat. La taille des sphéroïdes obtenus est ainsi limitée par la diffusion des nutriments (diamètre maximal de l'ordre de 300 μm), si l'on veut obtenir des agrégats de composition homogène sans coeur nécrotique. Et les agrégats sont nécessairement sphériques. Pouvoir fabriquer des agrégats de forme variable sur une grande gamme de taille (jusqu'à quelques mm) représente un challenge important.

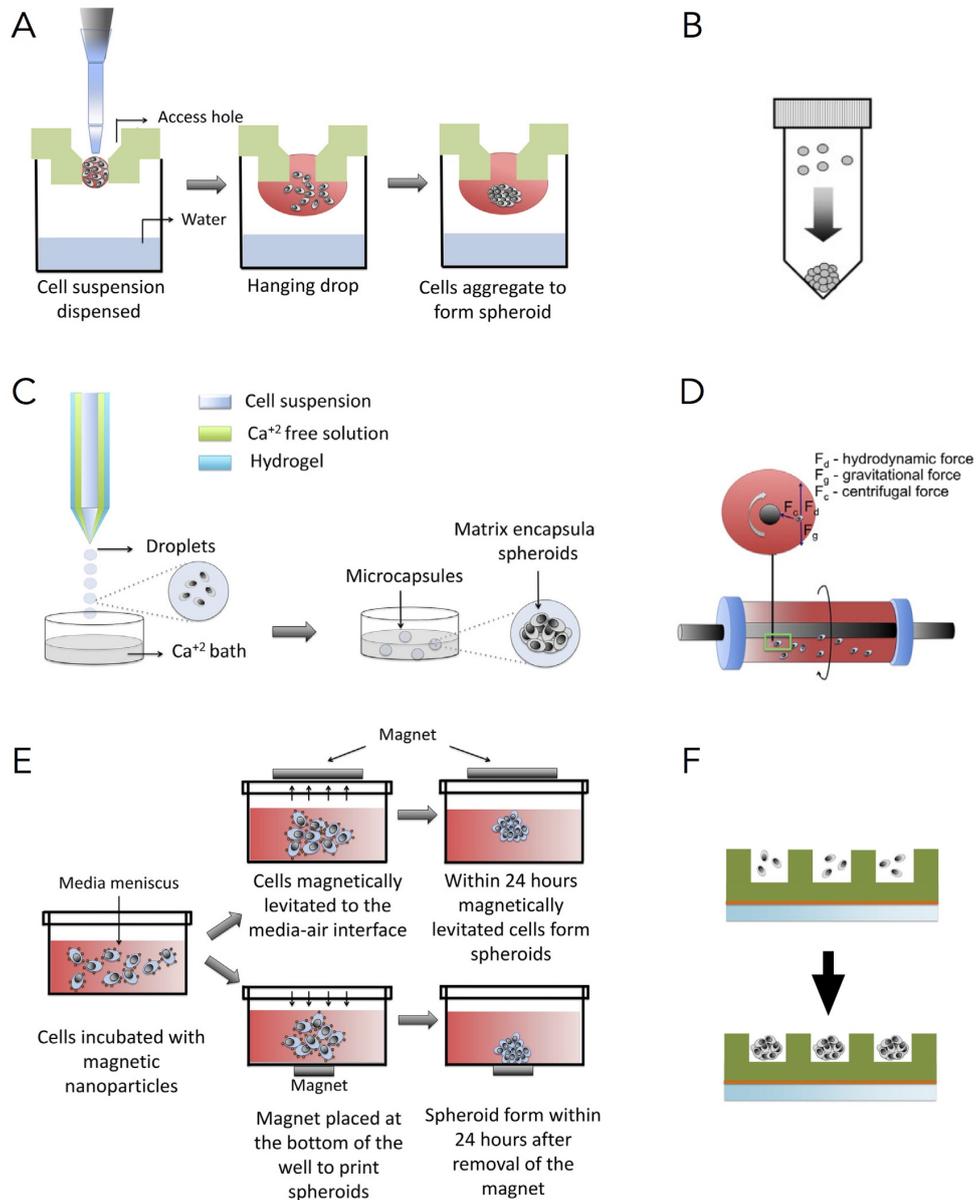


FIGURE .2.4 – Méthodes de formation des agrégats (A) Méthode de la goutte pendante. (B) Formation par centrifugation. (C) Encapsulation dans un hydrogel. (D) Agitation permanente. (E) Méthodes magnétiques de condensation. (F) Substrats microstructurés non adhérents. Adapté de [1, 2].

2.2 Les nanoparticules magnétiques

Afin de palier les limitations des méthodes classiques de formation d'agrégats multicellulaires, nous avons développé une technique de moulage magnétique pour former les agrégats de taille et de forme contrôlées (elle est présentée au Chapitre I.4). Cela nécessite de faire internaliser aux cellules des nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer.

2.2.1 Les nanomatériaux magnétiques et leurs applications au vivant

Les nanomatériaux sont des objets naturels ou manufacturés contenant des particules dont au moins l'une des dimensions est comprise entre 1 et 100 nm¹. Ils sont de plus en plus utilisés dans des produits commerciaux (matériaux techniques, cosmétiques, catalyseur, électronique, optique, ...) et ils connaissent un engouement récent pour les applications en biotechnologie et en nanomédecine. Du fait de leur taille proche de celle des polymères biologiques (la largeur de la double hélice d'ADN fait 2 nm, un anticorps a une taille typique de 15 nm) et de leur rapport surface sur volume très important, ce sont des objets de choix pour développer des interactions avec le vivant [26].

Les nanomatériaux magnétiques ont l'avantage de posséder un moment magnétique et de pouvoir ainsi être stimulés à distance par des champs magnétiques. Ceci multiplie le nombre de leurs applications. Il existe de nombreuses voies de synthèse (par co-précipitation, décomposition thermique, en microémulsion ou par synthèse hydrothermale) pour produire des particules magnétiques aux formes variées (sphérique, cubique, cylindrique, en étoile ...) avec différentes compositions et enrobages possibles [27] :

- Les *oxydes métalliques*, tels que Fe_3O_4 , $\gamma-Fe_2O_3$, $MgFe_2O_4$, $MnFe_2O_4$ ou $CoFe_2O_4$ sont couramment utilisés.
- Les *métaux purs* (état d'oxydation 0) comme le fer, le cobalt et le nickel forment des particules possédant une forte aimantation. Elles sont cependant facilement oxydées ce qui provoque la perte ou diminution de leurs propriétés magnétiques.
- Des *alliages* tels que $CoPt_3$ et $FePt$.

Dans les applications au vivant, la majorité des particules utilisées sont en oxyde de fer (en magnétite (Fe_3O_4) ou en maghémite ($\gamma-Fe_2O_3$)). Ceci est principalement dû à leur meilleure biocompatibilité à faible dose et au fait que les cellules possèdent une voie métabolique du fer. De plus leur synthèse est très bien maîtrisée et elles possèdent un bon potentiel de biofonctionnalisation. Ces nanomatériaux sont actuellement utilisés en essais pré-cliniques et certains produits ont déjà été approuvés sur le marché. L'article de Cortajarena et al. passe en revue les essais cliniques en question [28].

Voici un aperçu des applications des nanoparticules magnétiques en nano-médecine :

- Du fait de leur propriétés magnétiques, elles modifient les temps de relaxation des protons situés dans leur voisinage (diminution du temps de relaxation T2, ce qui conduit à une diminution de l'intensité locale du signal). Ces suspensions sont injectées par voie intraveineuse. Elle servent ainsi d'*agent de contraste pour l'imagerie IRM* en modifiant le contraste des zones où elles s'ac-

1. Recommandation de la Commission du 18 octobre 2011 relative à la définition des nanomatériaux, Journal officiel de l'Union européenne, 20 octobre 2011, p. 40

cumulent. Les nanoparticules d'oxyde de fer sont les seuls nanomatériaux d'oxydes métalliques à avoir reçu l'autorisation d'utilisation en clinique comme agent de contraste (la liste des autorisations successives depuis 1996 est donnée en [28], ces produits ont depuis été arrêtés). Un grand nombre d'essais cliniques sont en cours (recensement fait en avril 2014 dans [28]).

En médecine régénérative ces nanoparticules peuvent servir à la détection après transplantation de cellules marquées magnétiquement. Ceci permet de suivre par IRM le devenir des cellules que l'on a implantées.

- La méthode d'*imagerie des particules magnétiques* (MPI en anglais) est une nouvelle technique d'imagerie médicale qui tire profit de la non-linéarité de l'aimantation des nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques pour faire l'image de la répartition spatiale des nanoparticules avec de très bonnes résolution, sensibilité et rapport signal à bruit [29].
- Les nanoparticules magnétiques peuvent servir de *vecteurs magnétiques* pour aller délivrer de manière ciblée et contrôlée magnétiquement des agents actifs, notamment dans les traitements contre les tumeurs. Cette approche implique la fonctionnalisation des particules avec l'agent thérapeutique qui peut être un anticorps, un peptide ou plus communément une drogue déjà approuvée comme la doxorubicine [28, 30].
- Lorsqu'elles sont soumises à un champ magnétique oscillant à haute fréquence, les nanoparticules génèrent un échauffement du milieu environnant, par transfert d'énergie magnétique en énergie thermique, qui permet de détruire les cellules. Cette méthode est appelée *hyperthermie magnétique* [31]. Des essais cliniques sont en cours en Allemagne pour le traitement des tumeurs cérébrales avec le produit Nanotherm de MagForce [32]. Cette approche peut être combinée avec la vectorisation magnétique d'agents thérapeutiques, on parle d'approches multimodales.
- Ces propriétés de chauffage ont récemment été utilisées pour contrôler l'activité de certains neurones. L'élévation locale de la température permet d'activer les neurones via des récepteurs thermosensibles qu'on leur a fait exprimer. Cette technique est un analogue moins invasif de l'optogénétique [33].
- Le chauffage de nanoparticules piégées dans un hydrogel thermosensible permet de délivrer des principes actifs à la demande [34].
- Un médicament, le *ferumoxytol* est autorisé depuis 2009 pour traiter les carences en fer dues à des maladies rénales chroniques [35].
- Le contrôle spatial et temporel de l'organisation de cellules magnétisées par des nanoparticules magnétiques constitue une voie prometteuse pour l'*ingénierie tissulaire* [18, 16, 36, 37].

2.2.2 Description des nanoparticules utilisées

Les nanoparticules utilisées dans cette thèse sont des nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer synthétisées au laboratoire PHENIX (UMR8234), à l'exception des nanomatériaux (nanocubes, nanodimers et nanofleurs) utilisés au chapitre II.10.

Synthèse

Les nanoparticules utilisées sont constituées de maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (oxyde de fer de structure spinelle inverse). Elles sont issues de l'oxydation de nanoparticules de magnétite Fe_3O_4 elles-mêmes formées par co-précipitation d'ions Fe^{2+} et Fe^{3+} selon un procédé mis au point par Massart en 1981 [38]. Elles ont un diamètre caractéristique de 8 nm et une polydispersité de 0,28. Un cliché de microscopie électronique présente l'allure de ce nanomatériau en Figure .2.5. La solution de nanoparticules obtenue est une suspension colloïdale.

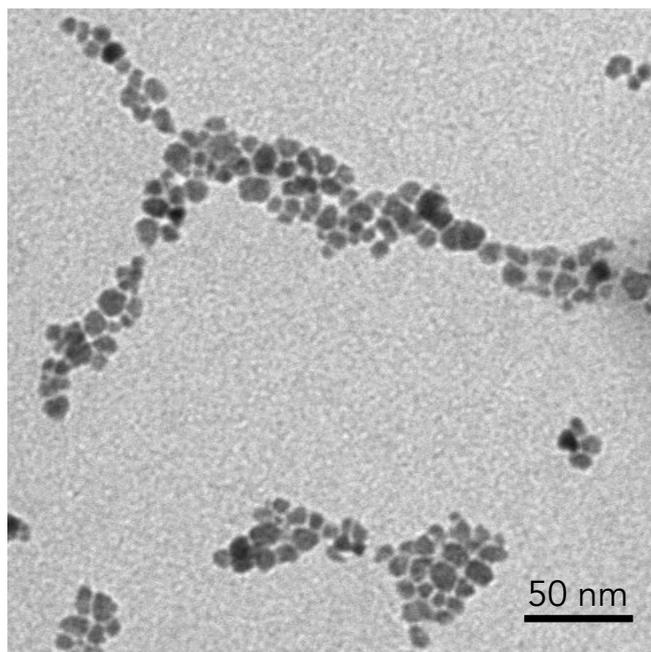


FIGURE .2.5 – **Nanoparticules de maghémite** Cliché de microscopie électronique en transmission des nanoparticules de maghémite utilisées pour le marquage magnétique. Elles ont un diamètre moyen de 9 nm.

Stabilisation colloïdale et enrobage des nanoparticules

La stabilité de cette suspension colloïdale est gouvernée par la compétition entre les forces attractives et répulsives entre nanoparticules. Les forces de type Van der Waals sont fortement attractives mais de courte portée. La nature attractive ou répulsive des forces de type électrostatique dépend de la charge de surface des nanoparticules. Enfin les interactions dipolaires entre nanoparticules sont attractives. Il est important de s'assurer de la stabilité de la suspension afin d'éviter toute floculation. Pour cela, des molécules de citrate $\text{C}(\text{CH}_3\text{COOH})_2(\text{COOH})(\text{OH})$ ont été adsorbées en surface des nanoparticules à la fin de la synthèse. A pH physiologique, les groupes acides carboxyliques sont chargés négativement. La présence de cette charge surfacique négative augmente les interactions électrostatiques répulsives entre les particules et assure ainsi la stabilité de la suspension colloïdale. Pour éviter la désorption des molécules de citrate, la phase aqueuse doit contenir du citrate libre en solution afin d'instaurer un équilibre d'adsorption.

Il existe également d'autres stratégies. Il est par exemple possible d'enrober les particules de polymères (par exemple de polyéthylène glycol (PEG), de dextran, de chitosane, ...) pour générer une répulsion

stérique entre elles.

Propriétés magnétiques

Chaque nanoparticule porte un moment magnétique permanent. Elles sont en effet constituées d'un monodomaine de Weiss dans lequel les spins électroniques sont alignés. En absence de champ magnétique extérieur, l'agitation thermique moyenne l'orientation des moments magnétiques des particules en solution. L'aimantation d'une telle suspension est donc nulle. En présence d'un champ magnétique extérieur, les particules vont s'aligner selon ce champ et ainsi conférer une aimantation macroscopique à la suspension. On parle de propriétés superparamagnétiques. L'aimantation de la solution dépend de la valeur du champ magnétique extérieur. La relation entre l'aimantation macroscopique de la solution et le champ magnétique extérieur est régie par le formalisme de Langevin. La courbe d'aimantation des nanoparticules utilisées est présentée en Figure .2.6. L'ajustement de cette courbe par une loi de Langevin pondérée par une distribution log-normal de la taille permet de déterminer le diamètre caractéristique des nanoparticules ainsi que leur polydispersité (voir détails en II.8.3.2). Pour un échantillon donné la mesure de l'aimantation macroscopique à saturation M_V^{sat} permet de déterminer la quantité de nanoparticules (exprimée en masse de fer) présentes dans l'échantillon. Pour les nanoparticules utilisées, un gramme de fer a une aimantation à saturation de 56.10^{-3} A.m^2 .

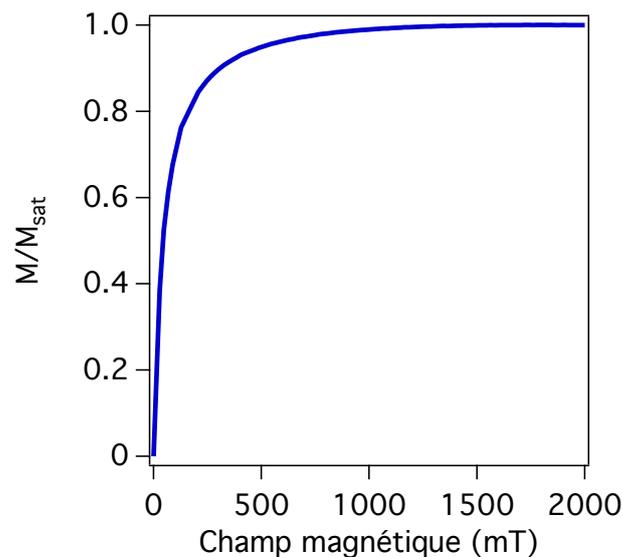


FIGURE .2.6 – **Courbe d'aimantation des nanoparticules** Aimantation de la solution de nanoparticules normalisée par l'aimantation à saturation en fonction du champ magnétique extérieur (mesure réalisée avec un magnétomètre à échantillon vibrant ou VSM voir détails en II.8.2.1).

2.2.3 Internalisation par les cellules

Les nanoparticules sont internalisées par les cellules en suivant la voie d'endocytose. La Figure .2.7 présente les différentes étapes de ce processus d'internalisation. Dispersées dans le milieu de culture des cellules, les nanoparticules s'adsorbent d'abord de manière non spécifique sur les membranes plasmiques qui s'invaginent et conduisent à la formation de vésicules d'endocytose renfermant ces nanoparticules. Ces vésicules transportent leur contenu jusqu'aux endosomes, vésicules préexistantes, avec lesquels elles

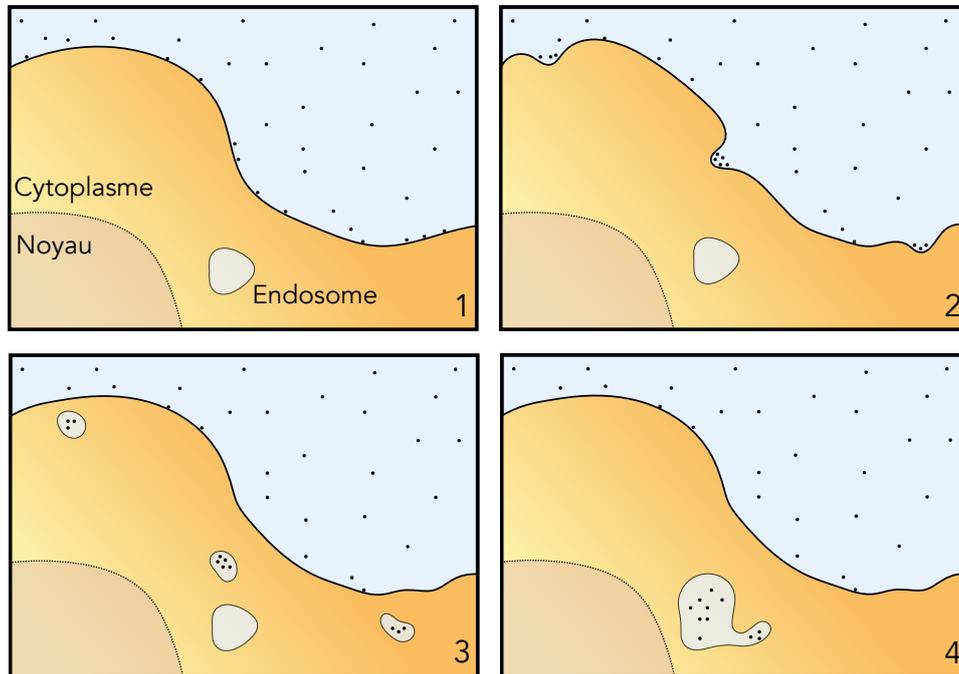


FIGURE 2.7 – **Internalisation cellulaire des nanoparticules** (1) Adsorption non spécifique des nanoparticules sur la membrane plasmique. (2) Invagination de la membrane. (3) Formation par endocytose de vésicules intracellulaires contenant les nanoparticules. (4) Ces vésicules fusionnent avec les endosomes où les nanoparticules sont stockées.

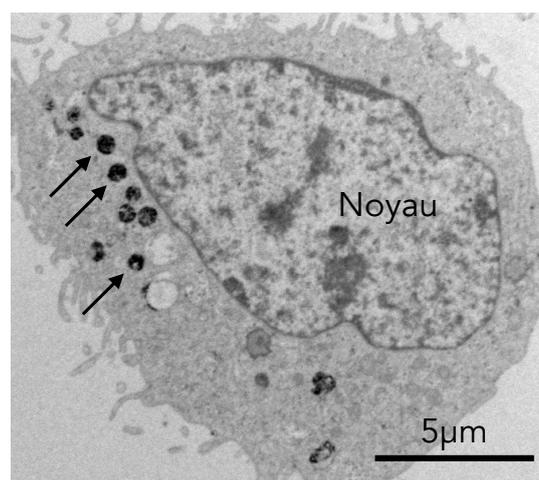


FIGURE 2.8 – **Cellule aux endosomes chargés en nanoparticules** Image de microscopie électronique en transmission d'une cellule adhérente après marquage magnétique. Les nanoparticules ont un fort contraste car elles sont denses aux électrons. Elles sont localisées dans les endosomes de la cellule (indiqués par des flèches).

fusionnent. Les endosomes se chargent progressivement en nanoparticules. La Figure .2.8 présente une image de microscopie électronique en transmission illustrant la localisation des nanoparticules à la suite du marquage magnétique.

Dans la suite de cette thèse on parlera de marquage magnétique pour désigner cette étape d'internalisation et l'on désignera comme cellules marquées des cellules qui contiennent des nanoparticules.

Les deux paramètres qui contrôlent la quantité de nanoparticules par cellule sont la concentration des nanoparticules dans la solution d'incubation (exprimée par la concentration en fer) et le temps d'incubation durant lequel on laisse les cellules et les nanoparticules en contact [39]. Plus la concentration en fer et le temps d'incubation sont importants, plus la quantité de nanoparticules capturées est importante. La masse de fer par cellule peut être mesurée par une méthode de magnétophorèse (voir détail en Annexe A). On observe une saturation du chargement cellulaire en nanoparticules avec la concentration et le temps d'incubation.

L'enrobage des nanoparticules joue un rôle important sur l'internalisation en facilitant ou non les interactions avec les cellules. Par exemple, les charges négatives portées par les groupes citrate, facilitent l'interaction avec les sites cationiques de la membrane plasmique, et améliorent donc l'internalisation. Pour que la quantité de nanoparticules soit homogène sur une population de cellules, il est très important que la solution d'incubation soit stable pour que les particules interagissent individuellement avec la membrane et ne forme pas des agrégats, ce qui rendrait l'internalisation très inhomogène. Afin de s'assurer de la stabilité de la suspension, du citrate libre est systématiquement ajouté au milieu utilisé pour le marquage magnétique.

2.2.4 Questions de la toxicité et la bio-transformation des nanomatériaux

Les propriétés remarquables des nanomatériaux (taille, surface exposée et réactivité importante) qui rendent possibles les applications évoquées précédemment sont également sources d'inquiétudes quant à la potentielle toxicité de ces objets [40]. Leur taille leur permet de diffuser facilement à travers les membranes et barrières biologiques et leur réactivité de surface peut générer des radicaux libres. Ceci provoque un stress cellulaire qui impacte certains mécanismes de la cellule et peut même induire une cytotoxicité. Les nanomatériaux sont présents de manière naturelle dans l'environnement, notamment les particules en magnétite ou maghémite qui sont produites lors de combustions ou d'éruptions volcaniques. Mais le boom des nanotechnologies augmente considérablement notre exposition, jusqu'à devenir aujourd'hui une question de santé publique. Du trajet en métro qui nous expose quotidiennement à des niveaux importants de nanomatériaux (notamment d'oxyde de fer) [41], aux besoins d'améliorer les méthodes de traitement des eaux usées et des déchets [42], la toxicité et le devenir des nanomatériaux sont des questions d'actualité. Tout particulièrement pour les applications en nanomédecine où les bienfaits du traitement ne doivent pas être contrebalancés par la toxicité des nanomatériaux utilisés pour pouvoir espérer être utilisé en clinique.

Les études sur la toxicité des nanomatériaux se limitent jusqu'à présent à évaluer la cytotoxicité immédiate en réponse à une certaine dose de nanomatériaux [43]. Les études récentes montrent que même lorsque la dose globale reste inférieure au niveau cytotoxique, des effets d'accumulations locales peuvent engendrer des dérèglements fins de certains processus cellulaires (organisation du cytosquelette, activation de voies de signalisation, expression de certains gènes, ...) [44]. Ce constat impose d'enrichir, d'élargir et d'uniformiser les tests pour évaluer la toxicité des nanomatériaux. Une définition commune

de critères relatifs à la toxicité est aussi nécessaire.

Les nanoparticules d'oxyde de fer semblent néanmoins être bien tolérées par les cellules à faibles doses. De nombreuses études ont mis en évidence une cytotoxicité nulle ou faible. Des études récentes montrent que l'internalisation de particules de maghémite dans des cellules souches mésenchymateuses et des cellules embryonnaires de souris n'altère pas leur potentiel de différenciation en deçà d'une certaine quantité de fer par cellules [45]. Néanmoins les effets des nanoparticules d'oxyde de fer sur les cellules ne sont pas nuls et il convient de les caractériser et comprendre en détails les mécanismes en oeuvre. Pour ce faire il existe un réel besoin de standardisation des études de toxicité [46].

Dans l'environnement intracellulaire, les nanoparticules peuvent être bio-dégradées et perdre leur structure cristalline [47]. La toxicité est souvent associée aux produits de dégradation (notamment les ions fer libres qui peuvent générer des radicaux libres via la réaction de Fenton). Il existe peu d'études quantitatives et à long terme sur les bio-transformations subies par les nanoparticules dans l'environnement intracellulaire. Ces questions sont particulièrement importantes pour les applications en médecine régénérative où les particules restent à terme confinées dans les cellules implantées.

L'état de l'art sur la toxicité, l'impact sur les cellules et le devenir sur le long terme des nanoparticules magnétiques en oxyde de fer est détaillé au Chapitre II.7.

Les propriétés magnétiques des cellules ayant internalisé les nanoparticules d'oxyde de fer vont nous permettre de former des agrégats multicellulaires de taille et de forme souhaitées, pour ensuite les déformer via des forces magnétiques à distance, afin d'étudier leur réponse mécanique (Partie I). Ces agrégats magnétiques constituent également un modèle idéal pour l'étude de la biotransformation et du devenir intracellulaire des nanomatériaux (Partie II).

PARTIE I | Mécanique des tissus biologiques

3 | Etat de l'art

Sommaire

3.1	De la cellule au tissu : un matériau complexe	19
3.2	Rhéologie d'une cellule unique	22
3.2.1	Méthodes expérimentales pour étudier la mécanique d'une cellule	22
3.2.2	Loi puissance	24
3.2.3	Réponse non linéaire	27
3.3	Physique et rhéologie des agrégats multicellulaires	27
3.3.1	Tension de surface des agrégats multicellulaires	28
3.3.2	Comportement rhéologique	29
3.3.3	Non linéarités	31
3.3.4	Méthodes expérimentales pour étudier la mécanique des agrégats multicellulaires	31
3.4	Approche proposée	34

Ce chapitre présente une sélection de l'état des connaissances sur les propriétés mécaniques des tissus biologiques. Après une rapide description de l'architecture biologique de la cellule et des tissus, une brève revue des propriétés rhéologiques d'une cellule unique sera faite. Il est en effet nécessaire de caractériser et de comprendre la réponse de la brique élémentaire, la cellule, avant d'appréhender les propriétés d'un assemblage plus complexe, le tissu. Enfin, on se concentrera sur la physique de tissus biologiques et sur les différentes techniques expérimentales utilisées pour conduire ces études.

3.1 De la cellule au tissu : un matériau complexe

Les tissus biologiques sont constitués de cellules en contact entre elles et avec la matrice extracellulaire (ECM). Ces deux constituants contribuent à la mécanique de ce matériau hétérogène, cellulaire et actif. La composition relative en matrice et en cellules varie selon le type de tissu. Les tissus conjonctifs contiennent beaucoup d'ECM entourant chaque cellule (cartilage, cornée, ...), tandis que les épithéliums (épiderme, muqueuses, ...) sont principalement constitués de cellules adhérant entre elles.

Cytosquelette des cellules

La forme d'une cellule ainsi que ses fonctions mécaniques sont assurées par son cytosquelette. Le cytosquelette est un réseau dynamique de filaments de protéines, qui s'étend dans toute la cellule et dont la structure est sans cesse renouvelée. La cellule consomme de l'énergie en continu pour désassembler (dépolymérisation) et réassembler (polymérisation) son cytosquelette. Ceci lui permet de changer de forme, se contracter, se déplacer, se diviser et ainsi réagir à son environnement. Ces propriétés dynamiques

différencient notamment les cellules de la matière inerte. Le cytosquelette d'une cellule eucaryote est constitué de trois types de protéines :

- Les *filaments d'actine ou microfilaments* sont issus de la polymérisation de monomères d'actine et forment une structure semiflexible (longueur de persistance de $17 \mu\text{m}$). Ces filaments sont présents dans le cortex d'actine en périphérie de la cellule sous la membrane et peuvent également former des fibres de stress en reliant les complexes d'adhésion entre eux. Cette organisation est illustrée par la Figure I.3.1. Le réseau d'actine, couplé aux protéines myosines, qui sont des moteurs moléculaires permettant de faire coulisser les microfilaments les uns par rapport aux autres, possède des propriétés contractiles. Le réseau actine-myosine met le cytosquelette en tension en exerçant des forces sur les points d'adhésion de la cellule.
- Les *microtubules*, formés par la polymérisation de monomères tubulines, sont des filaments plus rigides (longueur de persistance de quelques millimètres) qui radient généralement à partir du centrosome vers la membrane plasmique. Ils servent au transport intracellulaire et jouent un rôle important dans l'établissement de la polarité cellulaire, notamment au moment de la mitose.
- Les *filaments intermédiaires* regroupent différentes protéines qui sont tissus spécifiques (par exemple la kératine dans les cellules épithéliales ou la desmine dans les cellules musculaires). Ces filaments influencent la réponse mécanique de la cellule surtout aux grandes déformations lorsqu'ils sont mis sous tension [48].

Tous ces constituants du cytosquelette sont connectés entre eux, au noyau et à la membrane cellulaire. Il est ainsi difficile de séparer les contributions de chacun dans la réponse mécanique globale de la cellule.

Matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est un réseau interconnecté de macromolécules, constitué de protéines (collagène, élastine, fibronectine et laminine) et de polysaccharides (glycosaminoglycanes) qui sont sécrétées et orientées localement par les cellules. La composition précise et l'organisation est spécifique de chaque tissu.

La matrice extracellulaire possède un rôle structural. Le collagène et les glycosaminoglycanes peuvent par exemple créer des structures rigides (cartilage ou tendon) tandis que l'élastine est indispensable à la structure et aux propriétés des artères et de la peau.

Elle assure également un rôle important pour l'adhésion cellulaire via les fibronectines.

Enfin elle joue un rôle de régulation des processus cellulaires via des signaux physiques (augmentation de la rigidité par exemple) et/ou chimiques (interaction avec des facteurs de croissance circulants) [50, 51].

La cellule interagit avec son environnement cellulaire ou matriciel via les adhésions qu'elle peut développer.

Adhésions cellule-cellule

Les liaisons cellules-cellules sont assurées par des protéines transmembranaires qui interagissent via leurs domaines extracellulaires. On distingue 4 familles, qui sont présentées sur la Figure I.3.2 : les cadhérines, les immunoglobulines, les sélectines et certaines intégrines.

La famille des cadhérines a été la plus étudiée et caractérisée jusqu'à présent. La liaison entre deux domaines extracellulaires des cadhérines est dépendante de la présence de calcium (d'où leur nom). La

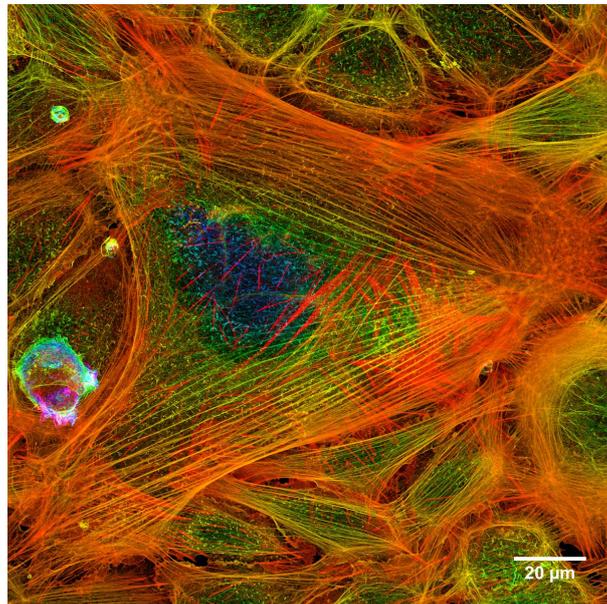


FIGURE I.3.1 – **Réseau de filaments d’actine dans une cellule adhérente** Image de microscopie confocale issue de la fusion des différents plans sur la hauteur de l’échantillon. L’actine est marquée à la phalloïdine. Le code couleur correspond à la hauteur du plan correspondant. Image réalisée par Howard Vindin.



FIGURE I.3.2 – **Protéines responsables de l’adhésion cellulaire** Illustration des 4 types de protéines permettant aux cellules d’adhérer entre elles ou à la matrice extracellulaire. Extrait de [49].

fixation de Ca^{2+} permet de rigidifier les domaines extracellulaires et rend ainsi possible l'établissement d'interactions homotypiques. Les cadhérines sont reliées au cytosquelette via les α -caténines.

Adhésions cellule-matrice

L'adhésion entre les cellules et la matrice extracellulaire est assurée par les protéines transmembranaires intégrines. Leur domaine extracellulaire est capable d'interagir, via des interactions calcium ou magnésium dépendantes, avec des domaines de certaines protéines de la matrice, notamment la fibronectine, le collagène et la laminine (voir Figure I.3.2). La partie intracellulaire des intégrines est reliée au cytosquelette de la cellule par le biais de protéines d'ancrage. Ceci participe à la perception de l'environnement physique par la cellule.

3.2 Rhéologie d'une cellule unique

La rhéologie d'une cellule dépend principalement des contributions de son cytosquelette [52]. Des systèmes *in vitro* de réseaux d'actine reconstitués reproduisent certaines propriétés rhéologiques des cellules [53]. De manière intéressante, les cellules sont bien moins rigides (module élastique de l'ordre de la centaine au kiloPascal) que les constituants du cytosquelette. Les filaments d'actine ont par exemple un module d'Young de l'ordre du gigaPascal. Cette différence s'explique par le fait que ces fibres sont sollicitées le plus souvent en flexion et que les processus dynamiques réduisent eux aussi la rigidité de l'ensemble. Aux grandes déformations, la contribution des propriétés mécaniques du noyau devient non négligeable. Les cellules possèdent une structure multi-échelle. Elles présentent donc une rhéologie très riche avec un comportement en loi puissance et de fortes non linéarités [54, 55, 56].

3.2.1 Méthodes expérimentales pour étudier la mécanique d'une cellule

Pour étudier les propriétés mécaniques d'un objet il faut le soumettre à une force et mesurer la déformation qui en résulte, ou vice versa, imposer une déformation et mesurer la force à appliquer. Accéder aux propriétés rhéologiques des cellules est en soi un défi technologique. Du fait de leur taille et de leur faible rigidité, les forces et déplacements mis en jeu sont faibles, respectivement de l'ordre du picoNewton et du nanomètre.

Au cours des dernières décennies, le développement d'outils modernes de microrhéologie, tels que les pinces magnétiques, les pinces optiques, des techniques d'indentation ou d'étirement cellulaire, a rendu possible de telles mesures. La Figure I.3.3 présente ces différentes méthodes, leurs avantages et inconvénients. Les mesures à l'échelle de la cellule sont délicates à comparer, car chaque technique peut sonder des contributions différentes de la réponse mécanique. La taille de la sonde utilisée, sa forme et sa fonctionnalisation ainsi que la résolution temporelle déterminent quelles sont les propriétés mesurées. Des billes reliées via des protéines d'adhésion aux fibres de stress de la cellule mettront en évidence des processus différents de ceux mis en jeu lorsqu'une pointe de microscope à force atomique vient indenter le cortex ou lorsque l'on étire une cellule entière entre deux microplaques. Ces techniques mesurent ainsi différents aspects de la rhéologie cellulaire. Les résultats dépendent aussi de zone de la cellule sur laquelle est faite la mesure [57]. De plus il existe une forte variabilité entre les différentes cellules [58].

Un consensus a cependant pu émerger et il laisse apparaître certains aspects universels de la réponse mécanique d'une cellule. Nous allons en présenter les principales caractéristiques.

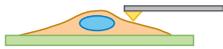
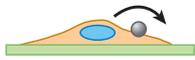
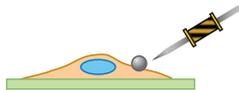
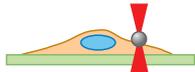
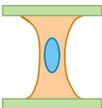
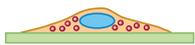
Method		Advantages	Limitations
	Atomic force microscopy	<ul style="list-style-type: none"> • High spatial resolution (10 nm, depending on tip geometry) • Quantitative measurements of shear modulus possible • High time resolution of stiffness changes (~1 s) • Large range of forces (up to ~100 nN) 	<ul style="list-style-type: none"> • Low scanning speed • Low throughput
	Magnetic twisting cytometry with optical detection of bead movements	<ul style="list-style-type: none"> • Large range of frequencies (0.01–1,000 Hz) • Parallel measurements of ~100 cells possible • High time resolution of stiffness changes (~1 s) 	<ul style="list-style-type: none"> • Maximum specific torque <140 Pa
	Magnetic tweezers	<ul style="list-style-type: none"> • Large range of forces (up to ~100 nN) • Good measurement throughput (30 cells h⁻¹) 	<ul style="list-style-type: none"> • Only for unidirectional forces • No frequency modulation (lock-in) possible
	Optical tweezers	<ul style="list-style-type: none"> • High time resolution of stiffness changes (~1 s) • Good measurement throughput (30 cells h⁻¹) 	<ul style="list-style-type: none"> • Maximum forces <500 pN • Heating caused by laser traps
	Microplate rheometer	<ul style="list-style-type: none"> • Large range of forces (up to ~1 μN) • Control of cellular prestress 	<ul style="list-style-type: none"> • Low throughput • No subcellular resolution
	Particle tracking microrheology	<ul style="list-style-type: none"> • Quantitative measurements of shear modulus possible • High frequency (up to 100 kHz) 	<ul style="list-style-type: none"> • Only for soft materials ($G \ll 100$ Pa)

FIGURE I.3.3 – **Techniques expérimentales pour étudier la mécanique des cellules uniques** Un **microscope à force atomique** vient indenter la surface de la cellule avec une poutre cantilever, la déflexion de la poutre due à la réponse cellulaire est mesurée par la déflexion d'un laser. Des billes fonctionnalisées avec des protéines d'adhésion peuvent être fixées à la membrane cellulaire, on peut ensuite exercer des forces ou des couples grâce à des **champs magnétiques** ou un **piège optique** et mesurer le déplacement des billes. Les méthodes de **microrhéologie par tracking** suivent le mouvement forcé ou spontané de traceurs intracellulaires pour en déduire les propriétés rhéologiques. Le **microrhéomètre entre deux plaques** permet d'étirer ou de compresser une cellule entière. Extrait de [56].

3.2.2 Loi puissance

Un ensemble récent d'expériences utilisant des techniques expérimentales différentes sur des types cellulaires variés, a mis à jour des comportements mécaniques communs [59]. La principale caractéristique de la rhéologie des cellules est l'existence d'une réponse en loi puissance.

La manière la plus simple de présenter ce comportement est de se placer en régime temporel et de considérer une expérience de fluage où une cellule est soumise à une contrainte constante σ_0 . La déformation normalisée $\varepsilon(t)$ de la cellule dépend alors du temps à la puissance α . On peut définir la fonction de fluage $J(t)$ qui s'écrit :

$$J(t) = \frac{\varepsilon(t)}{\sigma_0} = j_0 \left(\frac{t}{t_0} \right)^\alpha \quad (3.2.1)$$

Le préfacteur j_0 est proportionnel à l'inverse d'un module élastique. Le temps est renormalisé par t_0 , que l'on fixe arbitrairement à 1 s. La valeur choisie pour t_0 ne modifie pas l'exposant α , c'est un système invariant dans le temps. L'exposant α est compris entre zéro et un. Le cas $\alpha = 0$ correspond à un comportement de solide purement élastique (on retrouve la loi de Hooke) tandis que pour un liquide purement visqueux, $\alpha = 1$ (on retrouve la loi des fluides newtoniens). La Figure I.3.4 illustre la déformation de ces deux comportements limites et montre que les cellules se déforment en suivant cette loi avec un exposant intermédiaire, ici autour de 0,3 pour des cellules F9 (la mesure a été réalisée avec un rhéomètre à bille magnétique) [56].

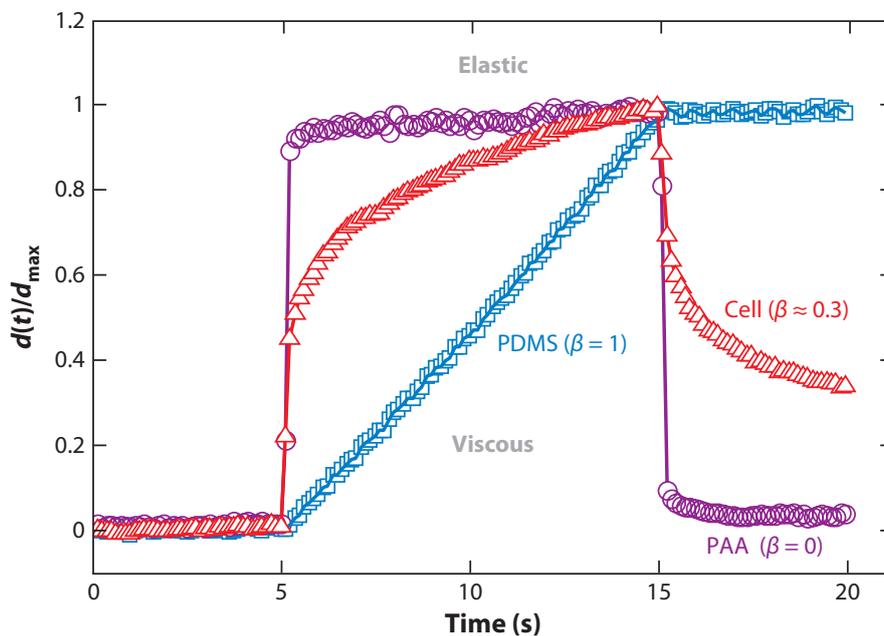


FIGURE I.3.4 – **Réponse de fluage en loi puissance** Trois matériaux différents : un matériau élastique (hydrogel de polyacrylamide-bis-acrylamide : PAA, courbe violette), un matériau visqueux (huile silicone de polydimethylsiloxane : PDMS, courbe bleue) et une cellule F9 (courbe rouge) sont soumis à une contrainte constante non nulle entre $t = 5$ s et $t = 15$ s. Les déformations (normalisées par la déformation maximale) qui en résultent suivent dans chacun des cas une loi puissance avec un exposant nul pour l'hydrogel élastique, valant 1 pour l'huile visqueuse et 0,3 pour la cellule. Extrait de [56].

Si l'on se place en régime fréquentiel et que l'on considère une expérience de rhéologie oscillatoire, où la cellule est soumise à une contrainte sinusoïdale de pulsation ω variable, on définit le module complexe viscoélastique :

$$G^*(\omega) = |G^*(\omega)|e^{j\phi(\omega)} = \frac{\sigma(\omega)}{\varepsilon(\omega)} \quad (3.2.2)$$

Pour un matériau ayant une rhéologie en loi puissance (equ. 3.2.1), on peut calculer l'expression de G^* [60] :

$$|G^*(\omega)| = \frac{\omega^\alpha t_0^\alpha}{j_0 \Gamma(1 + \alpha)} \quad (3.2.3)$$

$$\phi = \frac{\alpha\pi}{2} \quad (3.2.4)$$

où Γ est la fonction d'Euler. Le module de G^* suit donc lui aussi une loi puissance de la pulsation ω avec le même exposant α que la fonction de fluage $J(t)$, tandis que la phase est une constante fixée par α .

Les modèles rhéologiques classiques pour les fluides viscoélastiques, comportant un nombre fini de temps de relaxation (nombre fini de ressorts et de pistons), ne sont pas suffisants pour décrire la réponse d'une cellule. Il n'y a pas de temps ou de processus de relaxation qui domine, c'est un continuum de temps et de processus associés qui sont à l'oeuvre.

On retrouve ainsi un comportement en loi puissance lorsque que l'on place en série une infinité de blocs élémentaires ayant des temps de relaxation différents (de type Kelvin Voigt par exemple, les temps de relaxation sont tirés aléatoirement parmi une distribution en loi puissance) [60].

Des études théoriques ont montré qu'un modèle fractal pour le cytosquelette permettait également de retrouver ces comportements en loi puissance, l'exposant étant lié à la dimension fractale [61]. Ces lois puissances pourraient donc provenir de la structure multi-échelle du cytosquelette.

En réalité la réponse de la cellule est encore plus complexe, c'est une loi puissance par morceau (voir la Figure I.3.5 qui présente le fluage d'une cellule en fonction du temps en échelle log-log). A temps très court (inférieur à 10 ms) ou à haute fréquence (supérieure à 100 Hz), la loi puissance observée ($\alpha \simeq 0,75$) correspond à la réponse du réseau d'actine. Pour des temps plus longs (10 ms à la dizaine, voire centaine de secondes), on trouve un exposant plus faible compris en général entre 0,05 et 0,35. Aux temps encore plus longs, l'exposant augmente ($\alpha \simeq 0,5$), les mécanismes associés à ce comportement demeurent inconnus [62, 63].

La majorité des mesures effectuées a été réalisée dans la gamme 0,01 s à 100 s, les exposants obtenus sont tous répartis autour de la valeur $\alpha \simeq 0,2$ quel que soit le type de cellules utilisées [59, 60].

Les comportements en loi puissance sont habituels en matière molle (mousses, émulsions, colloïdes). Le cadre théorique pour décrire les similarités rhéologiques de ces différents matériaux a été proposé par Sollich avec son modèle de « Soft Glassy Material » [64, 65]. Les propriétés découlent de la structure désordonnée et de la métastabilité du milieu. Les constituants du milieu sont maintenus en place par des forces attractives faibles, telles que l'agitation thermique suffit à modifier leur position. La rhéologie en loi puissance découle des caractéristiques du paysage énergétique du milieu (large distribution de la profondeur des puits de potentiel). Cette description peut être appliquée aux cellules, la température effective de la cellule est générée par les processus actifs qui consomment de l'ATP (activité des moteurs moléculaires du réseau acto-myosine par exemple) et est reliée à la valeur de l'exposant α [66].

Des expériences ont été réalisées en utilisant des inhibiteurs pour observer l'effet de certaines protéines du cytosquelette sur la rhéologie des cellules [67, 68, 69]. Quelles que soient les protéines visées, la

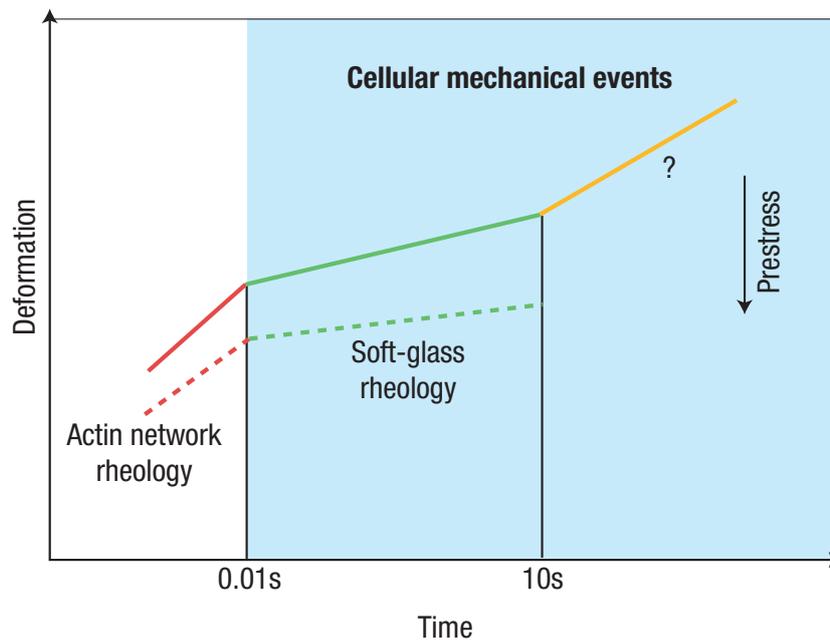


FIGURE I.3.5 – **Les lois puissance d'une cellule** Représentation schématique en échelle log-log de la déformation d'une cellule en fonction du temps dans une expérience de fluage. [62].

réponse est toujours en loi puissance, mais les paramètres α et j_0 varient légèrement.

Par exemple, l'action de la blebbistatine, qui inhibe l'activité des myosines II, sur des myoblastes diminue la valeur de l'exposant (de 0,1) et rend ces cellules moins rigides (diminution d'un facteur 5 du module élastique) [69]. La réduction de l'activité des moteurs moléculaires diminue la dissipation active et le cross-linking.

La latrunculine qui dépolymérise l'actine, diminue la rigidité (d'un facteur 4) de cellules musculaires lisses tout en augmentant légèrement la valeur de l'exposant (passage de 0,2 à 0,27) [68].

L'état de précontrainte du cytosquelette, c'est à dire l'état de tension interne de la cellule avant qu'elle ne soit soumise à une contrainte extérieure, joue un rôle important sur la réponse de la cellule. Les précontraintes sont principalement générées par les propriétés contractiles du réseau acto-myosine. Plus la tension interne est importante, plus la cellule est rigide [70] et plus l'exposant de la loi puissance est faible [71]. Une relation reliant les précontraintes, j_0 et α a été vérifiée expérimentalement [72]. La modulation de la contractilité du réseau acto-myosine apparaît donc comme un moyen pour la cellule de faire varier ses propriétés mécaniques pour répondre à son environnement [56].

Les propriétés mécaniques des cellules peuvent également être affectées par l'environnement mécanique de la cellule et l'histoire des sollicitations mécaniques qu'elle a subies. Trepatt et al ont ainsi observé une fluidification sur différents types de cellules juste après les avoir soumises à un étirement (du substrat élastique sur lequel les cellules sont cultivées). Ce phénomène est d'autant plus important que α est petit [73].

3.2.3 Réponse non linéaire

Les cellules individuelles possèdent une réponse non linéaire lorsque que la contrainte appliquée devient grande [74, 75]. La rigidité des cellules augmente avec la contrainte appliquée et la valeur de l'exposant augmente, ce qui indique respectivement un durcissement et une fluidification avec la contrainte [75]. Le taux de fluidification observée dans cette étude est fonction de l'état de précontrainte initial du cytosquelette.

Certaines caractéristiques de la réponse non linéaire des cellules ont été également observées sur des systèmes *in vitro* constitués de protéines du cytosquelette [53].

La mécanique de la cellule unique fait donc apparaître une grande richesse de comportements qui lui permet sans doute son adaptabilité. Toutefois, des lois simples permettent de décrire correctement ces phénomènes. La cellule étant la brique élémentaire des tissus, on peut raisonnablement penser que les concepts de matière molle peuvent aussi être appliqués à ces objets biologiques et plus spécifiquement à des tissus modèles : les agrégats multicellulaires.

3.3 Physique et rhéologie des agrégats multicellulaires

L'étude des propriétés mécaniques et rhéologiques des tissus biologiques, inspirée par les concepts développés pour la matière molle, a été initié en grande partie par Steinberg. Il a proposé le premier une analogie entre les liquides et des tissus d'embryons de poulets en observant l'arrangement spontané de différents types cellulaires au sein d'agrégats [76]. Cette observation célèbre avait été faite pour la première fois par Townes et Holtfreter en 1955 [77]. Après avoir dissocié un embryon, Steinberg a mélangé deux types cellulaires entre eux et a observé l'organisation spontanée du tissu formé, les cellules hépatiques entourant par exemple les cellules cardiaques (voir Figure I.3.7). Il a dressé un parallèle avec le mélange de deux gouttes de fluides non miscibles qui s'arrangent en fonction de leurs tensions de surface respectives.

Les développements expérimentaux et théoriques qui ont suivi ont permis de mieux décrire les tissus biologiques comme des objets de la matière molle. Ils possèdent cependant une richesse de comportements bien plus grande du fait de leur réponse active aux stimuli extérieurs, contrairement à la matière inerte.

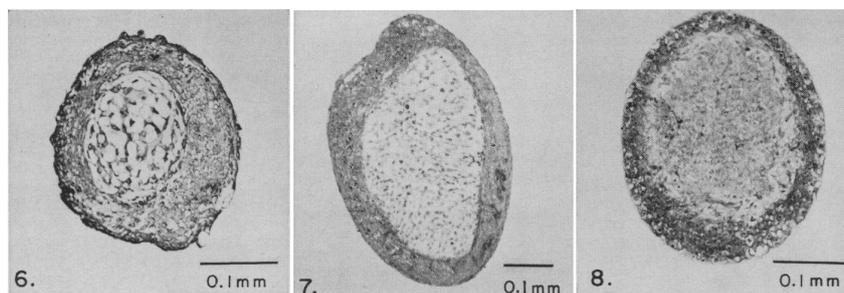


FIGURE I.3.6 – **Arrangement spontané de cellules embryonnaires dans des agrégats** Coupes d'agrégats formés à partir de différents types cellulaires (cartilage, cardiaque et du foie) issus de la dissociation d'embryons de poulets. Les cellules s'organisent spontanément pour former des structures concentriques. Extrait de la publication de Steinberg [76].

Les études présentées ici se concentrent sur les tissus mous ne contenant pas (ou peu) de matrice extracellulaire, comme c'est le cas pour les tissus embryonnaires précoces et les tumeurs. Ces tissus sont

bien modélisés par les agrégats multicellulaires. Il existe peu d'études se concentrant sur l'étude de tissus modèles contenant une quantité contrôlée de matrice extracellulaire.

3.3.1 Tension de surface des agrégats multicellulaires

Un liquide est constitué de molécules qui interagissent via des forces attractives. Ces dernières assurent la cohésion du milieu et définissent ses propriétés macroscopiques telles que sa viscosité ou sa tension de surface. De manière similaire un tissu est constitué de cellules qui ont des propriétés adhésives via leurs protéines membranaires. On peut ainsi adopter une approche de physique des milieux continus pour décrire les agrégats, car la taille de la brique élémentaire, la cellule, est petite devant celle du tissu.

Steinberg a développé l'*hypothèse d'adhésion différentielle* (DAH) pour décrire la tension de surface des tissus. Par analogie avec les liquides, c'est l'adhésion entre les cellules qui crée la tension de surface du tissu. Suivant la valeur des énergies d'interaction homotypiques et hétérotypiques, on observe différents assemblages présentés sur la Figure I.3.7. Des cellules d'un même type « préfèrent » adhérer entre elles plutôt qu'avec des cellules d'un autre type ou être en contact avec le milieu environnant. Un groupe de cellules cherchera à minimiser son énergie interfaciale en minimisant sa surface. En particulier, Steinberg a démontré expérimentalement la proportionnalité entre l'intensité de l'adhésion intracellulaire et la tension de surface, en faisant varier l'expression des protéines cadhérines dans des agrégats [78].

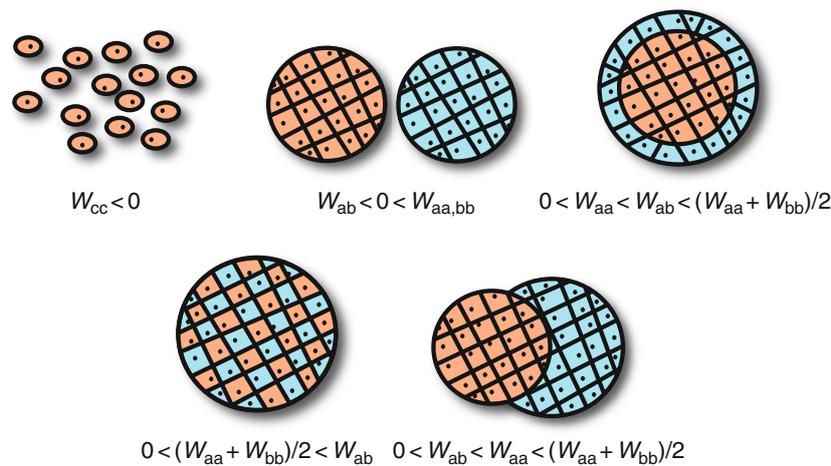


FIGURE I.3.7 – Arrangements cellulaires selon leur énergie d'adhésion relative Les deux types cellulaires sont représentés par les lettres a (orange) et b (bleu). W_{ij} est l'énergie d'interaction entre les cellules de type i et j. Lorsque l'on mélange ces deux types cellulaires, on peut observer différentes organisations de l'agrégat formé en fonction des valeurs relatives des W_{ij} . Extrait de [79].

Toutefois certaines observations relatives à la ségrégation de l'endoderme, de l'ectoderme et du mésoderme chez l'embryon ont remis en cause ce modèle. D'autres hypothèses ont donc été formulées à la suite de Steinberg pour expliquer l'origine de la tension de surface. Harris a ainsi proposé l'hypothèse de *contractilité surfacique différentielle* (DSCH), où ce sont les différences de contractilité corticale due au cytosquelette d'acto-myosine, qui génèrent la tension de surface [80]. Selon cette hypothèse les cellules avec une forte contractilité corticale cherchent fortement à minimiser leur surface exposée, leur présence en périphérie de l'agrégat est donc énergétiquement défavorable. Ceci expliquerait l'arrangement spontané en fonction de la contractilité respective de types cellulaires. Certaines études expérimentales

montrent l'importance de la contractilité corticale (mesurée par exemple avec un microscope à force atomique) pour interpréter l'organisation de tissus embryonnaires [25]. Cependant ce paramètre seul ne suffit pas à expliquer tous les phénomènes observés [81].

Plus récemment l'hypothèse de *tension interfaciale différentielle* (DITH) combine la DAH et la DSCH [82]. L'arrangement spontané des cellules est alors contrôlé par leur différence de tension interfaciale qui dépend à la fois de leur propriétés d'adhésion et de contractilité. L'adhésion intercellulaire augmente la tension de surface tandis que la contractilité corticale peut à la fois l'augmenter (en augmentant la tension cellule-milieu) ou la diminuer (en augmentant la tension cellule-cellule). Les rôles précis de l'adhésion et de la tension corticale sur la tension interfaciale sont des sujets actuels de recherche [83]. Des études récentes sont venues confirmer la DITH [84, 85].

Des analogies avec le mouillage d'une goutte liquide ont également été faites. En fonction de l'affinité des cellules pour le substrat sur lequel est déposé un agrégat (contrôlé par la fonctionnalisation du substrat ou sa rigidité), il peut être en situation de mouillage nul ou partiel [86].

Ces modèles basés sur des analogies avec les liquides s'appliquent à des agrégats à l'équilibre mécanique ou à des échelles de temps longues par rapport aux temps de réarrangements cellulaires. Aux échelles de temps intermédiaires, les agrégats possèdent une variété de comportements dynamiques.

3.3.2 Comportement rhéologique

La manière avec laquelle un agrégat multicellulaire répond à une contrainte extérieure dépend de l'échelle de temps considérée.

Une question d'échelle de temps

Echelle de la seconde à la minute : réponse élastique Quand il est sollicité sur des échelles de temps courtes avec de faibles déformations (en compression [87] ou en aspiration [88]), un agrégat présente un comportement élastique et retrouve sa forme initiale après avoir subi une déformation réversible. L'élasticité provient des propriétés élastiques du cytosquelette des cellules qui forment l'agrégat.

Echelle de la minute à l'heure : réponse viscoélastique Sur des échelles de temps plus longues, les déformations ne sont plus immédiatement réversibles. L'agrégat se déforme beaucoup plus lentement, des réarrangements cellulaires peuvent se produire. On parle de comportement de liquides viscoélastiques [89, 90, 88]. Les agrégats sont caractérisés par leur tension de surface, leur module élastique effectif et une viscosité effective.

Les processus de réarrangements sont très importants car ce sont eux qui permettent de relaxer les contraintes dans le milieu, et fournissent ainsi les propriétés visqueuses. Ces processus de réorganisation entre cellules ne sont pas faciles à mettre en évidence. Jusqu'à récemment la seule observation expérimentale avait été fournie par Phillips et Steinberg [91]. En fixant à différents temps de centrifugation des agrégats de cellules d'embryon de poulet, ils ont montré qu'à temps courts (minutes) les cellules du tissu étaient déformées, tandis qu'à temps longs (plusieurs heures) elles récupéraient leur forme initiale. Ceci montrait qu'une relaxation avait lieu durant une centrifugation prolongée.

Plus récemment Abbas Mgharbel et Sham Tlili ont pu observer des réarrangements en direct en utilisant la microscopie deux photons sur un agrégat comprimé et un agrégat dont on force le passage dans une constriction microfluidique [92, 93]. Cette réorganisation est très similaire à un réarrangement de type

T1 observé dans les mousses. La Figure I.3.8 illustre ce processus de relaxation où les cellules changent de voisins.

figures/chapitre1/rearrangement.pdf

FIGURE I.3.8 – Réarrangement cellulaire *Expérience réalisée par Sham Tlili durant sa thèse au laboratoire. Le passage forcé d'un agrégat (marqué à la sulforhodamine B qui colore l'espace extracellulaire) à travers un canal microfluidique étroit provoque un réarrangement cellulaire. Les cellules a et c sont initialement en contact (gauche), il y a ensuite une transition par un contact entre 4 cellules pour finir par une situation où b et d sont en contact. Le temps défile de gauche à droite. Le processus dure quelques dizaines de minutes. Extrait de [93].*

Certains modèles théoriques décrivent les agrégats cellulaires comme des solides élasto-visco plastiques [94, 95]. En dessous d'une certaine contrainte seuil, l'agrégat se comporte comme un solide parfait. Quand ce seuil est dépassé l'agrégat subit une déformation plastique irréversible. Ce seuil peut être interprété comme la force nécessaire pour casser les jonctions adhésives cellule-cellule et permettre des réarrangements. A ce jour, il n'y a pas d'observation systématique de l'existence d'un tel seuil. Les expériences de fusions de deux agrégats [96] montrent que s'il existe, ce seuil est inférieur aux contraintes induites par la tension de surface, puisque l'action seule de la tension de surface suffit à induire les réarrangements cellulaires pour former in fine un seul agrégat. Des expériences réalisées avec un rhéomètre en cisaillement commercial dans lequel on place un grand nombre d'agrégats, rapportent l'existence d'un seuil entre réponse élastique et fluage pour une contrainte de 0,07 Pa et une déformation correspondante de 12% [3].

La solution proposée par Marmottan et al. [87] permet de réconcilier ces deux descriptions. Il existe une barrière énergétique correspondant aux réarrangements cellulaires. Si la contrainte imposée au tissu est grande devant cette barrière, les contraintes sont relaxées rapidement par une réorganisation des cellules. Lorsque la contrainte résiduelle est inférieure à cette barrière énergétique, des processus de fluctuations assurent la relaxation, qui intervient à des échelles de temps beaucoup plus grandes. Ainsi à temps court, les contraintes résiduelles peuvent être interprétées comme une plasticité apparente du tissu.

Echelle de la journée Sur des échelles de temps encore plus longues, la rhéologie du tissu peut être affectée par la croissance cellulaire et l'apoptose. Des développements théoriques montrent que les fluctuations et réarrangements provoqués par la division et la mort cellulaires peuvent fluidifier le tissu [97]. A temps très longs, cette contribution est à ajouter aux effets visqueux provenant des propriétés adhésives des cellules.

Réponse active

Contrairement à la matière inerte, les cellules vivantes peuvent adapter leur réponse en fonction de leur environnement mécanique. Par exemple, dans les expériences d'aspiration d'agrégats à l'aide d'une micropipette, on peut observer une augmentation de la tension de surface avec la pression d'aspiration

imposée et même un comportement pulsatile [88, 98]. Lorsqu'ils sont soumis à une contrainte de compression, la croissance des agrégats peut être fortement modifiée [22] ainsi que les mouvements des cellules de l'agrégat [99].

Développements théoriques

De nombreux modèles et formalismes ont été développés pour décrire les propriétés des tissus biologiques. Ils constituent en effet des matériaux complexes hétérogènes, cellulaires et hors équilibre aux comportements très riches qui soulèvent de nombreux problèmes théoriques aussi bien en modélisation qu'en simulation numérique. Il existe également un réel effort pour essayer de relier les propriétés macroscopiques avec les caractéristiques microscopiques des cellules ou de leur cytosquelette [100, 101, 102].

Loi puissance

Dans certaines études, des comportements en loi puissance ont déjà été observés, dans les tissus, à l'échelle d'organes entiers ou de tissus prélevés chez l'animal. Par exemple la relation pression volume d'un poumon de chat suit une loi puissance [103, 104]. Des expériences utilisant un rhéomètre en cisaillement sur des rates et foies [105] et des tissus adipeux [106] de porc ont mis à jour des comportements en loi puissance avec des exposants proches de 0,2. Cependant il ne semble pas que de telles observations aient été faites sur des agrégats multicellulaires qui constituent des milieux mieux contrôlés.

3.3.3 Non linéarités

Des non linéarités ont également été mises à jour sur les agrégats multicellulaires. Une étude, utilisant un rhéomètre en cisaillement rapporte une diminution de la rigidité des agrégats lorsque la contrainte imposée devient suffisamment grande [3]. On peut remarquer que ce comportement est différent de celui des cellules uniques qui tendent à se rigidifier aux fortes contraintes.

3.3.4 Méthodes expérimentales pour étudier la mécanique des agrégats multicellulaires

Plusieurs techniques expérimentales ont été mises au point pour mesurer la tension de surface des agrégats multicellulaires ainsi que leurs propriétés rhéologiques. On peut distinguer les méthodes macroscopiques qui considèrent le tissu dans son ensemble et les techniques visant à caractériser la mécanique à l'échelle de la cellule dans le tissu.

Méthodes macroscopiques

Centrifugation C'est la première méthode utilisée par Steinberg en 1969 pour comparer les profils d'agrégats de différents types cellulaires après centrifugation afin de vérifier son hypothèse d'adhésion différentielle [107]. Cette méthode s'inspire de l'expérience de la goutte pesante. L'agrégat est placé dans une centrifugeuse pour être soumis à une gravité augmentée (environ 1000 fois l'accélération de la pesanteur), ce qui permet de le déformer (voir Figure I.3.9.A). La forme de l'agrégat à l'équilibre traduit sa tension de surface. Plus il est écrasé, plus sa tension de surface est faible. Ces observations étaient avant tout qualitatives, mais cette méthode peut être rendue quantitative en ajustant le profil expérimental par le profil théorique d'une goutte liquide, calculé à partir des équations de la capillarité (voir détail en Annexe B) [108]. Cette méthode nécessite la fixation de l'agrégat avant la fin de la centrifugation, afin que celui-ci ne relaxe pas. De plus il n'est pas possible d'observer l'écrasement en direct, ce qui empêche d'étudier la réponse dynamique de l'agrégat.

Ecrasement entre deux plans parallèles L'agrégat est déformé entre deux plans parallèles qui permettent d'imposer la déformation de l'agrégat (voir Figure I.3.9.B). La mesure de la contrainte ainsi que des rayons de courbures à l'équilibre permet de déduire la tension de surface donnée par : $\gamma = (1/R_1 + 1/R_2)^{-1}F/(\pi R_3^2)$ [109]. Déterminer de manière précise les différents rayons de courbure est délicat [110]. La mesure de la relaxation de la force de compression à imposer permet également de mesurer la viscosité effective de l'agrégat [90]. C'est la méthode qui a été la plus utilisée jusqu'à présent.

Aspiration par une micropipette Une méthode développée plus récemment par Guevorkian et al. consiste à aspirer un agrégat avec une micropipette dans laquelle on impose une dépression [88] (voir Figure I.3.9.C). Il existe une pression seuil ΔP_c à partir de laquelle l'agrégat est aspiré dans la micropipette. Cette pression est reliée à la tension de surface du tissu : $\gamma = (1/R_p - 1/R_0)^{-1}\Delta P_c/2$, où R_p est le rayon de la pipette et R_0 le rayon initial de l'agrégat. Cette méthode sonde l'agrégat seulement de façon locale, sur une taille correspondant à celle de la micropipette. La mesure de la vitesse d'avancement du tissu dans le conduit de la pipette alors qu'il est aspiré permet de remonter aux propriétés rhéologiques du tissu [98].

Fusion de deux agrégats Lorsque deux agrégats sont mis en contact, ils fusionnent pour former un seul agrégat comme le feraient deux gouttes d'un même liquide (voir Figure I.3.9.D). Le suivi de la dynamique de croissance de la ligne de contact entre les agrégats donne le ratio de la tension de surface sur la viscosité effective en utilisant un modèle hydrodynamique. La mesure de la tension de surface par une autre méthode permet de déterminer la viscosité. La taille de la zone de contact L suit la loi : $L(t)^2 = tR_0\sigma/\eta$, où R_0 est le rayon initial des agrégats, σ la tension de surface et η la viscosité effective du tissu [85].

Rhéomètre en cisaillement Il est possible d'utiliser un rhéomètre classique pour cisailier en même temps un grand nombre d'agrégats placés entre les deux rotors [3]. Il est cependant difficile de contrôler le nombre d'agrégats et donc la surface de contact. Cette méthode ne permet donc pas de réaliser de mesure absolue mais peut donner des informations importantes à partir de l'allure des courbes contrainte déformation.

Mesure à l'échelle des cellules

Récemment de nombreuses méthodes ont été développées pour avoir accès aux processus cellulaires à l'oeuvre dans les tissus biologiques et les embryons, le but étant de pouvoir mesurer les forces ou les contraintes à l'échelle des cellules pour comprendre les relations entre les échelles microscopiques et macroscopiques. La revue récente de Sugimura et al. dresse un bilan complet des techniques actuelles [111]. On distingue des méthodes de manipulations mécaniques (micromanipulateurs), ou optiques (ablation laser, pinces optiques), des méthodes de visualisations (FRET) et des méthodes d'analyse d'images (inférence de forces).

Sham Tlili a mis au point durant sa thèse au laboratoire, un dispositif microfluidique afin de faire passer des agrégats cellulaires dans une constriction en imposant une différence de pression de part et d'autre. Le couplage à l'imagerie deux photons permet d'observer les réarrangements cellulaires au sein de l'agrégat [93].

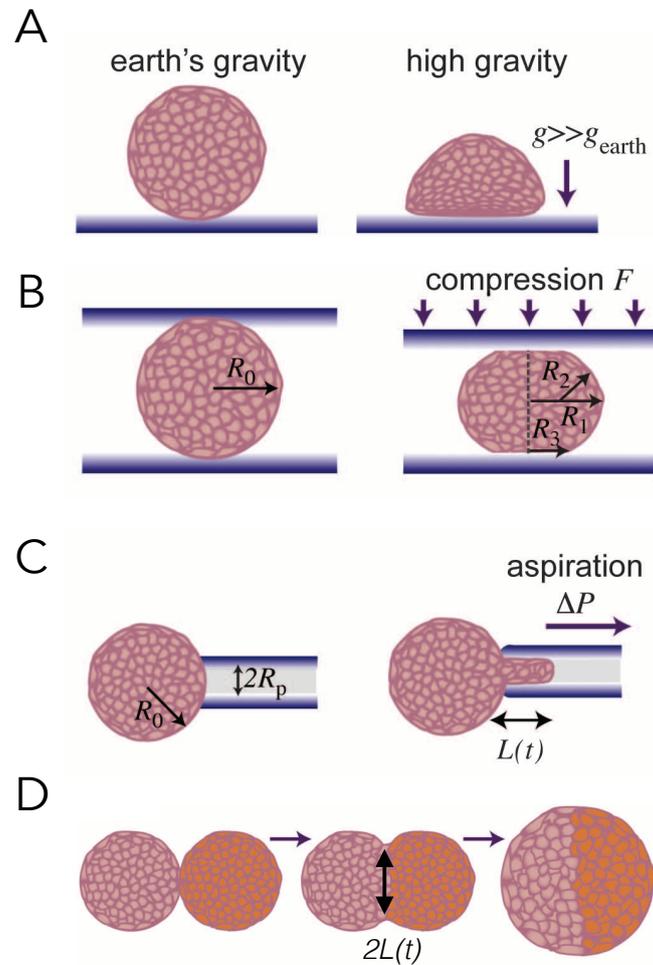


FIGURE I.3.9 – Méthodes de mesure des propriétés mécaniques des agrégats multicellulaires (A) Méthode d'écrasement par centrifugation. (B) Méthode d'écrasement entre deux plans parallèles. (C) Méthode d'aspiration par une micropipette. (D) Méthode de fusion entre deux agrégats. Extrait de [21].

3.4 Approche proposée

S'il existe de nombreuses techniques pour étudier la mécanique des agrégats multicellulaires, rares sont celles qui permettent de caractériser la réponse fréquentielle des agrégats ou d'étudier l'influence de la taille d'un sphéroïde sur sa réponse mécanique.

Nous proposons ici des méthodes magnétiques pour former et stimuler des agrégats cellulaires afin de mesurer leurs propriétés rhéologiques. L'aimantation des cellules ayant internalisé des nanoparticules magnétiques est utilisée pour les assembler en agrégats multicellulaires de taille et de forme contrôlées, grâce à la méthode de moulage magnétique développée durant cette thèse. En générant une force volumique magnétique d'écrasement à distance (ou « super-gravité » magnétique), on peut déformer les agrégats et ainsi étudier leur réponse mécanique.

Lorsque l'on place un objet possédant une aimantation volumique \vec{M}_V dans un gradient de champ magnétique homogène dans le volume de l'objet $\vec{\text{grad}}B$, une force volumique \vec{f}_V s'exerce sur lui et a pour expression :

$$\vec{f}_V = M_V \vec{\text{grad}}B$$

Le gradient de champ magnétique peut être généré par un aimant permanent, ce qui permet d'avoir accès aux propriétés statiques avec le dispositif du tensiomètre magnétique.

Un électroaimant peut également être utilisé. La force volumique d'écrasement peut facilement être modulée dans le temps, ce qui rend possible l'étude de la réponse mécanique en fonction de la fréquence de sollicitation. On parle alors de rhéomètre magnétique.

Les méthodes magnétiques développées durant cette thèse pour former des agrégats magnétiques et les soumettre à des contraintes mécaniques sont présentées dans le Chapitre I.4. Le Chapitre I.5 traite des mesures de tension de surface réalisées avec le tensiomètre magnétique ainsi que de l'étude de l'influence de la taille des sphéroïdes sur leur réponse mécanique. Enfin, le Chapitre I.6 se concentre sur les mesures rhéologiques temporelles et fréquentielles menées avec le rhéomètre magnétique, qui montrent que les agrégats obéissent à un comportement en loi puissance.

4 | Développement d'outils magnétiques pour l'étude de la mécanique des tissus

Sommaire

4.1 Moulage magnétique d'agrégats multicellulaires	35
4.1.1 Protocole	36
4.1.2 Cellules utilisées	36
4.1.3 Caractéristiques des agrégats obtenus	38
4.2 Le tensiomètre magnétique	41
4.2.1 Dispositif expérimental	42
4.2.2 Preuve de principe et étalonnage	42
4.2.3 Mesure de la tension de surface d'un agrégat multicellulaire	44
4.3 Le rhéomètre magnétique	44
4.3.1 Dispositif expérimental	44
4.3.2 Etalonnage	46
4.3.3 Traitement des films	51
4.3.4 Comparaison des deux dispositifs	51

Ce chapitre présente les différentes méthodes et dispositifs expérimentaux mis au point durant cette thèse pour étudier la mécanique des tissus biologiques. La méthode de formation des agrégats multicellulaires par moulage magnétique est d'abord présentée. Suivent ensuite les descriptions détaillées des deux dispositifs expérimentaux utilisés pour stimuler magnétiquement les agrégats, ainsi que leur étalonnage et caractérisation.

4.1 Moulage magnétique d'agrégats multicellulaires

Cette technique de moulage magnétique a été développée pour palier les limites des techniques classiques de formation d'agrégats, notamment concernant le contrôle de leur taille et de leur forme, tout en tirant profit des propriétés magnétiques des cellules marquées avec des nanoparticules. Le principe de la technique est simple : il s'agit de créer un moule d'agarose de forme choisie dans lequel les cellules sont déposées et maintenues par application d'une force magnétique. Le développement des liaisons intercellulaires crée ensuite la cohésion de l'ensemble.

4.1.1 Protocole

Le protocole de formation par moulage est résumé par la Figure I.4.1. Les étapes sont les suivantes :

1. Une fine couche d'une solution d'agarose (type I-B, Sigma) à 2% en masse dans du PBS portée à ébullition est coulée dans une boîte de culture cellulaire (1,8 mL pour une boîte de 35 mm de diamètre).
2. La boîte de culture est positionnée sur un réseau d'aimants permanents cylindriques en néodyme (diamètre 2 mm, hauteur 7 mm), puis une bille en acier de diamètre choisi (lavée à l'éthanol) est déposée dans la boîte de culture. Sa position est fixée par l'aimant permanent. Pour obtenir des agrégats cylindriques, il suffit d'utiliser un cylindre en acier à la place de la bille (diamètre 2 mm, hauteur 7 mm). Le tableau I.4.1 présente les diamètres des billes utilisées.
3. L'agarose se solidifie en refroidissant, la bille (respectivement le cylindre) peut être extraite de la couche d'agarose en utilisant un autre aimant. On obtient ainsi un moule hémisphérique (respectivement cylindrique). La surface du moule est traitée par une solution de PLL-PEG (SuSoS) à 1 mg/mL pendant une heure, puis est rincée au PBS et avec du milieu de culture. Ce traitement permet de rendre la surface du moule non adhérente aux cellules.
4. Après avoir rempli la cuve avec le milieu de culture, le nombre souhaité de cellules magnétiques est déposé dans un petit volume (environ 10 μL) à l'aide d'une micropipette au dessus du puits. L'aimant toujours présent sous le puits permet de guider et de compacter les cellules. Après 30 secondes l'aimant est retiré. Les cellules déposées ont au préalable été marquées magnétiquement avec les nanoparticules (voir précisions en 2.2.3 et les détails du protocole en Annexe A).
5. La boîte est enfin placée à l'incubateur à 37°C (5% CO_2) pendant au moins une vingtaine d'heures. Les contacts entre cellules se développent et l'assemblée de cellules prend la structure d'un tissu qui se contracte (diamètre final de l'agrégat plus petit que le diamètre du moule).

Les agrégats se démoulent ensuite facilement en effectuant de légers aller-retours avec une pipette ou en déformant la couche d'agarose à proximité.

4.1.2 Cellules utilisées

Deux types cellulaires ont été utilisés pour les expériences de mécanique des tissus.

Les cellules souches mésenchymateuses (MSC) Ce sont des cellules pluripotentes humaines extraites de la moelle épinière. Elles peuvent se différencier en de nombreux types cellulaires, notamment en cardiomyocytes, hépatocytes, ostéocytes et chondrocytes. L'équipe a déjà beaucoup travaillé sur la voie de chondrogénèse induite par le facteur de croissance $\text{TGF}\beta 3$ [36]. Ces cellules ont été utilisées dans les expériences avec le tensiomètre magnétique (Chapitre I.5) où elles ont servi à former des agrégats sphériques. Elles développent de fortes adhésions cellule-cellule ce qui favorise la formation de sphères. Les MSC supportent bien les conditions d'agrégation et les milieux pauvres en nutriments [112, 113]

Les cellules F9 C'est une lignée de cellules de carcinome embryonnaire murin. Ces cellules ont été utilisées dans les expériences avec le rhéomètre magnétique (Chapitre I.6) où elles ont servi à mouler des cylindres. La culture de ces cellules est plus facile et rapide que pour les MSC. Les agrégats de F9 ont moins tendance à s'arrondir que ceux de MSC (ce qui est confirmé par leur tension de surface plus faible $\gamma \simeq 5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ [85] que celle des MSC ($\gamma \simeq 18 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$)), il est donc plus facile de former des cylindres avec ces cellules. Elles sont également utilisées par d'autres équipes travaillant sur la mécanique des agrégats. C'est pourquoi elles ont été privilégiées pour le reste de l'étude.

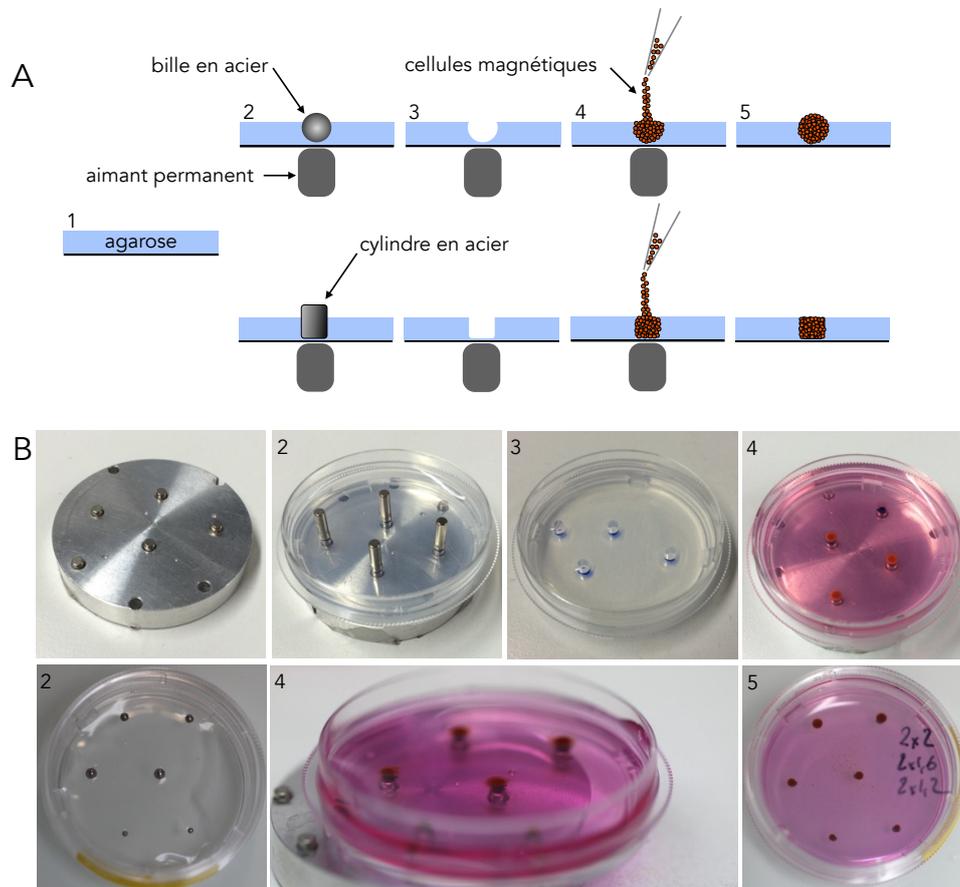


FIGURE I.4.1 – **Moulage magnétique d'agrégats multicellulaires** (A) Description du protocole de moulage magnétique. Une fine couche liquide d'une solution d'agarose à 2% est déposée dans une boîte de culture (1). Un aimant permanent est positionné sous la boîte de culture, une bille et/ou un cylindre en acier est déposé dans l'agarose (2). L'agarose refroidit et se solidifie, la bille et/ou le cylindre est retiré pour former le moule (3). Après traitement de la surface au PLL-PEG, les cellules qui ont été au préalable marquées magnétiquement sont déposées dans le moule (4). L'aimant est ensuite retiré et l'agrégat mis à maturer à 37°C (5% CO₂) (5). (B) Photos illustrant les différentes étapes du protocole de moulage magnétique indiquées par les numéros.

Diamètre de la bille (mm)	Nombre de cellules MSC	Diamètre moyen de l'agrégat (mm)
1,00	75.000	0,64
1,191	126.000	0,85
1,587	300.000	1,05
2	600.000	1,25
2,381	1.013.000	1,6
2,778	1.600.000	1,8

Tableau I.4.1 – Conditions utilisées pour la formation des sphéroïdes de cellules souches mésenchymateuses.

Nous avons également utilisé des lignées de F9 modifiées génétiquement, les F9^($\alpha^{-/-}$) qui n'expriment plus la protéine α caténine [114] et les F9 LifeAct chez qui la F-actine est marquée par la LifeAct, ce qui permet de visualiser les filaments d'actine. Ces deux lignées nous ont été données par S. Tlili.

4.1.3 Caractéristiques des agrégats obtenus

Taille et géométrie

La figure I.4.2 présente des agrégats fabriqués avec cette méthode. En utilisant des billes en acier de diamètres différents, il est possible d'obtenir des sphéroïdes de tailles variées (diamètres compris entre 600 μm et 1,8 mm) excédant la taille de ceux obtenus par les méthodes classiques (le plus souvent limitée à 300 μm). Les caractéristiques des sphéroïdes de MSC obtenus sont présentées dans le tableau I.4.1. Le contrôle précis de la taille ainsi que l'étendue des tailles accessibles seront mis à profit dans le chapitre I.5.

L'originalité de cette méthode réside également dans la variété des formes pouvant être obtenues. Les cylindres magnétiques seront utilisés dans le chapitre I.6 pour s'affranchir des non linéarités gouvernant le contact entre une sphère et un plan¹. Les cylindres font 2 mm de diamètre pour une hauteur d'environ 1mm et contiennent en moyenne 1 million de cellules.

Structure et viabilité du tissu

Des coupes d'agrégats (obtenue par cryosections, voir détails en Annexe A) ont été réalisées pour observer l'organisation et l'état des cellules au sein de l'agrégat, notamment pour s'assurer de la bonne cohésion du tissu et de l'absence de coeur nécrotique au centre de l'agrégat. Une mort cellulaire au centre des sphéroïdes est en effet souvent rapportée du fait de la mauvaise diffusion des nutriments et de l'oxygène (voir 2.1.2).

La figure I.4.3 présente des images de microscopie confocale où les noyaux, l'actine et les cadhérines sont marqués, dans différentes zones d'une coupe équatoriale d'un des plus gros sphéroïdes moulés. Les cellules ont une morphologie normale même au centre de l'agrégat. Cette observation est confirmée par la Figure I.4.4 qui compare les coupes marquées à l'hématoxyline et à l'éosine de deux agrégats, - un agrégat placé à 44°C pendant 30 minutes avant sa fixation pour induire l'apoptose des cellules (A) - et un agrégat dans les conditions normales de l'expérience (B). Des cellules dont le cytoplasme est quasi inexistant et dont le noyau apparaît très foncé, comme cela est visible pour (A), sont des cellules en train de mourir. En comparaison les cellules de l'agrégat (B) ont la morphologie de cellules normales et bien vivantes.

Concernant la structure du tissu, les deux marquages montrent que les cellules du tissu sont cohésives entre elles. Les cellules du centre de l'agrégat n'ont pas d'orientation spécifique tandis que celles de la périphérie sont alignées avec le bord de l'agrégat sur une épaisseur d'environ 150 μm . Les cellules en contact avec le milieu extérieur sont plus allongées que les cellules dans le sphéroïde. Ceci a déjà été observé et interprété comme étant dû à l'équilibre entre adhésion et tension corticale.

Aimantation des agrégats

Un pré-requis nécessaire aux mesures magnétiques développées dans cette thèse est l'homogénéité de l'aimantation au sein des agrégats afin de pouvoir exercer des forces homogènes. Les nanoparticules d'oxyde de fer sont visualisées au sein du tissu en marquant des coupes d'agrégat au bleu de Prusse (voir protocole en Annexe A.6). La Figure I.4.5 présente ainsi la répartition des nanoparticules dans l'agrégat.

1. Relation non linéaire entre la déformation et la contrainte appliquée du fait de la géométrie sphérique (contact de Hertz)

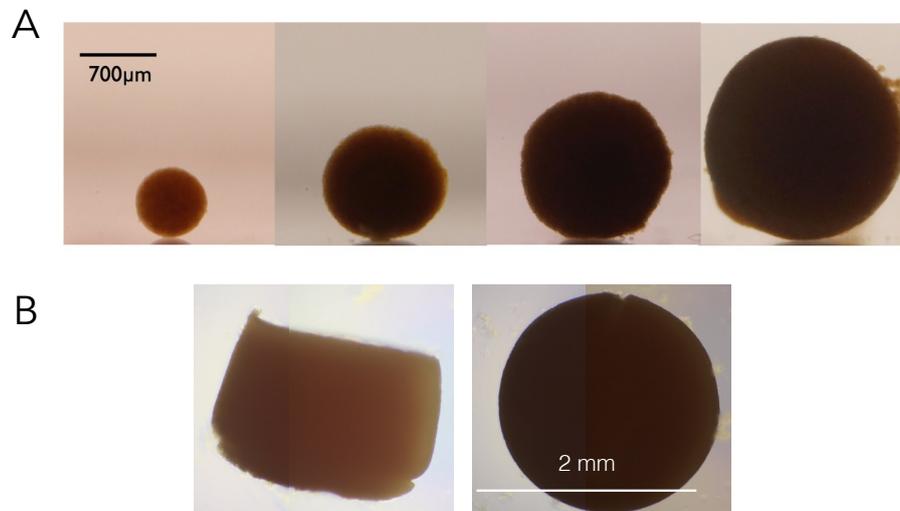


FIGURE I.4.2 – **Allure des agrégats magnétiques** (A) Agrégats sphériques de cellules souches mésenchymateuses (MSC) de taille variée. (B) Agrégat cylindrique de cellules F9, vue de côté (gauche) et vue de dessus (droite).

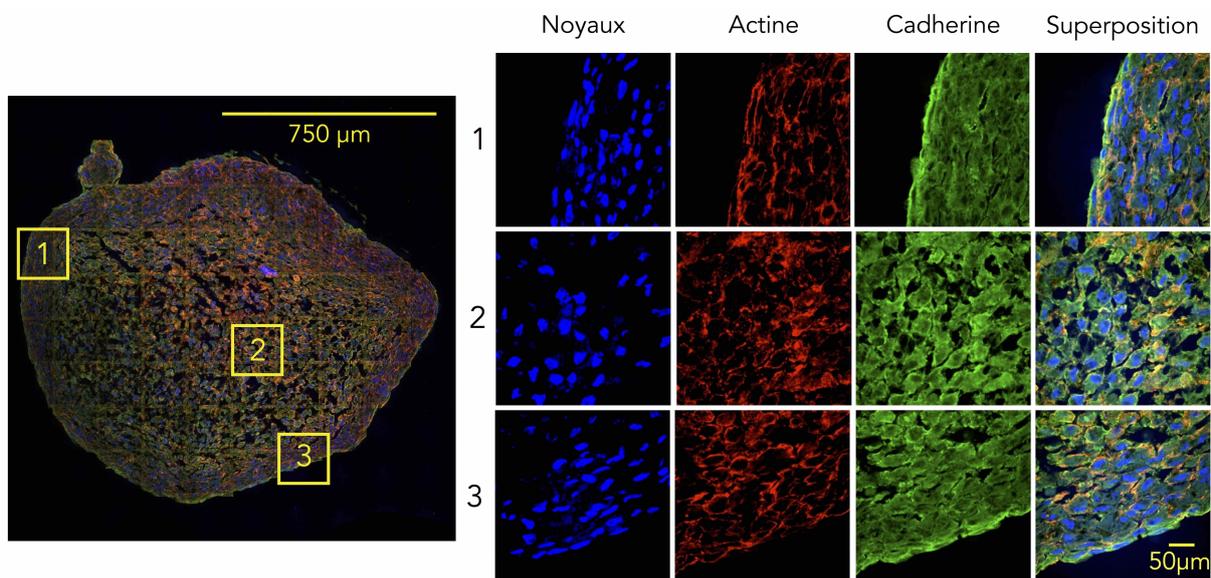


FIGURE I.4.3 – **Structure des agrégats magnétiques** Images de microscopie confocale d'une coupe équatoriale d'un agrégat sphérique de cellules MSC. Les noyaux marqués au DAPI apparaissent en bleu, les filaments d'actine marqués à la Phalloïdine apparaissent en rouge tandis que les cadhérines marquées par un anticorps spécifique apparaissent en vert. On peut remarquer certaines déchirures sur les coupes qui sont dues à la cryosection.

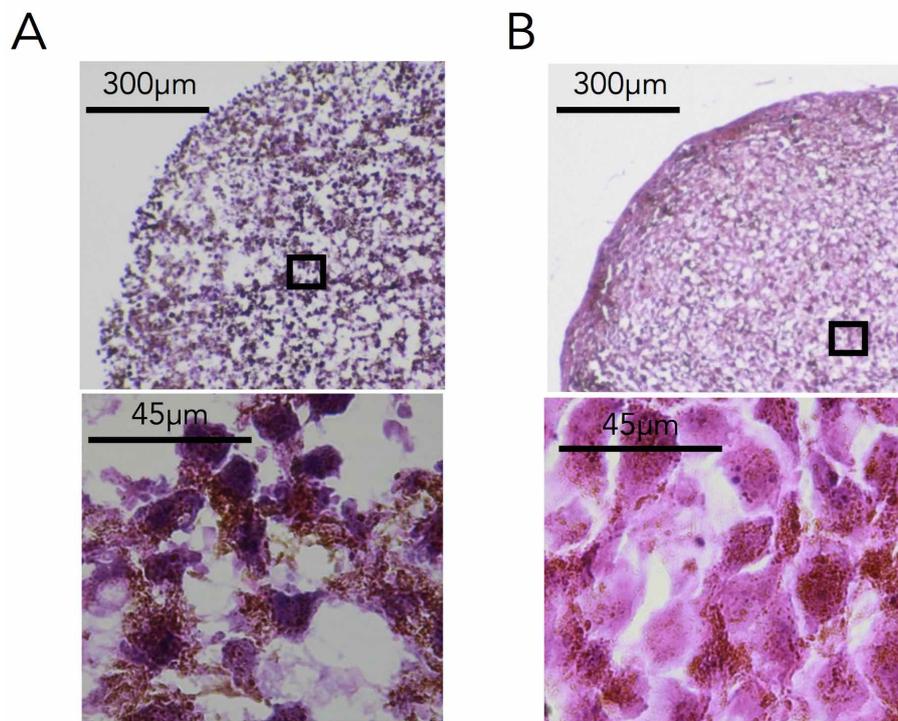


FIGURE I.4.4 – **Viabilité des cellules au coeur des agrégats** Images de coupes d'agrégats marquées à l'hématoxyline et à l'éosine. Le cytoplasme apparaît coloré en rose et les noyaux en violet. (A) Agrégat pour lequel la mort cellulaire a été induite par chauffage à 44°C pendant 30 minutes. (B) Agrégat dans les conditions normales de l'expérience.

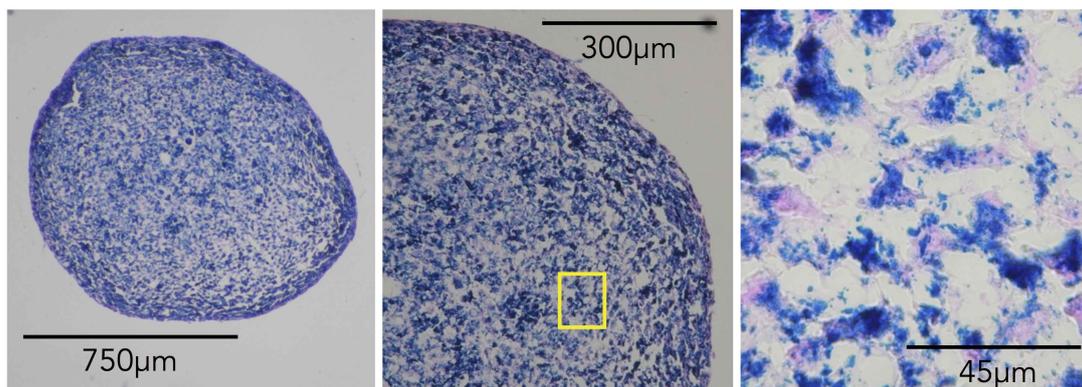


FIGURE I.4.5 – **Fer internalisé par l'agrégat** Images d'une coupe d'un agrégat sphérique de cellules MSC marquées au bleu de Prusse qui colore le fer en bleu.

Cette répartition est homogène, ce qui donne au tissu une aimantation volumique uniforme (M_V). L'aimantation des agrégats peut être mesurée par magnétophorèse. On place l'agrégat dans un gradient de champ magnétique calibré alors qu'il est plongé dans un liquide de viscosité connue. La traînée de Stokes ($R_e \simeq 10^{-4}$) compense la force magnétique, la mesure de la vitesse limite atteinte par l'agrégat ainsi que sa taille permettent de remonter à son aimantation. L'aimantation peut également être mesurée avec un magnétomètre. Ces deux méthodes sont décrites plus en détails en II.8.2.1.

Avec les conditions de marquage utilisées (voir Annexe A.2), l'aimantation volumique des sphéroïdes de MSC vaut $M_V = 470 \pm 100 \text{ A.m}^{-1}$ (masse de fer par cellule : $m_{Fe} = 26 \text{ pg}$) et celle des cylindres de F9 vaut $M_V = 103 \pm 16 \text{ A.m}^{-1}$ (masse de fer par cellule : $m_{Fe} = 3 \text{ pg}$). La capacité d'internalisation des cellules F9 est plus faible que pour les MSC et les cellules F9 sont plus petites que les MSC.

4.2 Le tensiomètre magnétique

Pour mesurer la tension de surface des agrégats en tirant profit de l'aimantation des cellules, nous avons développé un analogue magnétique des expériences de gouttes liquides pesantes (sous leur propre poids) ou de centrifugation de sphéroïdes (voir I.3.3.4). Les sphéroïdes magnétiques doivent être soumis à une force d'écrasement homogène à distance. Dans notre cas cette force sera d'origine magnétique, on peut parler de « super-gravité » magnétique. Le dispositif expérimental présenté ici est utilisé pour l'obtention des résultats du Chapitre I.5.

Le dispositif repose sur le principe suivant (voir I.3.4) : un objet d'aimantation volumique $M_V(B)$ placé dans un gradient de champ magnétique $\vec{grad}B$ homogène, vertical et dirigé vers le bas, subit une force volumique d'écrasement $\vec{f}_V = M_V \vec{grad}B$.

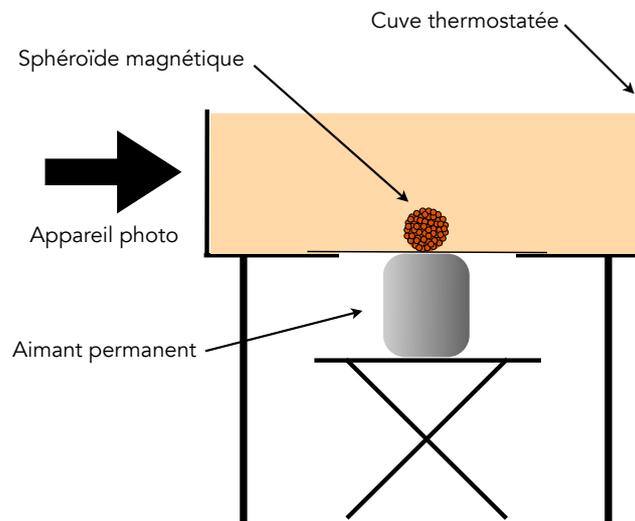


FIGURE I.4.6 – **Le tensiomètre magnétique : dispositif expérimental** L'agrégat sphérique est placé dans une cuve thermostatée à 37°C . Le fond de la cuve est constitué d'une lamelle en verre. Un aimant permanent est placé au contact de la lamelle grâce à un support élévateur. Les images de l'écrasement du sphéroïde sont prises sur le côté de la cuve par un appareil photo.

4.2.1 Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental du tensiomètre magnétique est présenté sur la figure 1.4.6. Il est constitué d'une cuve thermostatée à 37°C, remplie de milieu DMEM incolore. Le fond est une lamelle de microscope rendue non adhérente aux cellules donc non mouillante pour les agrégats par un traitement au PEG. Pour cela, une solution de PLL-PEG 1 mg/mL dans de l'HEPES 5 mM est déposée pendant une heure sur la lamelle puis rincée au PBS. Deux côtés opposés de la cuve sont également des lamelles de microscope pour permettre la prise de clichés par un appareil photo Canon EOS 60D équipé d'un objectif MP-E 65mm 1 :2,8. Un aimant permanent cylindrique en néodyme (6 mm de diamètre pour 6 mm de hauteur) est positionné sous le fond de la cuve au contact de la lamelle grâce à un support élévateur. Le champ magnétique créé par l'aimant au contact de la lamelle vaut 470 mT. Le gradient de champ magnétique est homogène dans un volume de 2 mm sur 2 mm et vaut 230 T/m.

Le choix de l'aimant a été très important. J'ai cartographié le champ magnétique de différents aimants (rapports d'aspects variables) grâce à un gaussmètre fixé sur un déplacement micrométrique 3 axes. L'aimant retenu présentait les meilleures homogénéité et intensité du gradient de champ magnétique. Il est important de noter que la sonde à effet Hall du gaussmètre utilisé faisait 1 mm², elle intégrait donc le champ magnétique sur une taille de l'ordre de la taille de la zone de travail. Un autre étalonnage a été réalisé en mesurant la tension de surface d'un système modèle pour confirmer l'homogénéité et la valeur du gradient de champ magnétique.

4.2.2 Preuve de principe et étalonnage

Pour valider cette méthode de mesure de la tension de surface, notamment l'homogénéité de la super-gravité, nous avons mesuré la tension de surface d'un système inerte modèle : des gouttes de ferrofluide (suspension colloïdale aqueuse des nanoparticules utilisées pour le marquage cellulaire) dans un bain d'huile silicone. Les gouttes utilisées sont de petite taille (entre 1 et 5 μL soit des rayons de 600 μm à 1 mm), inférieure à la longueur capillaire gravitaire ($\kappa_{grav}^{-1} = (\gamma/\Delta\rho g)^{1/2} \simeq 6 \text{ mm}$), de telle sorte qu'elles soient sphériques sous gravité normale (voir Figure 1.4.7.A). Lorsque l'aimant est mis au contact du fond de la cuve, la goutte se déforme (Figure 1.4.7.B) car la taille des gouttes est maintenant de l'ordre de grandeur de la longueur capillaire magnétique ($\kappa_{mag}^{-1} = (\gamma/f_V)^{1/2}$ varie de 1,5 à 0,6 mm selon la concentration en ferrofluide). Le profil peut être ajusté par le profil théorique d'une goutte pesante dans un champ de force homogène en condition non mouillante (la lamelle du fond de la cuve ayant été traitée pour être super-hydrophobe, voir protocole en Annexe A). Il est obtenu en intégrant numériquement les équations de Laplace pour la capillarité. Le détail des équations est présenté en Annexe B. L'aimantation de la goutte étant connue (concentration en nanoparticules connue), la détermination des paramètres de l'ajustement $c = f_V/\gamma$ et d permet de mesurer la tension de surface γ du système. Les plus grosses gouttes testées (5 μL) ont un volume supérieur à celui des sphéroïdes. Le fait que le profil de la goutte sous super-gravité puisse être ajusté par le profil théorique valide l'hypothèse de l'homogénéité du gradient de champ dans le volume de travail.

D'autre part, pour vérifier l'exactitude de la mesure obtenue sous super-gravité et donc valider la mesure de la valeur du gradient de champ magnétique, nous avons mesuré la tension de surface du même système par la méthode plus classique de la goutte pesante sous gravité normale en déposant des gouttes de taille de l'ordre de la longueur capillaire, voire supérieure à cette longueur (400, 800 et 1000 μL soit des rayons de 4,6 à 7,2 mm). Ces gouttes se déforment donc en l'absence de champ magnétique et leur profil peut être ajusté comme décrit précédemment. La force volumique responsable de l'écrasement de la goutte s'écrit : $f_V = \Delta\rho g$, où $\Delta\rho$ est la différence de masse volumique entre l'huile et le ferrofluide et g l'accélération de la pesanteur. La Figure 1.4.8 illustre cette expérience. Le tableau 1.4.2 résume les différentes mesures effectuées.

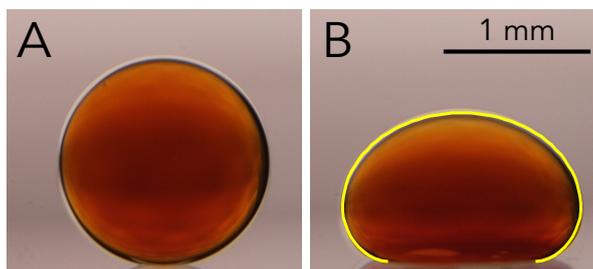


FIGURE I.4.7 – **Goutte de ferrofluide sous super-gravité magnétique** Goutte de ferrofluide (125 mM) dans l'huile silicone (A) en l'absence de l'aimant et (B) après application de la force magnétique. La longueur capillaire gravitaire du système vaut $\kappa_{grav}^{-1} = (\gamma/\Delta\rho g)^{1/2} \simeq 6$ mm, la goutte sous gravité normale est sphérique. La longueur capillaire magnétique est elle égale à $\kappa_{mag}^{-1} = (\gamma/f_V)^{1/2} \simeq 1,5$ mm, la goutte est donc déformée sous super-gravité. Le profil de la goutte écrasée est ajustée par le profil d'une goutte pesante (en jaune).

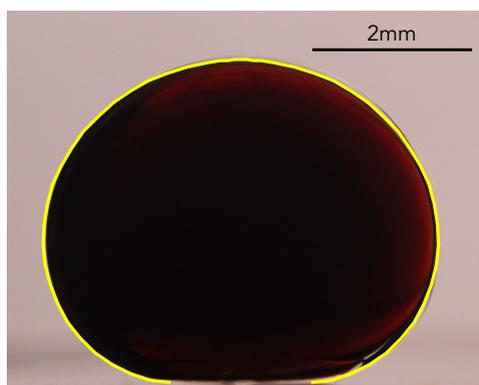


FIGURE I.4.8 – **Goutte pesante de ferrofluide** Goutte de ferrofluide (400 μ L, [Fe]= 125 mM) de taille de l'ordre de la longueur capillaire dans l'huile silicone en absence de l'aimant. La longueur capillaire gravitaire du système vaut $\kappa_{grav}^{-1} = (\gamma/\Delta\rho g)^{1/2} \simeq 6$ mm, la goutte sous gravité normale est donc déformée. Le profil de la goutte est ajustée par le profil d'une goutte pesante (en jaune).

Concentration ferrofluide	Tension surface témoin	Volume de la goutte	Tension de surface mesurée
125 mM	62 mN.m^{-1}	1 μ L	$58 \pm 3 \text{ mN.m}^{-1}$
		5 μ L	$60 \pm 3 \text{ mN.m}^{-1}$
250 mM	54 mN.m^{-1}	1 μ L	$55 \pm 2 \text{ mN.m}^{-1}$
		5 μ L	$51 \pm 2 \text{ mN.m}^{-1}$
500 mM	50 mN.m^{-1}	1 μ L	$49 \pm 2 \text{ mN.m}^{-1}$
		5 μ L	$50 \pm 2 \text{ mN.m}^{-1}$

Tableau I.4.2 – **Tensions de surface du ferrofluide** Résumé des différentes mesures de tension de surface du système ferrofluide/huile silicone pour différentes valeurs de la concentration du ferrofluide (en fer) et différents volumes de goutte, par la méthode d'écrasement magnétique. La valeur témoin correspond à la mesure par goutte pesante classique.

L'accord entre les deux mesures est très bon et valide cette méthode de mesure de la tension de surface en appliquant une super-gravité magnétique.

4.2.3 Mesure de la tension de surface d'un agrégat multicellulaire

Pour mesurer la tension de surface d'un agrégat, le déroulement de l'expérience est le suivant : environ une vingtaine d'heures après le moulage (temps nécessaire pour la formation des contacts entre cellules et l'obtention d'un agrégat lisse), le sphéroïde est d'abord placé dans la cuve en l'absence de l'aimant permanent, puis l'aimant est rapidement mis au contact du fond de la cuve sous l'agrégat (temps d'approche ≤ 2 secondes). La synchronisation se fait par enregistrement de l'instant de contact de l'aimant avec le fond de la cuve. Des clichés du sphéroïde sont pris sous gravité normale et à intervalle régulier au cours de l'écrasement magnétique, jusqu'à ce que l'équilibre mécanique soit atteint et que le profil du sphéroïde n'évolue plus au cours du temps.

4.3 Le rhéomètre magnétique

Le tensiomètre magnétique permet de mesurer les propriétés statiques d'un sphéroïde (tension de surface). Nous avons voulu avoir accès à la réponse dynamique des tissus magnétiques étudiés. Cela implique de pouvoir exercer une contrainte avec n'importe quelle dépendance temporelle et d'acquérir les déformations du tissu à plus hautes fréquences. Les champs alternatifs générés par un électroaimant sont plus faibles que ceux créés par des aimants permanents. Il a donc fallu adapter les méthodes de détection et de synchronisation. Le dispositif décrit dans cette partie est utilisé dans le Chapitre I.6.

4.3.1 Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental (présenté sur la Figure I.4.9) utilisé est similaire à celui du tensiomètre magnétique (voir I.4.2). Il utilise la même cuve thermostatée mais l'aimant permanent est remplacé par un électroaimant. Cet électroaimant est constitué d'une bobine (6Ω , 14 mH, fabriquée au laboratoire et refroidie par circulation d'eau), avec dans son entrefer une pièce polaire cylindrique (hauteur : 85 mm, diamètre : 55 mm) en fer doux pour canaliser les lignes de champ magnétique. La géométrie de l'extrémité supérieure de la pièce en fer doux a été optimisée (réduction du diamètre (5 mm) de la partie qui arrive à 3 mm du fond de la cuve) pour maximiser la valeur du gradient de champ magnétique et son homogénéité dans le volume de travail. L'électroaimant est commandé en tension par un générateur de signaux TGA 1242 (Aim&TTi) via un amplificateur (Kepco BOP). Les différents signaux utilisés sont créés sur l'interface Waveform Manager Plus puis transférés au générateur de signaux. Pour synchroniser le film et le signal de déformation, un générateur d'impulsions TGP110 (Aim&TTi), déclenché sur le signal de synchronisation externe du générateur de signaux, alimente une diode placée derrière la cuve sur le chemin optique de la caméra. La largeur de l'impulsion est réglée de telle sorte qu'une seule image du film soit surexposée au début de chaque séquence de déformation. Ceci permet de repérer précisément le début de la séquence d'écrasement sur le film. L'erreur faite sur la synchronisation est au plus de $\Delta t = 1/f_{camera}$.

Les films de la déformation de l'agrégat sont réalisés avec une caméra rapide Phantom v9.1 (entre 10 et 100 images par seconde).

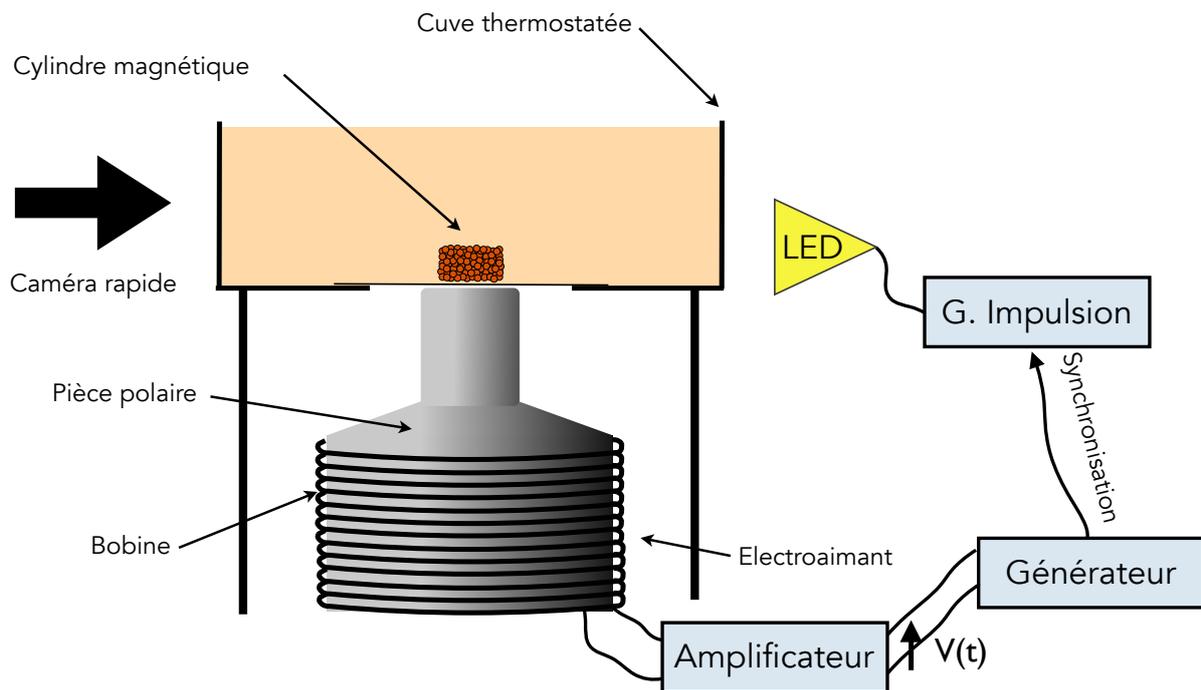


FIGURE I.4.9 – **Le rhéomètre magnétique : dispositif expérimental** L'agrégat cylindrique est placé dans une cuve thermostatée à 37°C. L'électroaimant constitué d'une pièce polaire placée au centre d'une bobine, est positionné sous la cuve. Le haut de la pièce polaire est à 3 mm de l'agrégat. La bobine est contrôlée en tension par le générateur via l'amplificateur. Les déformations de l'agrégat sont enregistrées à la caméra rapide. Les images sont synchronisées avec la déformation par une diode (LED) qui surexpose une image au $t = 0$ de chaque expérience.

4.3.2 Etalonnage

Plusieurs étapes de caractérisation du système expérimental ont été nécessaires afin de savoir quelle tension appliquer pour obtenir la contrainte dépendant du temps souhaitée. Les caractéristiques statiques sont d'abord présentées, avant d'étudier la réponse en fréquence du montage. Ceci permet enfin de déterminer la méthode de construction du signal de tension à appliquer.

Champ magnétique et gradient généré

Du fait de la géométrie cylindrique de l'expérience, le champ magnétique $B(r,z)$ créé au dessus de la pièce polaire est seulement une fonction de la distance à l'axe de la pièce polaire (r) et de la position le long de cet axe (z). Le volume de travail dans lequel est placé l'objet soumis à la force magnétique est centré sur l'axe de la bobine et s'étend légèrement au voisinage de l'axe. Dans cette zone $\vec{B} \approx B_z \vec{e}_z$ et $\partial B_z / \partial r \ll \partial B_z / \partial z$, ainsi B_z et $\partial B_z / \partial z$ sont des fonctions de z à intensité du courant fixée. On peut donc faire l'approximation que $\text{grad} \|\vec{B}\| / \|\vec{B}\|$ est seulement une fonction de z .

Le champ magnétique créé par l'électroaimant a été mesuré en fonction de la distance à l'extrémité supérieure de la pièce polaire et de la tension appliquée aux bornes de l'amplificateur (Figure I.4.10A et B). Lors des expériences, le centre de l'agrégat se situe à 3 mm du sommet de la pièce polaire. La relation entre le champ magnétique créé et la tension appliquée est linéaire.

Ces mesures permettent de calculer le gradient de champ magnétique. On retrouve bien expérimentalement que : $\frac{\text{grad} \|\vec{B}\|}{\|\vec{B}\|} = \vec{\beta}(z)$ (voir Figure I.4.10.C). Dans toute la suite on utilisera implicitement la norme de β à $z = 3$ mm ($\beta = 0,24 \text{ mm}^{-1}$).

Mesure de la force volumique magnétique

La mesure du gradient de champ magnétique dans le volume de travail, ainsi que la connaissance de l'aimantation volumique de l'objet à déformer (M_V) permettent de calculer la force magnétique d'écrasement par unité de volume (f_V) :

$$f_V(B) = M_V \frac{dB}{dz}$$

Pour vérifier expérimentalement que la force volumique générée par l'électroaimant vérifie cette expression, nous avons utilisé la même méthode que pour l'étalonnage du tensiomètre (I.4.2.2), en écrasant sous super-gravité magnétique des gouttes de ferrofluide² de concentrations et de tailles différentes ([Fe] = 625 et 1250 mM, V = 0,6 / 1,5 et 4,5 μL), immergées dans un bain d'huile silicone. La connaissance de la concentration de la goutte et du champ auquel elle est soumise permet de déterminer son aimantation à partir de la courbe d'aimantation du ferrofluide (2.2.2). La Figure I.4.11 présente les profils de gouttes de différentes tailles soumises à une force magnétique variable. Ces profils peuvent être ajustés par les profils théoriques de gouttes non mouillantes dans un champ de force homogène (voir détails en Annexe B). Ceci montre que le gradient de champ magnétique est suffisamment homogène dans le volume de travail (les cylindres magnétiques utilisés sont de taille inférieure à la goutte de 4,5 μL). La tension de surface γ du système ferrofluide/huile est mesurée de manière indépendante (méthode de goutte pesante classique), ce qui permet de déterminer la force volumique appliquée à partir du paramètre $c = \kappa^2 = f_V / \gamma$ issu de l'ajustement des profils. L'accord entre les valeurs calculées et obtenues expérimentalement est très bon.

2. suspension aqueuse des nanoparticules servant au marquage des cellules

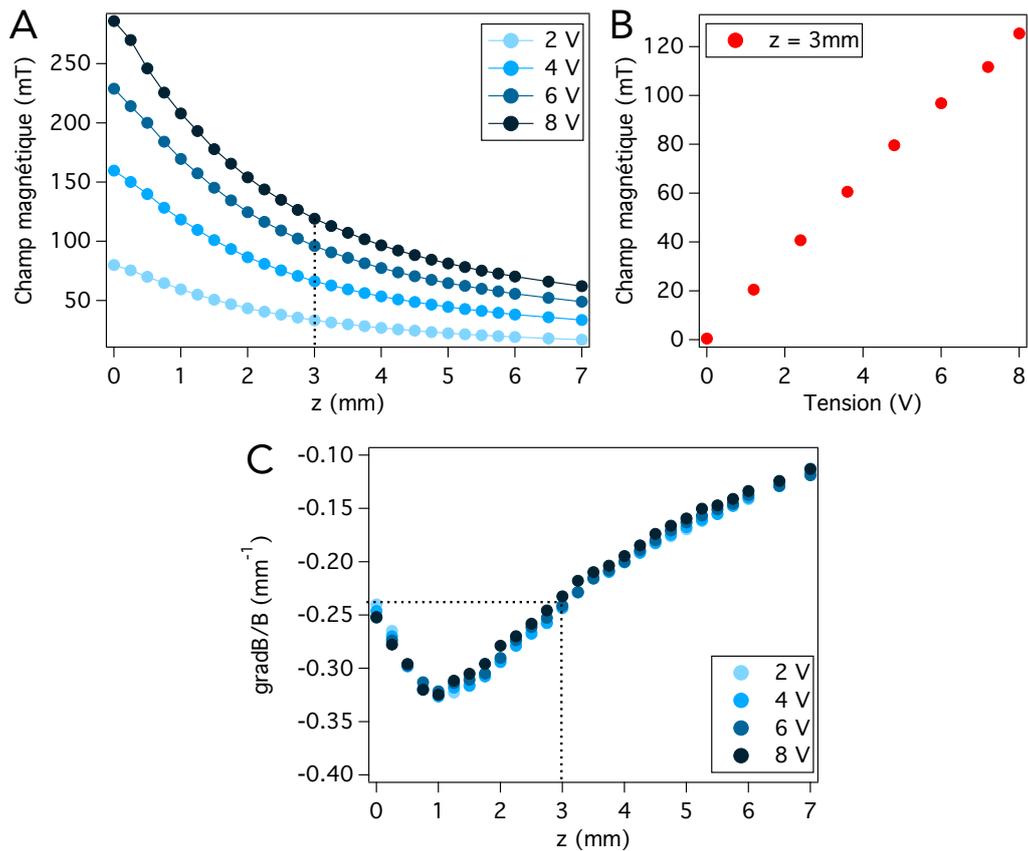


FIGURE I.4.10 – **Champ magnétique et gradient créés par l'électroaimant** (A) Mesure de la valeur du champ magnétique créé sur l'axe de l'électroaimant en fonction de la distance à la pièce polaire et de la tension appliquée aux bornes de l'amplificateur. Les pointillés indiquent la distance de travail. (B) Valeur du champ magnétique à l'altitude de travail ($z = 3\text{mm}$) en fonction de la tension appliquée. (C) Gradient du champ magnétique créé par l'électroaimant normalisé par la valeur du champ en fonction de la distance à la pièce polaire et de la tension appliquée aux bornes de l'amplificateur. Les pointillés indiquent la distance de travail.

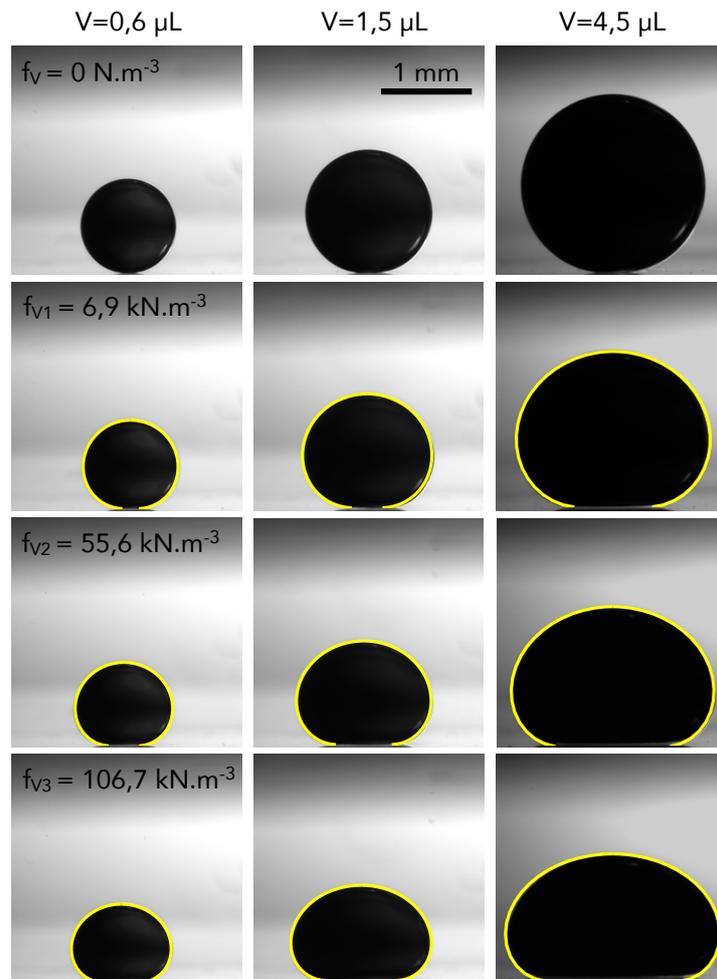


FIGURE I.4.11 – **Ecrasement des gouttes de ferrofluides** Gouttes de ferrofluides ($[\text{Fe}] = 1250 \text{ mM}$) de différents volumes ($V = 0,6 / 1,5 / 4,5 \mu\text{L}$) dans de l'huile silicone soumises à une force volumique croissante (sous gravité normale, $f_{V1} = 6,9 \text{ kN.m}^{-3}$, $f_{V2} = 55,6 \text{ kN.m}^{-3}$ et $f_{V3} = 106,7 \text{ kN.m}^{-3}$) correspondant respectivement à une tension imposée aux bornes de l'amplificateur de 0 / 1,2 / 4,8 et 8 Volts. Le profil capillaire théorique obtenu par ajustement du profil expérimental est superposé en jaune.

Réponse du montage

La fonction de réponse du montage a été déterminée en mesurant à l'aide d'un gaussmètre (Kosvaha5 Wuntronic contrôlé par une carte d'acquisition NI USB-6001) le champ magnétique créé sur l'axe de la bobine, au contact du sommet de la pièce polaire, pour une consigne sinusoïdale de fréquence variable (entre 0,1 et 100 Hz). Le module et la phase de la fonction de réponse de l'ensemble amplificateur et électroaimant sont présentés sur la Figure I.4.12.A et B. Le montage se comporte comme un filtre passe bas dont la fréquence de coupure est supérieure à 10 Hz. Ceci est confirmé par la mesure de la réponse du montage à un créneau de tension (voir Figure I.4.12.C) où l'on voit que le temps de réponse est inférieur à 100 ms. A 10 ms $B/B_{final} = 78\%$ et à 20 ms $B/B_{final} = 96\%$. Cela implique qu'il est inutile de filmer la déformation des cylindres à plus de 100 images par seconde.

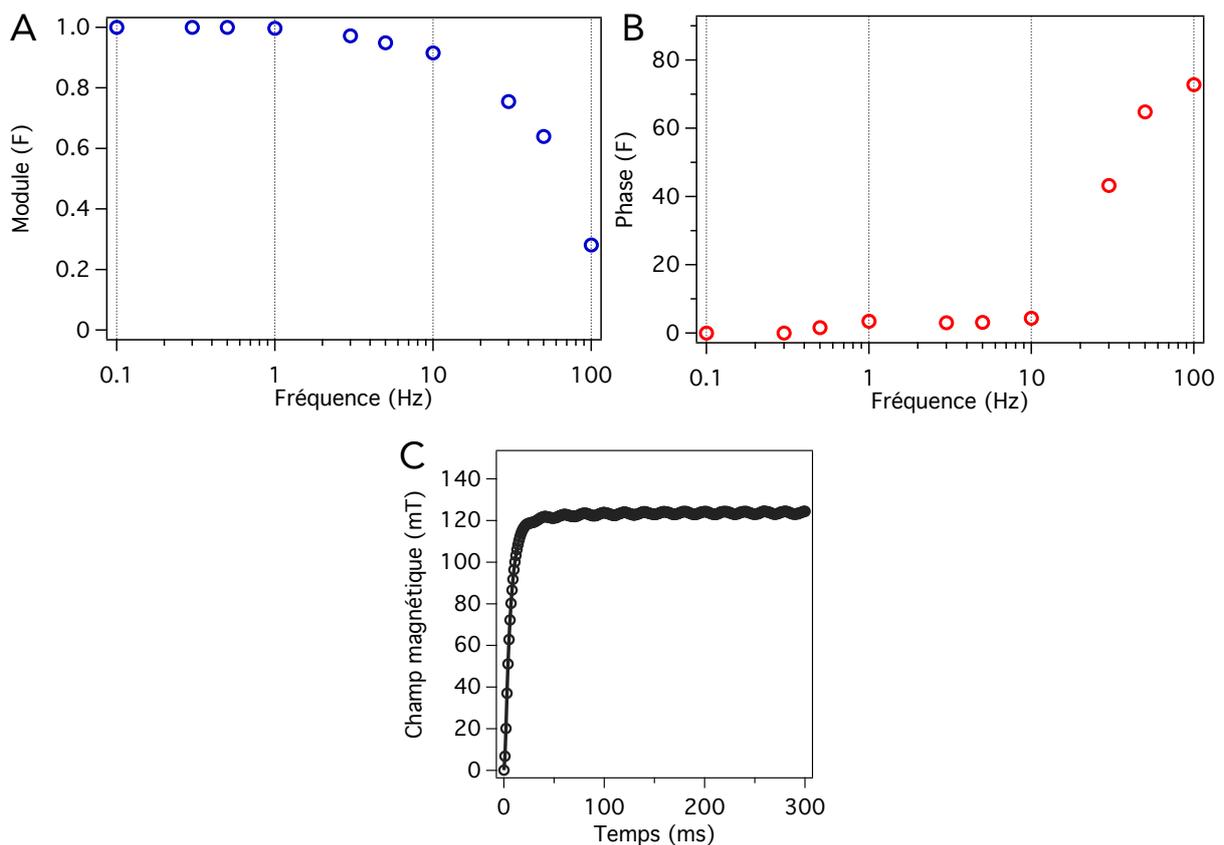


FIGURE I.4.12 – **Réponse du montage** (A) Module et (B) phase (en degré) de la fonction de réponse de l'ensemble amplificateur et électroaimant. (C) Temps de réponse du montage. Champ magnétique mesuré à 3 mm du sommet de la pièce polaire en réponse à un créneau de tension d'amplitude 8 Volts appliqué aux bornes de l'amplificateur (début du créneau à $t = 0$ s).

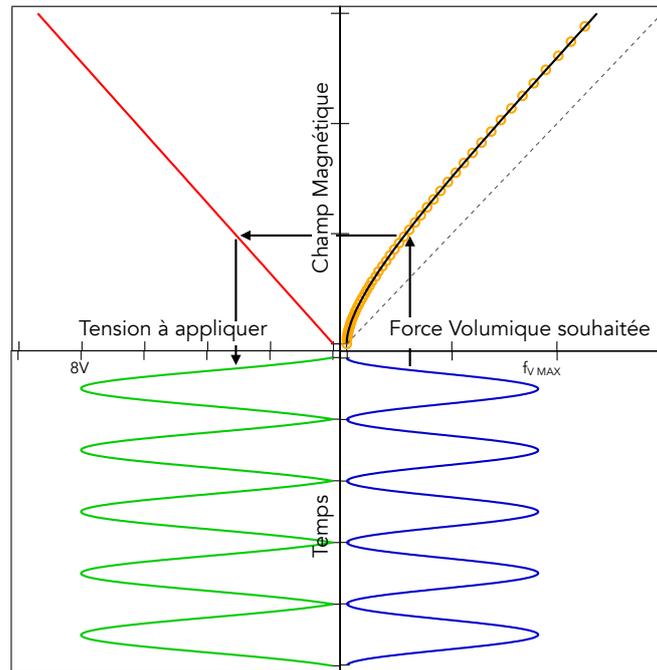


FIGURE I.4.13 – **Construction d'un signal d'amplitude variable** Résumé du principe de construction du signal de tension à appliquer aux bornes de l'amplificateur (en vert) pour obtenir la force volumique dépendant du temps souhaitée (en bleu). Dans l'exemple présenté, il s'agit d'une sinusoïde de fréquence 0,5 Hz variant entre zéro et la force volumique maximale pouvant être atteinte par le système (correspond à une tension de 8 Volts). Pour chaque valeur de la force volumique, on détermine la valeur du champ magnétique à appliquer, en se servant de la relation non linéaire entre B et $f_V \propto (M/M_s)(B)\beta$ (les points expérimentaux sont tracés en orange et ajustés par $B(x) = 0,184x^{1/2} + 0,664x + 0,507x^2$ tracé en noir). On détermine ensuite la tension correspondante grâce à la relation linéaire entre B et V (en rouge). Les flèches matérialisent graphiquement la procédure de construction.

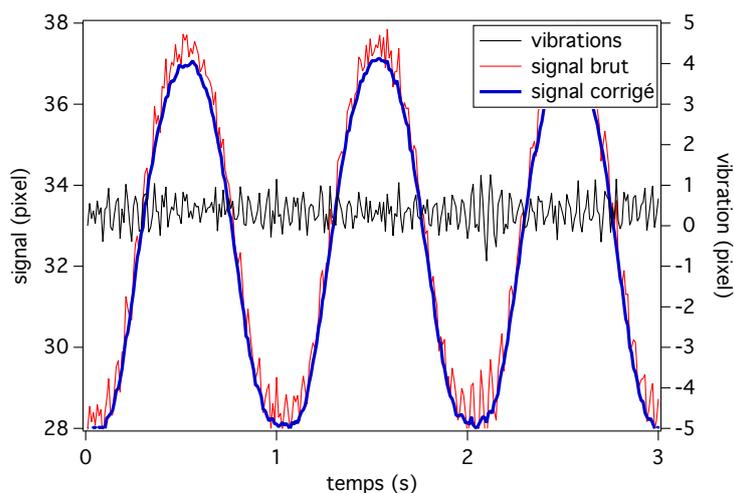


FIGURE I.4.14 – **Soustraction des vibrations** Exemple de l'effet du traitement de soustraction des vibrations de la cuve sur le signal de déformation sinusoïdale de l'interface d'un agrégat.

Construction des signaux

La valeur de l'aimantation des nanoparticules dépend du champ magnétique appliqué de manière non linéaire (voir courbe d'aimantation en 2.2.2). Il faut prendre en compte cette non linéarité lorsque l'on cherche à déterminer quelle est la tension $V(t)$ à appliquer au système pour obtenir la force volumique $f_V(t)$ souhaitée. La force volumique s'écrit :

$$f_V(t) = M_V(B) \text{grad} B = \left(\frac{M}{M_s} \right) (B(V(t))) M_V^{\text{sat}} \beta B(V(t))$$

où $(M/M_s)(B)$ est la courbe d'aimantation normalisée des nanoparticules et M_V^{sat} est l'aimantation volumique à saturation de l'échantillon. La non linéarité de la relation entre $B(t)$ et $V(t)$ est contenue dans $(M/M_s)(B)B$. Cette relation est représentée graphiquement sur le cadran en haut à droite de la Figure I.4.13. Les points expérimentaux sont correctement ajustés par une somme de puissances 1/2, 1 et 2 (expression en légende de la figure). Ceci permet de calculer quel champ magnétique appliquer pour n'importe quelle force souhaitée. La Figure I.4.13 résume le processus de construction du signal de tension pour obtenir une force volumique d'amplitude variable :

1. A partir du signal $f_V(t)$ souhaité (en bleu) on détermine le champ magnétique correspondant grâce à $(M/M_s)(B)B$.
2. On détermine ensuite la tension $V(t)$ (en rouge) à appliquer pour générer ce $B(t)$ (par la relation linéaire).
3. Ce signal $V(t)$ est ensuite envoyé et stocké dans le générateur de signaux.

Le signal est surtout déformé pour les petites valeurs de force volumique.

Pour un signal au spectre plus riche, il faut également prendre en compte l'atténuation du montage sur les hautes fréquences, même si elle est relativement faible (9% à 10 Hz).

4.3.3 Traitement des films

Les films de déformation de l'agrégat sont traités par un algorithme de « tracking » sous ImageJ développé par Olivier Cardoso au laboratoire. Les mouvements de l'interface de l'agrégat sont détectés par corrélation de deux images successives. En parallèle, on suit le mouvement d'objets fixes (cellule ou poussière) adsorbés sur la lamelle au fond de la cuve à côté de l'agrégat. Ces mouvements sont causés par des vibrations parasites de l'ensemble du montage qui sont principalement dues à la circulation d'eau servant à thermostatier la cuve. La soustraction de ces vibrations permet d'améliorer grandement la qualité du signal. L'effet de ce traitement est présenté sur la Figure I.4.14. La précision obtenue pour le tracking de l'interface d'un sphéroïde est de l'ordre de $\pm 0,5 \mu\text{m}$.

4.3.4 Comparaison des deux dispositifs

Le rhéomètre développé répond aux attentes initiales, il permet d'exercer à distance une force magnétique contrôlée et variable dans le temps. Ce dispositif permet d'avoir accès à la réponse dynamique du matériau étudié jusqu'à des fréquences de l'ordre de quelques dizaines de Hertz. Néanmoins ce dispositif génère des forces volumiques plus faibles que le tensiomètre.

5 | Comportement liquide des tissus biologiques

Sommaire

5.1	Mesure de la tension de surface de sphéroïdes	53
5.2	Transition élasto-capillaire	55
5.2.1	Observation expérimentale	56
5.2.2	Rayon critique	58
5.3	Discussion	61
5.4	Conclusion	62

Ce chapitre présente les résultats obtenus avec l'expérience du tensiomètre magnétique dont le dispositif expérimental est décrit en I.4.2. Ces résultats ont été publiés dans *Physical Review Letters* en 2015 [115]. L'article est présenté en Annexe D. On s'attachera à montrer comment nous avons pu mesurer la tension de surface de sphéroïdes de cellules souches mésenchymateuses. Tirant profit des possibilités offertes par la méthode de moulage magnétique, nous avons également étudié l'effet de la taille des sphéroïdes sur leur réponse mécanique en mettant en évidence une transition élastocapillaire.

5.1 Mesure de la tension de surface de sphéroïdes

Contrairement à la goutte de ferrofluide qui se déforme instantanément pour atteindre l'équilibre mécanique gouverné par l'équilibre entre la force d'écrasement magnétique et les effets capillaires, la déformation d'un sphéroïde présente une dynamique plus lente. Néanmoins si l'on attend suffisamment longtemps, typiquement une heure (T^∞), la forme du sphéroïde n'évolue plus. Il a atteint l'équilibre mécanique. On peut alors ajuster le profil expérimental du sphéroïde avec un profil calculé numériquement à partir des équations de la capillarité en situation de non-mouillage. La figure I.5.1.A montre un sphéroïde avant application de la force magnétique (T_0^-) et ce même sphéroïde sous super-gravité magnétique une fois qu'il a atteint l'équilibre mécanique (T^∞). La tension de surface obtenue par l'ajustement est de $\gamma = 18 \pm 7 \text{ mN.m}^{-1}$ (moyenne sur 13 sphéroïdes). Cette valeur est indépendante de la taille initiale du sphéroïde.

Il est également possible de décrire la déformation du sphéroïde par trois paramètres, sa hauteur (h), le rayon de la zone de contact (L) et son rayon initial (R) qui sont définis sur la Figure I.5.1.B. La figure I.5.1.C (respectivement D) présente le rayon de la zone de contact (respectivement la hauteur) normalisé par la longueur capillaire magnétique $\kappa^{-1} = (\gamma/f_V)^{1/2} = 390 \text{ }\mu\text{m}$ en fonction du rayon initial du sphéroïde lui aussi normalisé. La figure regroupe les mesures effectuées sur les gouttes de ferrofluide

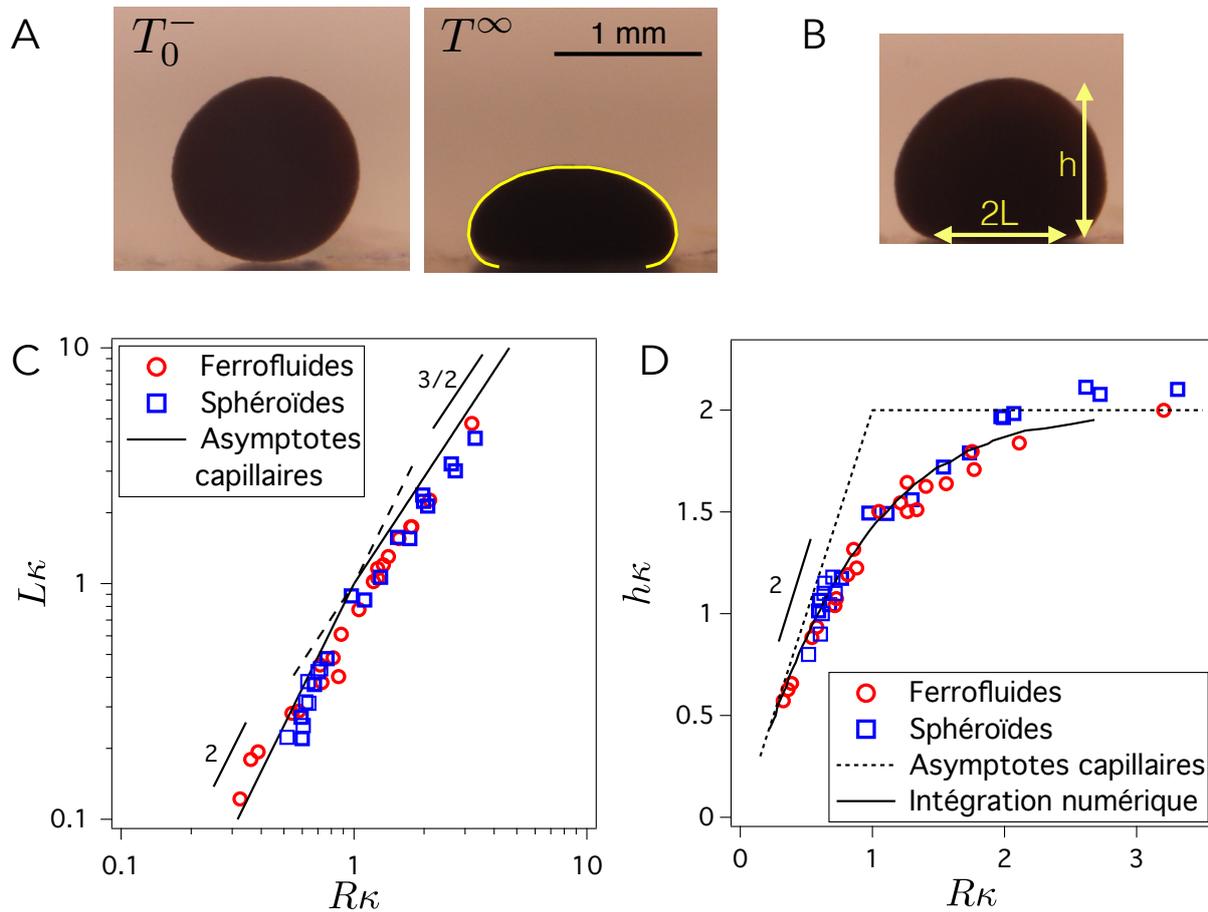


FIGURE I.5.1 – **Tension de surface des sphéroïdes** (A) Sphéroïde avant application de la force magnétique (T_0^-) et sous super-gravité magnétique une fois que l'équilibre mécanique est atteint (T^∞). Le profil calculé et ajusté numériquement à partir des lois capillaires est superposé en jaune. (B) Définition des paramètres de déformation d'un sphéroïde, sa hauteur (h) et le rayon de la zone de contact (L). Rayon de la zone de contact (C) et hauteur (D) de gouttes de ferrofluide et de sphéroïdes à l'équilibre mécanique (T^∞) en fonction de leur rayon initial. Toutes les longueurs sont normalisées par la longueur capillaire κ^{-1} . Les lois capillaires asymptotiques ainsi que les résultats de l'intégration numérique de ces lois sont présentées sur le graphe.

et sur les sphéroïdes à T^∞ . On observe que les deux systèmes suivent le même comportement régi par les lois de la capillarité. On peut en effet dériver de la loi de Laplace pour la capillarité les comportements asymptotiques pour h et L en fonction de R [116], comme présenté ci-dessous :

Goutte quasi-sphérique Pour $R \ll \kappa^{-1}$ les effets capillaires prédominent et le sphéroïde ou la goutte demeure sphérique (exposant s dans les notations qui suivent). La hauteur h_{cap}^s vaut donc $2R$, ainsi :

$$h_{cap}^s \kappa = 2R \kappa \quad (5.1.1)$$

Le rayon de la zone de contact L_{cap}^s varie comme :

$$L_{cap}^s \simeq \sqrt{2/3} R^2 (f_V/\gamma)^{1/2} \quad (5.1.2)$$

On obtient ce résultat en écrivant l'équilibre des forces au niveau de la zone de contact. Ainsi :

$$L_{cap}^s \kappa \propto (R\kappa)^2 \quad (5.1.3)$$

Flaque Dans le cas où $R \gg \kappa^{-1}$, les effets capillaires deviennent négligeables. La goutte est en fait une flaque (exposant f dans les notations) d'épaisseur constante h . En écrivant l'équilibre entre la capillarité qui tend à réduire la surface de la flaque et la pression hydrostatique qui tend à agrandir la flaque, il vient :

$$h_{cap}^f \kappa = 2 \quad (5.1.4)$$

En écrivant la conservation du volume, on obtient :

$$L_{cap}^f \simeq \sqrt{2/3} R^{3/2} (f_V/\gamma)^{1/4} \quad (5.1.5)$$

c'est à dire :

$$L_{cap}^f \kappa \propto (R\kappa)^{3/2} \quad (5.1.6)$$

Les points expérimentaux pour T^∞ sont en très bon accord avec les prédictions théoriques à la fois pour le système « purement » liquide de la goutte de ferrofluide et les sphéroïdes (voir Figure I.5.1.C et D). En particulier, h_{cap} est en bon accord avec la prédiction exacte obtenue par intégration numérique des équations de Laplace (voir détails sur l'intégration numérique en Annexe B).

Le fait que la déformation du sphéroïde à l'équilibre soit gouvernée par les lois de la capillarité confirme bien le comportement liquide à temps long (voir les détails de l'analogie avec les liquides en I.3.3).

5.2 Transition élasto-capillaire

Les agrégats multicellulaires sont, comme nous l'avons déjà vu, communément décrits comme des fluides complexes visco-élastiques (I.3.3). Les propriétés liquides, par exemple la capillarité, sont gouvernées par la surface ($\propto R^2$), tandis que les propriétés élastiques sont fonction du volume ($\propto R^3$). Il doit donc exister une taille critique pour les sphéroïdes en deçà de laquelle les effets capillaires dominent et, réciproquement, au delà de laquelle ce sont les effets élastiques qui l'emportent. C'est une des motivations de la mise en place de la méthode du moulage magnétique pour avoir accès à une large gamme de tailles de sphéroïdes.

Comme nous venons de le voir en I.5.1, quelle que soit la taille initiale du sphéroïde, sa forme d'équilibre à temps long sera gouvernée par la capillarité. Ainsi si l'on veut espérer observer un changement de comportement en fonction de la taille, il ne faut pas considérer l'état final de l'écrasement mais sa dynamique. Contrairement à certains des dispositifs existants (méthode de centrifugation notamment, voir I.3.3.4), cette expérience permet d'avoir accès à la dynamique de l'écrasement.

5.2.1 Observation expérimentale

Nous avons donc soumis des sphéroïdes de différentes tailles à la supergravité magnétique. Observons tout d'abord le profil temporel de la déformation d'un « petit » (#1) et d'un « gros » (#2) sphéroïde présenté sur la Figure I.5.2. Dans les deux cas, les sphéroïdes commencent par subir une déformation rapide (et réversible) à temps court.

Le caractère réversible de la déformation initiale est illustré par la Figure I.5.3 où un sphéroïde est soumis de manière brève ($\simeq 2$ s) à la super-gravité magnétique et sa hauteur est mesurée au cours du temps. L'agrégat retrouve sa hauteur initiale quelques secondes après la déformation.

Après cette déformation initiale, à temps plus long, la déformation du « petit » sphéroïde n'évolue plus, alors que le « gros » sphéroïde continue de se déformer de manière non réversible et beaucoup plus lente, jusqu'à atteindre l'équilibre mécanique.

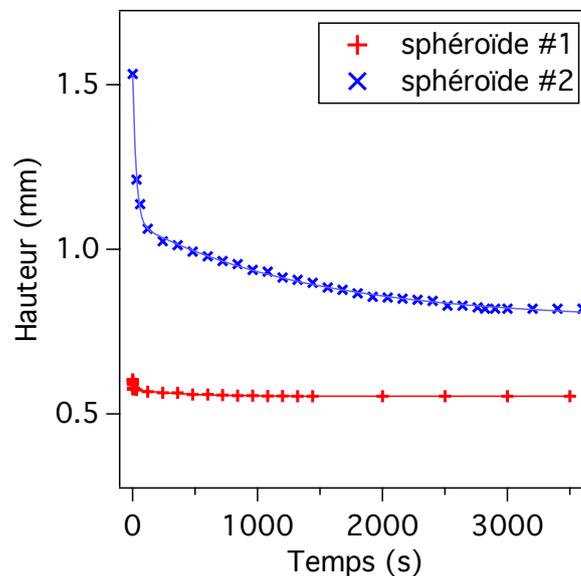


FIGURE I.5.2 – **Variation de la hauteur des sphéroïdes sous super-gravité** Deux sphéroïdes de tailles différentes sont soumis à la force magnétique d'écrasement, leur hauteur est mesurée au cours du temps. Le sphéroïde #1 a un rayon initial de $300 \mu\text{m}$. Le rayon initial de l'agrégat #2 est de $760 \mu\text{m}$.

La Figure I.5.4 présente le profil de quatre sphéroïdes de tailles différentes avant écrasement (T_0^-), à temps court après écrasement ($T_0^+ \simeq 10$ s) et à l'équilibre à temps long ($T^\infty = 1$ h). On retrouve bien sur ces images le comportement décrit précédemment. Le « petit » sphéroïde de droite ne se déforme pas entre T_0^+ et T^∞ tandis que les profils des trois autres plus gros sphéroïdes évoluent sensiblement jusqu'à T^∞ .

Afin de mieux comprendre ce phénomène, nous avons formé des sphéroïdes de tailles variées que l'on a écrasé sous super-gravité magnétique. Pour chaque sphéroïde, de rayon initial R , le rayon de la zone de contact L est mesuré à T_0^+ et T^∞ . La Figure I.5.5 présente l'évolution de L mesuré à ces deux instants, en fonction du rayon initial du sphéroïde.

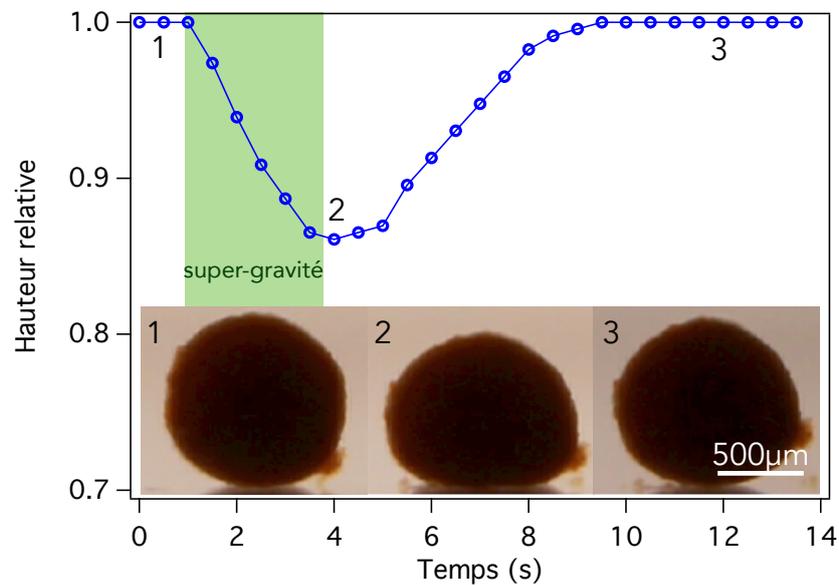


FIGURE I.5.3 – **Déformation réversible à temps courts** Evolution temporelle de la hauteur relative d'un sphéroïde soumis brièvement à l'écrasement magnétique. La plage temporelle durant laquelle la super-gravité est appliquée est indiquée en vert. Des photos du sphéroïde illustrent différents instants de l'écrasement indiqués par un chiffre.

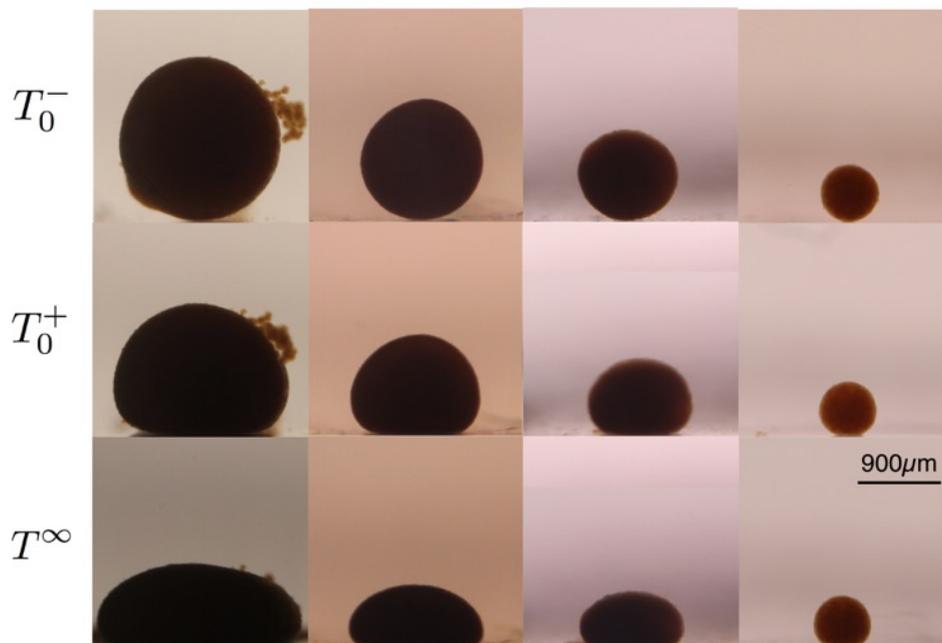


FIGURE I.5.4 – **Déformation de sphéroïdes de différentes tailles** Sphéroïdes de différentes tailles avant écrasement magnétique (T_0^-) et sous super-gravité magnétique ($T_0^+ = 10\text{s}$ et $T^\infty = 1\text{h}$ après application de la force).

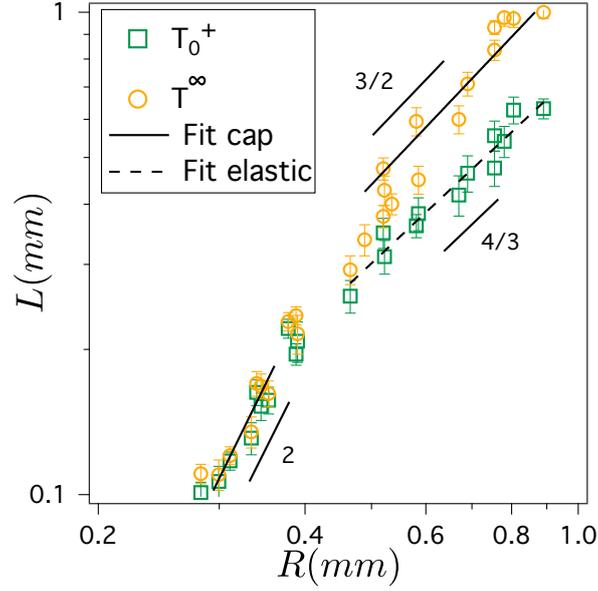


FIGURE I.5.5 – **Transition élastocapillaire** (A) Rayon de la zone de contact (L) en fonction du rayon initial du sphéroïde (R) 10 secondes après application de la force (T_0^+) et une fois l'équilibre mécanique atteint (T^∞). En noir sont superposés les ajustements par des lois puissances dont l'exposant est indiqué sur la figure.

On voit clairement apparaitre un rayon critique R_C (entre $350 \mu\text{m}$ et $400 \mu\text{m}$) qui délimite deux comportements :

- Pour des sphéroïdes tels que $R < R_C$ la déformation à T_0^+ et T^∞ est identique et L varie comme L_{cap} c'est à dire en R^2 .
- Pour des sphéroïdes avec $R > R_C$, L varie initialement comme $R^{4/3}$, ce qui correspond à un comportement de solide élastique décrit par la théorie du contact de Hertz [117]. Pour une sphère de rayon initial R , de module élastique E et de coefficient de Poisson σ en contact avec un plan infiniment dur, aux petites déformations, la taille de la zone de contact s'écrit :

$$L_{elastic} = \left((1 - \sigma^2) \pi / E \right)^{1/3} f_V^{1/3} R^{4/3} \quad (5.2.1)$$

L'ajustement de cette partie de la courbe expérimentale, avec une hypothèse d'incompressibilité ($\sigma = 1/2$) permet d'évaluer le module élastique de ces sphéroïdes : $E = 660 \pm 120 \text{ Pa}$.

5.2.2 Rayon critique

Le rayon critique R_C délimite donc une transition élastocapillaire qui se manifeste à temps court. R_C correspond au rayon auquel la déformation élastique et la déformation capillaire s'intersectent. La déformation maximale d'un sphéroïde est toujours donnée par L_{cap} .

Pour un sphéroïde de taille initiale inférieure à R_C , la déformation élastique initiale est suffisante pour atteindre la déformation finale ($L_{elastic} > L_{cap}$). Le sphéroïde atteint donc l'équilibre mécanique à temps court et son profil n'évolue plus.

Pour le sphéroïde plus gros ($R > R_C$) cette déformation élastique n'est pas suffisante ($L_{elastic} < L_{cap}$)

et des réarrangements plus lents entre cellules sont nécessaires pour atteindre l'équilibre mécanique. La Figure I.5.6 illustre ce phénomène. Les deux régimes de déformation possibles des sphéroïdes sont représentés en fonction de $R\kappa$. En jaune $L_{cap}^s \kappa$ (equ. 5.1.3) et $L_{cap}^f \kappa$ (equ. 5.1.6) correspondent à la déformation capillaire tandis qu'en vert :

$$L_{elastic} \kappa = ((1 - \sigma^2)\pi/E)^{1/3} f_V^{1/6} \gamma^{1/6} (R\kappa)^{4/3} \quad (5.2.2)$$

représente la déformation élastique pour E , σ , f_V et γ fixés. L'intersection entre ces deux régimes correspond au rayon critique R_C . Pour $R < R_C$, le trait en pointillé représente la déformation que le sphéroïde aurait pu atteindre s'il était purement élastique, mais sa déformation a été « bloquée » par la capillarité.

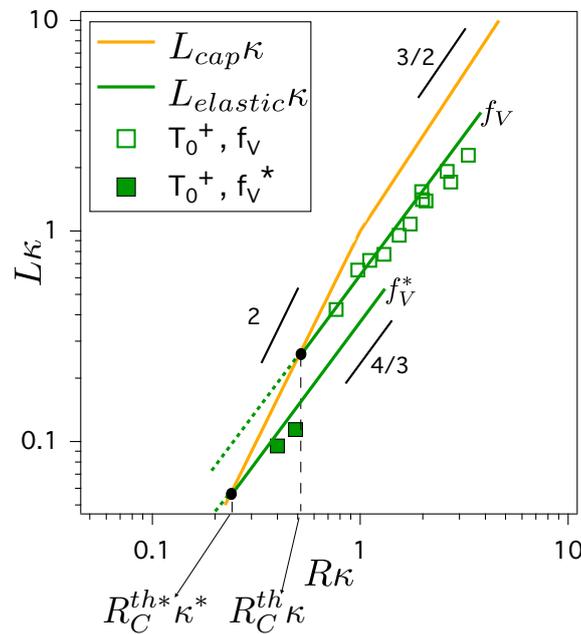


FIGURE I.5.6 – **Transition élastocapillaire dans le régime quasi-sphérique** Représentation des différents régimes de déformation dans le cas où $R_C < \kappa^{-1}$. Cette figure illustre également du rôle de la force volumique sur la transition. Pour la déformation capillaire, les deux segments jaunes représentent les deux comportements asymptotiques. La déformation élastique prédite par la loi de Hertz est tracée en vert pour deux forces volumiques différentes ($f_V^* < f_V$); E , $\sigma = 1/2$ et γ étant fixés. Dans la région $R < R_C$ le pointillé représente la déformation élastique inaccessible du fait de la capillarité. Par souci de clarté, seulement les points expérimentaux (carrés pleins et vides) pour $R > R_C$ à T^∞ ont été représentés pour les deux forces volumiques.

Pour déterminer l'expression de R_C , il convient de distinguer deux cas en fonction de la position de R_C par rapport à κ^{-1} .

Régime quasi-sphérique C'est le cas dans lequel on se trouve (voir Figure I.5.6), étant donné les paramètres de l'expérience. Il convient d'égaliser L_{cap}^s et $L_{elastic}$ (equ. 5.1.2 = equ. 5.2.1). Ceci conduit à :

$$R_C^s \simeq (3/2)^{3/4} ((1 - \sigma^2)\pi/E)^{1/2} \gamma^{3/4} f_V^{-1/4} \quad (5.2.3)$$

Régime flaque Dans ce régime, il faut égaliser L_{cap}^f et $L_{elastic}$ (equ. 5.1.5 = equ. 5.2.1), ainsi :

$$R_C^f \simeq (3/2)^3 ((1 - \sigma^2)\pi/E)^2 \gamma^{3/2} f_V^{1/2} \quad (5.2.4)$$

Ce cas est illustré par la Figure I.5.7. Pour les sphéroïdes étudiés (E, σ et γ donnés), il faudrait travailler avec des forces volumiques plus grandes pour entrer dans ce régime.

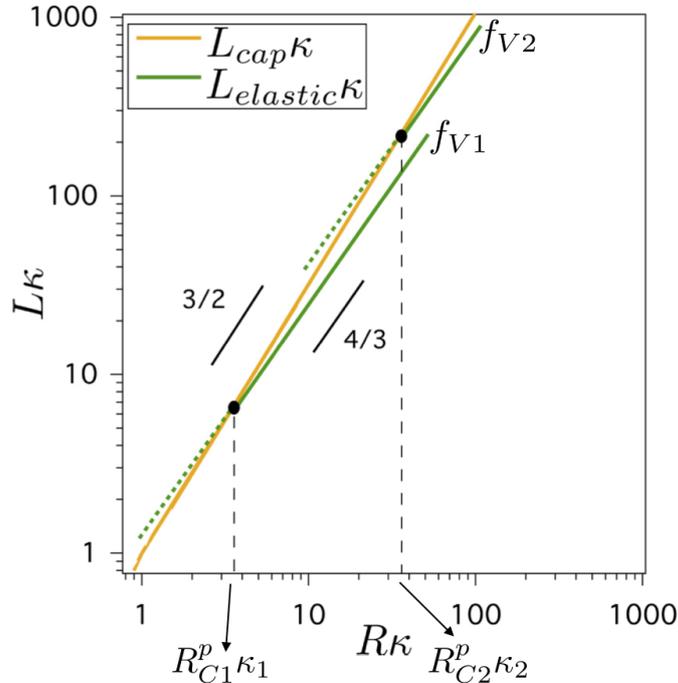


FIGURE I.5.7 – **Transition élastocapillaire dans le régime flaque** Illustration de la transition élastocapillaire dans le régime flaque pour deux forces volumiques différentes $f_{V1} = 5 \times 10^6 \text{ N.m}^{-3}$ et $f_{V2} = 5 \times 10^7 \text{ N.m}^{-3}$; $E, \sigma = 1/2$ et γ étant fixés aux valeurs des sphéroïdes de MSC. Les pointillés représentent la déformation élastique inaccessible.

Les quatre paramètres E, γ, f_V et σ déterminent, pour un système donné, quel cas envisager. Pour des raisons de continuité de la déformation des sphéroïdes, il faut considérer le plus grand rayon critique entre les deux valeurs possibles. La position par rapport à 1 du paramètre $\lambda = R_C^f/R_C^s$ détermine quelle expression utiliser.

$$\lambda \simeq (3/2)^{9/4} ((1 - \sigma^2)/E)^{3/2} \gamma^{3/4} f_V^{3/4} \quad (5.2.5)$$

Si $\lambda < 1$, $R_C = R_C^s$ et si $\lambda > 1$, $R_C = R_C^f$. Dans le système étudié $\lambda = 0,71$ et l'on observe bien un rayon critique inférieur à $\kappa^{-1} = 390 \mu\text{m}$. La valeur prédite pour R_C^s : $R_C^{th} = 213 \pm 90 \mu\text{m}$ est du même ordre de grandeur que la valeur observée expérimentalement. L'écart peut s'expliquer par le fait que dans les conditions de l'expérience, R_C est proche de κ^{-1} , ce qui rend d'une part la lecture graphique moins précise et d'autre part l'accord avec les lois asymptotiques moins bon.

Pour vérifier la dépendance des expressions précédentes avec la force volumique f_V , qui est le paramètre le plus facilement modifiable de manière indépendante, nous avons modifié les conditions de marquage magnétique des cellules. La quantité de nanoparticules internalisées par cellule étant déjà proche de la saturation, il n'a pas été possible d'augmenter de manière significative la force volumique. En réduisant la concentration de nanoparticules et le temps d'incubation ($[Fe] = 1,5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$

pendant 30 minutes), il a été possible de réduire la force volumique d'un facteur 12 et de travailler à $f_V^* = (1 \pm 0,1) \times 10^4 \text{ N.m}^{-3}$. A cette force volumique $\kappa^{-1} = 1350 \mu\text{m}$ et $R_C^{th*} = 398 \pm 166 \mu\text{m}$. Il a été possible de mesurer les déformations seulement pour les plus gros sphéroïdes. Les points expérimentaux sont présentés sur la Figure I.5.6. Par souci de clarté seul le rayon de la zone de contact L à T_0^+ est représenté par des carrés pleins. A T^∞ la déformation suit les lois de la capillarité. Les données expérimentales sont en bon accord avec la déformation prédite par les expressions précédentes (déformation $L_{elastic}$ tracée en vert sur la figure). Ceci conforte la confiance que l'on peut avoir dans la description et l'interprétation de la transition élasto-capillaire.

A titre de comparaison le même système sous gravité normale présenterait un rayon critique $R_C^{th}(1g) \simeq 800 \mu\text{m}$.

5.3 Discussion

Valeur de la tension de surface et du module élastique

Les valeurs de γ et E obtenues par cette méthode de mesure magnétique sont en bon accord avec les valeurs de la littérature. Les tensions de surface mesurées par différentes méthodes (voir 3.3.4) varient selon le type cellulaire entre 2 et plus de 20 mN.m^{-1} . Les cellules MSC possèdent une tension de surface relativement élevée, ce qui correspond au fait qu'elles forment facilement des agrégats sphériques et lisses.

Concernant le module élastique, la valeur obtenue est également proche des valeurs mesurées pour des lignées de sarcomes de souris [88], des tissus embryonnaires du foie [90], ainsi que du module d'Young de cellules MSC individuelles [118].

Etude de la dynamique d'écrasement

Ce dispositif expérimental possède l'avantage de permettre l'observation en direct la déformation de l'agrégat, et donc d'accéder à la dynamique de l'écrasement. Il peut cependant être amélioré, notamment lorsque l'on considère les temps courts. La montée initiale de l'aimant grâce au support élévateur n'est pas instantanée, l'agrégat ressent une force croissante le temps que l'aimant arrive au contact de la lamelle (environ une seconde). Ceci masque la réponse de l'agrégat. Ce constat nous a conduit à développer le rhéomètre magnétique (voir I.4.3 et I.6) où l'utilisation d'un électroaimant permet un contrôle quasi instantané de la force appliquée.

Effets des nanoparticules sur la réponse mécanique

Il est légitime de se questionner sur l'effet de la présence de nanoparticules au coeur des cellules sur lesquelles on exerce des forces magnétiques. Des études ont montré qu'elles ne modifiaient pas le comportement des cellules, en particulier la capacité de différenciation (voir détails en 2.2.4 et II.7). Les endosomes sont mis en mouvement dans les cellules par des moteurs moléculaires. Ces processus peuvent être associés à une température effective T_{eff} environ 1000 fois plus élevée que la température du bain ($k_B T_{eff} \simeq 10^{-17}$) [119]. Cette énergie est à comparer à celle associée à la force magnétique s'appliquant sur un endosome de taille $d_{endo} \simeq 1 \mu\text{m}$ et de moment magnétique $m_{endo} \simeq 10^{-15} \text{ A.m}^2$ pour le déplacer sur une distance de l'ordre de sa taille : $F_{endo} d_{endo} \simeq 10^{-19} \text{ J}$. Ainsi $k_B T_{eff} \gg F_{endo} d_{endo}$, ce qui écarte une quelconque perturbation du trafic endosomal due aux forces magnétiques.

Evolution des propriétés mécaniques au cours de la différenciation des agrégats

On peut induire, par la présence de certains facteurs de croissance dans le milieu de culture, la différenciation des cellules souches mésenchymateuses. Par exemple, en présence de $TFG\beta 3$, les MSCs peuvent se différencier en chondrocytes, générant des agrégats riches en matrice extracellulaire en un mois de maturation. Au moment du développement du tensiomètre magnétique, un des espoirs initiaux était le suivi de l'évolution des propriétés mécaniques des tissus au cours de leur différenciation (en chondrocyte notamment). Nous avons donc essayé d'écraser sous super-gravité un agrégat ayant mûri un mois dans le milieu de différenciation. Malheureusement, nous avons observé une très forte diminution de l'aimantation des agrégats (jusqu'à 80% en un mois). La super-gravité n'est plus suffisante pour déformer les agrégats, ce qui rend toute mesure impossible. Ceci est dû à la dégradation des nanoparticules une fois qu'elles sont internalisées dans les cellules. Cette observation a conduit à l'étude présentée dans la Partie II. Nous verrons en II.10 qu'il existe des stratégies visant à modifier l'architecture des nanoparticules pour s'affranchir ou du moins réduire la dégradation. Cela pourrait permettre l'étude initialement envisagée.

Généralisation à d'autres types cellulaires

Cette technique repose sur la capacité des cellules à internaliser les nanoparticules de façon à exercer sur les agrégats une super-gravité suffisamment forte pour que la déformation finale permette l'ajustement du profil expérimental afin de déterminer la tension de surface. Or la quantité pouvant être incorporée dépend fortement du type cellulaire. Les MSC sont des cellules qui internalisent particulièrement bien les nanoparticules. Reproduire ces expériences avec d'autres types cellulaires pourra donc être limité par ce facteur. Travailler avec des gradients de champ magnétique plus importants peut constituer une solution, encore faut-il qu'ils soient suffisamment homogènes.

5.4 Conclusion

Nous avons développé une méthode utilisant un dispositif expérimental original et simple pour mesurer de manière précise la tension de surface d'agrégats multicellulaires de cellules souches mésenchymateuses et évaluer leur module élastique. Les possibilités offertes par le dispositif (taille des sphéroïdes formés et observation de la dynamique de l'écrasement) nous ont permis de mettre en évidence deux comportements différents en fonction de la taille initiale des agrégats.

6 | Rhéologie des tissus biologiques

Sommaire

6.1	Comportement en loi puissance	63
6.1.1	Régime temporel : expérience de fluage	64
6.1.2	Régime fréquentiel : déformations sinusoïdales	64
6.2	Effets d'inhibiteurs	68
6.3	Non linéarité	71
6.3.1	Réponse à une rampe croissante	71
6.3.2	Réponse à des créneaux d'amplitude variable	72
6.4	Discussion	76
6.5	Conclusion et perspectives	77

Ce chapitre présente les résultats obtenus avec le rhéomètre magnétique sur la rhéologie des agrégats multicellulaires et leur réponse dynamique. Nous avons d'abord mis en évidence un comportement en loi puissance, en travaillant à la fois en régime temporel et en régime fréquentiel. Nous avons ensuite étudié l'effet d'inhibiteurs de certaines protéines du cytosquelette sur la réponse dynamique des agrégats. Enfin nous montrerons comment ce dispositif expérimental peut mettre à jour certains comportements non linéaires des agrégats. Le dispositif expérimental développé au cours de cette thèse pour mener à bien cette étude est présenté au Chapitre I.4.3.

6.1 Comportement en loi puissance

Avec le rhéomètre magnétique, on est capable d'imposer à un agrégat cylindrique une force volumique homogène d'écrasement, f_V , variable dans le temps. La contrainte n'est pas homogène sur la hauteur de l'agrégat. La contrainte qui s'applique sur la tranche d'altitude z s'écrit : $\sigma(z) = f_V(z - h_0)$ (voir Figure I.6.1.A pour la définition des axes, l'origine des z est prise au niveau du plan de contact). Dans toute la suite on appellera implicitement $\sigma = \sigma(z = 0) = f_V h_0$, en considérant que les variations de hauteur de l'agrégat sont petites par rapport à sa hauteur initiale (la variation maximale de hauteur est de l'ordre de 5%).

Il est important de noter que nous travaillons ici en compression alors que la majorité des expériences « classiques » de rhéologie sont effectuées en cisaillement.

Il y a principalement deux manières de conduire une expérience de rhéologie : soumettre le matériau à une force constante, c'est l'expérience de fluage, ou le soumettre à une force sinusoïdale en variant la fréquence de la sollicitation. Le dispositif que nous avons développé a l'avantage de pouvoir réaliser ces deux types de mesures, ce qui est sans précédent concernant la rhéologie des agrégats multicellulaires.

6.1.1 Régime temporel : expérience de fluage

Nous avons soumis les agrégats cylindriques de F9 à un créneau de force volumique constante $f_{Vmax} = 2225 \pm 345 \text{ N.m}^{-3}$, soit une contrainte de l'ordre de $\sigma \simeq 2\text{Pa}$ pour les cylindres d'un millimètre de hauteur. L'incertitude sur la valeur de f_V provient principalement de la variabilité de l'aimantation des agrégats. Ceci correspond à la valeur maximale pouvant être appliquée avec notre dispositif pour le marquage magnétique cellulaire utilisé. L'écrasement de l'agrégat est filmé avec une caméra rapide (voir Figure I.6.1.A) et le mouvement de son interface supérieure est détecté grâce à un algorithme de tracking (voir détails au Chapitre I.4.3).

La Figure I.6.1.B présente l'évolution de la déformation $\Delta h(t)$ d'un agrégat au cours du temps (en échelle linéaire) soumis à un créneau de 100 secondes. $\Delta h(t)$ peut être ajusté avec une très bonne précision par une loi puissance du temps. La qualité de l'ajustement est particulièrement visible en échelle logarithmique (Figure I.6.1.C). Sur quatre décades temporelles la déformation de l'agrégat obéit à une loi puissance, et la fonction de fluage (voir détails en I.3.2.2) peut s'écrire :

$$J(t) = \frac{\varepsilon(t)}{\sigma} = \frac{\Delta h(t)}{f_V h_0^2} = j_0 (t/t_0)^\alpha$$

où $\sigma = f_{Vmax} h_0$ est la contrainte imposée à l'agrégat, $\varepsilon(t) = \Delta h(t)/h_0$ est la déformation normalisée de l'agrégat et t_0 est choisi arbitrairement comme égal à 1 seconde. Les axes secondaires des Figures I.6.1.B et C sont gradués en Pa^{-1} , ceci correspond à la conversion de Δh en J . Les valeurs du préfacteur j_0 et l'exposant α de la loi puissance sont déterminées par ajustement des courbes expérimentales.

Ces mesures ont été réalisées sur 40 agrégats différents. Les Figures I.6.1.D et E présentent l'ensemble des résultats obtenus pour, respectivement, la valeur de j_0 et celle de α , sous la forme de graphes cumulés et d'histogrammes.

L'ajustement des mesures par une loi de distribution gaussienne donne pour les agrégats de cellules F9 : $j_0 = 0,023 \pm 0,007 \text{ Pa}^{-1}$ et $\alpha = 0,21 \pm 0,03$.

6.1.2 Régime fréquentiel : déformations sinusoïdales

Il est usuel en rhéologie de travailler avec un module viscoélastique complexe qui relie la contrainte et la déformation en fonction de la fréquence à laquelle est sollicité le matériau. Le rhéomètre magnétique développé permet de générer une force magnétique oscillant dans le temps et donc de mesurer le module viscoélastique complexe en compression de ces agrégats multicellulaires.

Le module viscoélastique complexe en compression d'un matériau a pour expression :

$$G^*(\omega) = |G^*(\omega)| e^{j\phi(\omega)} = \frac{\sigma(\omega)}{\varepsilon(\omega)}$$

où $\sigma(\omega)$ est la contrainte oscillant à la pulsation ω et $\varepsilon(\omega)$ la déformation normalisée. Dans le cas d'une rhéologie en loi puissance en régime linéaire, il vient (voir détails en I.3.2.2) :

$$|G^*(\omega)| = \frac{\omega^\alpha t_0^\alpha}{j_0 \Gamma(1 + \alpha)}$$

$$\phi = \frac{\alpha \pi}{2}$$

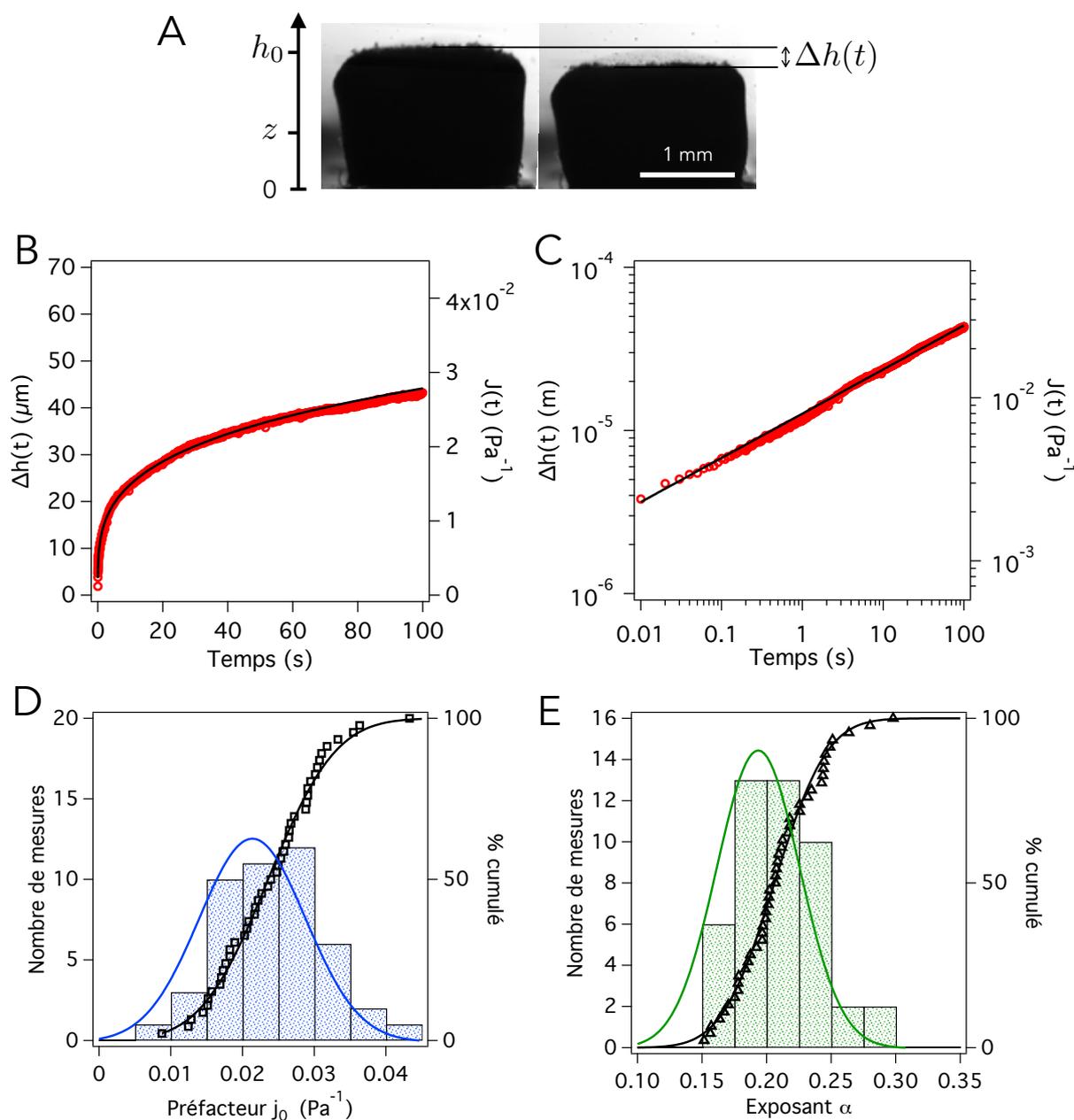


FIGURE I.6.1 – **Fluage en loi puissance** (A) Allure d'un cylindre de F9 vu de côté avant (gauche) et pendant (droite) son écrasement sous une force magnétique constante. La force est appliquée à $t = 0$ s et la variation de hauteur $\Delta h(t)$ est mesurée à chaque instant. Déformation de l'agrégat et fonction de fluage $J(t)$ en fonction du temps (B) en échelle linéaire et (C) en échelle logarithmique. Les points expérimentaux sont ajustés par une loi puissance de la forme $J(t) = j_0(t/t_0)^\alpha$ (tracée en noir). Histogrammes et graphes cumulés des mesures (D) du préfacteur j_0 et (E) de l'exposant α effectuées sur 40 agrégats cylindriques différents. Les distributions des mesures sont ajustées par des lois gaussiennes (en bleu et vert).

où Γ est la fonction d'Euler. Afin de vérifier si l'on retrouve le même comportement rhéologique en régime fréquentiel, les cylindres ont été soumis à une force magnétique oscillante à des fréquences comprises entre 0,1 et 10 Hz.

Le signal de la force d'écrasement est construit de la manière suivante : la force est d'abord constante et vaut $f_{Vmax}/2$ de $t = 0$ s à $t = 3$ s, puis elle oscille sinusoïdalement entre $0,25 \times f_{Vmax}$ et $0,75 \times f_{Vmax}$ à la fréquence souhaitée. La modulation sinusoïdale a donc une amplitude de $f_{Vmax}/2$. Le signal utilisé à la fréquence 1 Hz est présenté en noir sur la Figure I.6.2.A. La procédure suivie pour construire le signal de tension à appliquer aux bornes de l'amplificateur, afin d'obtenir le signal $f_V(t)$ souhaité, est décrite en I.4.3.2.

L'agrégat est soumis successivement à des forces oscillant à 10 Hz, 5 Hz, 3 Hz, 1 Hz, 0,5 Hz, 0,3 Hz et 0,1 Hz. Un temps minimum de 5 min est attendu entre chaque mesure. On utilise les signaux par fréquences décroissantes pour que les déformations les plus importantes, obtenues aux basses fréquences, interviennent en fin d'expérience.

La Figure I.6.2.A présente la variation de hauteur $\Delta h(t)$ de l'agrégat lorsqu'on le soumet à la force d'écrasement sinusoïdale à 1 Hz, elle consiste en la fonction de fluage en réponse au créneau $f_V/2$ modulée par la sinusoïde. Pour chaque fréquence l'amplitude de la réponse A et le décalage temporel entre la force et la déformation Δt sont mesurés (voir Figure I.6.2.A). L'amplitude A permet de déterminer la valeur du module de G^* à la fréquence considérée :

$$|G^*(\omega)| = \left| \frac{\sigma(\omega)}{\varepsilon(\omega)} \right| = \frac{f_{Vmax} h_0^2}{2A(\omega)}$$

La mesure du décalage temporel Δt permet de calculer la phase ϕ de G^* à la fréquence considérée :

$$\phi(\omega) = \omega \Delta t$$

La Figure I.6.2.B présente les valeurs du module et de la phase de G^* sur la gamme de fréquences explorées pour un agrégat. Le module de G^* varie avec la fréquence selon une loi puissance avec un exposant valant $\alpha = 0,22 \pm 0,01$. L'ajustement est superposé sur le graphe I.6.2.B.

La phase, quant à elle, ne varie pas avec la fréquence. La valeur théorique de cette constante ($\phi = \alpha\pi/2 = 0,34$) dans le cas d'une rhéologie en loi puissance (voir détails en I.3.2.2) est représentée en pointillés sur la Figure I.6.2.B. L'accord entre les mesures et la valeur attendue est bon. A haute fréquence l'incertitude sur la mesure expérimentale est plus importante car on est limité par la vitesse d'acquisition de la caméra et la mesure du déphasage est plus sensible aux erreurs de synchronisation entre les signaux. Le module élastique complexe en compression G^* suit donc lui aussi une loi puissance de la fréquence avec un exposant α égal à celui des expériences de fluage.

On peut également vérifier que les valeurs obtenues pour les préfacteurs sont cohérentes entre les deux expériences. On sait qu'à 1 Hz :

$$|G^*(1Hz)| = \frac{(t_0 2\pi)^\alpha}{j_0 \Gamma(1 + \alpha)}$$

L'application numérique de cette expression théorique donne (avec les valeurs de j_0 et α obtenues en fluage) : $|G^*(1Hz)| = 70 \pm 25$ Pa tandis que la valeur expérimentale mesurée vaut 110 ± 30 Pa. Ces deux résultats sont cohérents, surtout si l'on considère qu'il s'agit, en régime fréquentiel, de la mesure pour un agrégat unique.

On peut également calculer à partir de ces données les parties réelles $G'(\omega)$ et imaginaires $G''(\omega)$ du module viscoélastique ($G^*(\omega) = G'(\omega) + i.G''(\omega)$) qui sont présentées sur la Figure I.6.2.C. Comme

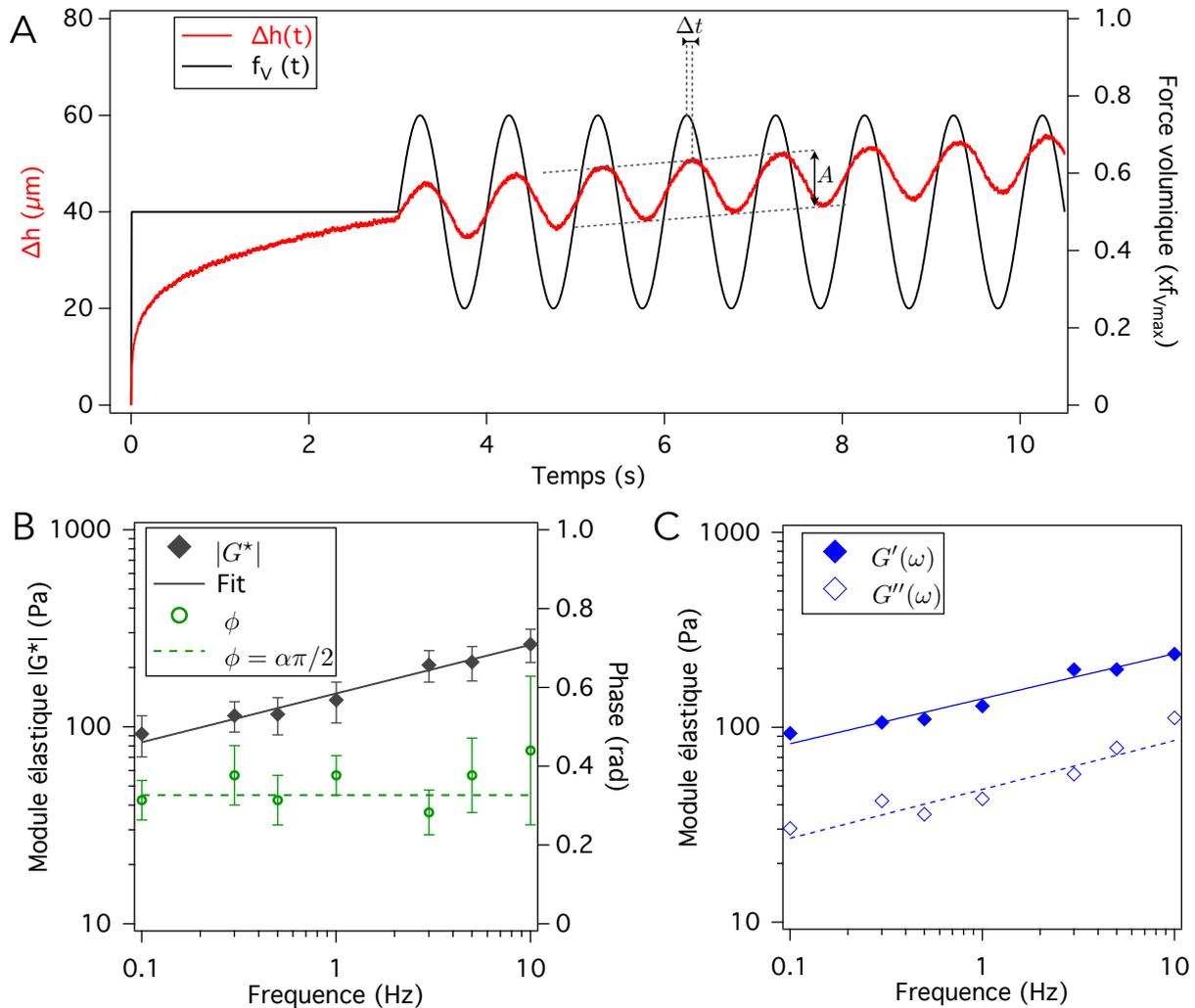


FIGURE I.6.2 – **Mesure du module complexe viscoélastique en compression** L'agrégat est soumis à une force magnétique sinusoïdale variant entre 0,1 Hz et 10 Hz. La mesure de la déformation de l'agrégat permet de déterminer sa fonction de réponse en compression $G^*(\omega)$ (A) Variation de la hauteur d'un agrégat soumis à une force volumique maintenue constante à $f_{v_{\max}}/2$ pendant 3 secondes puis oscillant à 1 Hz avec une amplitude $f_{v_{\max}}/2$. Pour chaque fréquence, l'amplitude A et le retard (par rapport à la force imposée) Δt de la déformation sont mesurés afin de déterminer $G^*(\omega)$. (B) Module et phase du module viscoélastique complexe en compression de l'agrégat. Le module est ajusté par une loi puissance de la fréquence. Les traits en pointillés indiquent la valeur attendue pour la phase $\phi = \alpha\pi/2$ dans le cas d'une rhéologie en loi puissance. (C) Valeurs du module de conservation G' et du module de perte G'' en fonction de la fréquence.

attendu étant donné la valeur de l'exposant α (qui est plus proche de zéro que de l'unité, ce qui traduit un comportement davantage élastique que liquide), le module de conservation G' est supérieur au module de perte G'' , c'est donc le comportement élastique qui domine dans la réponse des agrégats.

Ces résultats montrent que l'on retrouve en régime fréquentiel le comportement en loi puissance observé avec les expériences de fluage et que les résultats obtenus dans les deux cas sont cohérents. Ceci démontre également la versatilité de ce dispositif expérimental.

Dans la suite nous avons choisi de travailler avec des expériences de type fluage, car elles sont plus rapides à réaliser. En effet, une seule acquisition suffit pour mesurer le comportement rhéologique complet, tandis que 7 acquisitions et un traitement plus important des données sont nécessaires en régime fréquentiel.

6.2 Effets d'inhibiteurs

Nous avons voulu étudier l'influence des protéines du cytosquelette et des propriétés d'adhésion des cellules, sur la réponse des agrégats. Différents inhibiteurs et lignées cellulaires ont ainsi été utilisés :

- La latrunculine, qui inhibe la polymérisation des filaments d'actine perturbe l'organisation du cytosquelette.
- L'EGTA est un chélateur du calcium. Lorsqu'il est présent dans le milieu de culture il perturbe l'adhésion entre cellules en empêchant l'établissement des liaisons homotypiques des cadhérines qui sont calcium dépendantes.
- Une lignée de cellules F9 qui n'expriment pas la protéine α -caténine (F9^($\alpha^{-/-}$)).

Pour ces expériences, les agrégats ont été formés en présence des inhibiteurs latrunculine et EGTA dans le milieu de culture au moment du moulage (voir I.4) à la concentration $1\mu\text{M}$ pour la latrunculine et $0,4\text{ mM}$ pour l'EGTA. Les agrégats ainsi moulés sont laissés à incuber une nuit avant d'être déformés avec le rhéomètre magnétique.

Ces concentrations et temps d'incubation ont été optimisés afin que les agrégats formés soient cohésifs tout en modifiant leurs propriétés mécaniques. Par exemple pour des concentrations plus fortes d'EGTA (typiquement 4 mM), les agrégats obtenus ne sont pas assez cohésifs pour être manipulés. A l'opposé, l'ajout des inhibiteurs alors que les agrégats sont déjà formés n'est pas efficace, leur diffusion jusqu'au coeur des agrégats est trop lente, leur action sur les propriétés mécaniques est insuffisante et inhomogène. Le meilleur moyen d'obtenir un effet homogène des inhibiteurs est de les mettre en présence des cellules au moment du moulage magnétique.

La Figure I.6.3 présente l'effet de la présence de latrunculine dans le milieu de culture des agrégats environ 20 heures après le moulage. Ces images ont été réalisées en microscopie 2 photons sur des agrégats de F9 lifeAct (dont les filaments d'actine sont fluorescents) en présence ou en absence de latrunculine depuis leur moulage. Les clichés correspondent à la zone centrale des agrégats. Dans les conditions normales de formation (sans latrunculine, (A)), on observe que l'actine des cellules est surtout corticale, bien organisée en périphérie des cellules. En présence de latrunculine (B), les réseaux d'actine sont complètement désorganisés. Ceci montre que la latrunculine a une action sur le cytosquelette des cellules, même jusqu'au coeur de l'agrégat. Ceci valide notre méthode de formation par moulage en présence des inhibiteurs.

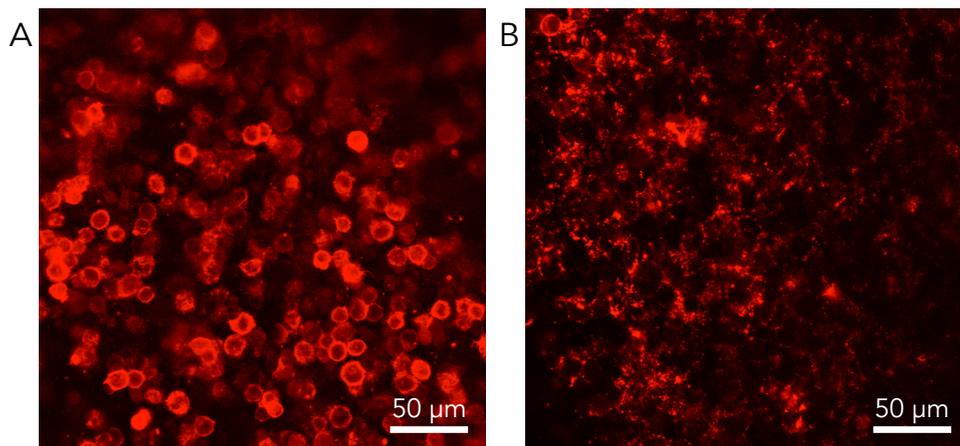


FIGURE I.6.3 – **Action de la latrunculine sur l'actine** Images de microscopie 2 photons dans la zone centrale de deux agrégats de F9 LifeAct. (A) Agrégat formé dans les conditions classiques. (B) Agrégat formé en présence de Latrunculine. L'actine apparaît en rouge.

Pour les F9^(α -/-), les agrégats sont formés de manière classique, les agrégats obtenus sont cohésifs et peuvent être manipulés normalement. Il est rapporté dans la littérature que ces cellules mettent plus de temps que la souche F9 sauvage pour former des agrégats par agitation [85]. Le temps d'incubation laissé aux cellules dans notre protocole est probablement suffisamment long pour ne pas observer ces différences.

L'expérience de fluage est réalisée sur ces agrégats avec un créneau de force à f_{Vmax} d'une durée de 20 secondes. Dans toutes les conditions, les agrégats se déforment en suivant une loi puissance. L'ajustement des courbes expérimentales permet de déterminer la valeur du préfacteur j_0 et de l'exposant α . L'ensemble de ces mesures est présenté sur la Figure I.6.4 sous la forme de graphes cumulés. Les valeurs moyennes et écarts types sont obtenus pour chaque condition en ajustant les graphes cumulés par la fonction de répartition d'une loi gaussienne. Ces résultats sont rassemblés dans le Tableau I.6.1.

C'est sur les variations de la valeur du préfacteur j_0 que l'on observe l'effet des différents inhibiteurs testés sur la mécanique des agrégats. Il n'y a en effet pas de différence significative entre les valeurs de l'exposant α . Ceci est à mettre en lien avec les études réalisées sur les cellules uniques (voir détails en I.3.2) où les inhibiteurs entraînent de faibles variations de α mais des variations plus importantes de j_0 . En l'état, notre technique n'est pas assez sensible pour observer, si elles existent à l'échelle du tissu, des différences sur les α . Une solution pourrait, comme avec les cellules uniques, consister à accumuler beaucoup plus d'expériences.

L'action de la latrunculine tend à augmenter la valeur du préfacteur j_0 et donc à diminuer la rigidité des agrégats. A l'échelle de la cellule unique, la déstructuration du cytosquelette d'actine provoquée par la latrunculine a aussi pour effet de réduire la rigidité de la cellule. La diminution de la rigidité globale de l'agrégat peut être attribuée à la baisse de la rigidité de la brique élémentaire, la cellule.

L'action de l'EGTA est intéressante car elle affecte la structure du tissu en modifiant les propriétés adhésives des cellules. L'EGTA n'a, par exemple, aucune influence sur la rhéologie d'une cellule unique adhérente. A l'échelle de l'agrégat on observe une augmentation de j_0 du même ordre que celle induite

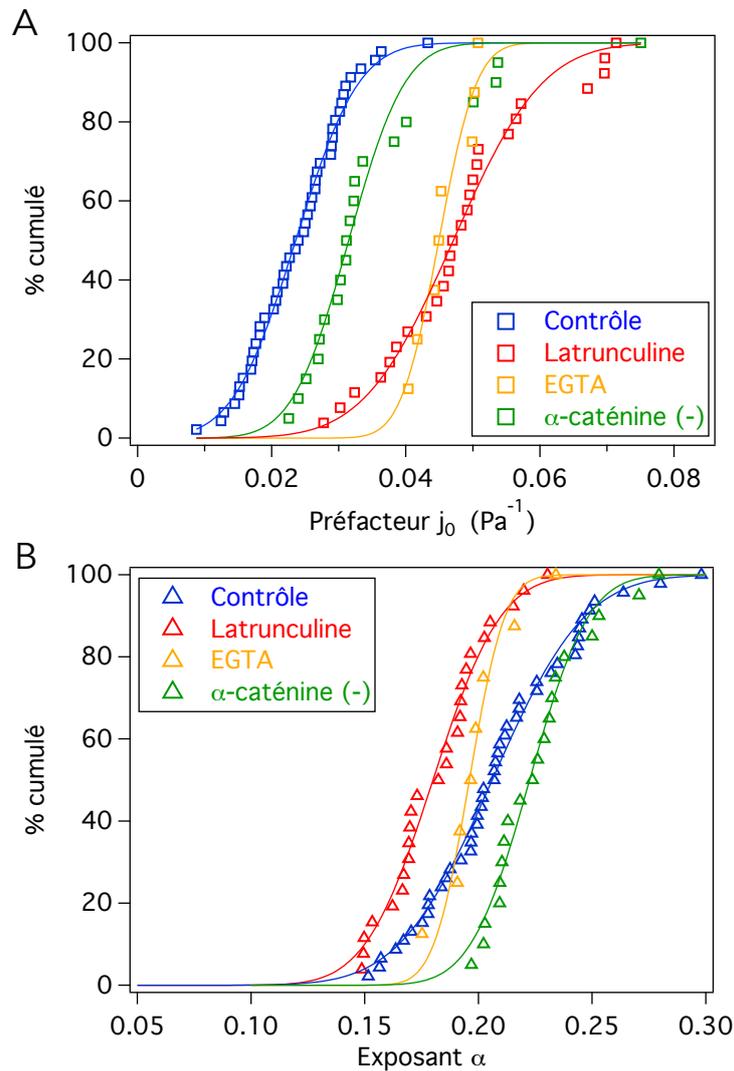


FIGURE I.6.4 – Effets d’inhibiteurs sur la réponse en loi puissance Graphes cumulés des mesures (A) du préfacteur j_0 et (B) de l’exposant α effectués sur des agrégats cylindriques de F9 dans les conditions normales (Contrôle), formés en présence d’un inhibiteur de la polymérisation de l’actine (Latrunculine), d’un chélateur du calcium qui inhibe l’adhésion cellulaire (EGTA), et sur des cylindres de F9^(α -/-) n’exprimant pas l’ α -caténine. Les graphes cumulés sont ajustés par une fonction de répartition de loi gaussienne, les résultats sont résumés dans le Tableau I.6.1. $n_{CTRL} = 40$, $n_{Lat} = 26$, $n_{EGTA} = 8$, $n_{\alpha cat} = 20$.

Condition	Préfacteur j_0 (Pa ⁻¹)	Exposant α
Contrôle	0,023 ± 0,007	0,21 ± 0,03
Latrunculine	0,047 ± 0,01	0,18 ± 0,02
EGTA	0,045 ± 0,004	0,19 ± 0,01
α -caténine	0,031 ± 0,006	0,22 ± 0,02

Tableau I.6.1 – Valeurs obtenues pour le préfacteur j_0 et l’exposant α de la fonction de fluage dans les différentes conditions expérimentales. Les résultats sont présentés sous la forme : valeur moyenne ± écart type.

par la latrunculine. La diminution de la cohésion de l'agrégat due à des adhésions cellule-cellule plus faibles, se traduit par une baisse de sa rigidité.

Nous n'avons pas pu mettre à jour des modifications significatives des propriétés rhéologiques des agrégats de $F9^{(\alpha-/-)}$ par rapport aux F9 sauvages. Ceci est à mettre en lien avec des résultats de la littérature qui malgré une forte diminution de la tension de surface des agrégats de $F9^{(\alpha-/-)}$ rapportent seulement une faible baisse de la viscosité effective de ces agrégats [85].

Ces premiers résultats confirment que les deux éléments - propriétés mécaniques du cytosquelette de la cellule individuelle et propriétés d'adhésion des cellules entre elles - contribuent aux propriétés rhéologiques de l'ensemble du tissu. Il convient maintenant d'utiliser d'autres inhibiteurs, dirigés notamment contre les autres protéines du cytosquelette, afin d'approfondir cette étude.

6.3 Non linéarité

Cette section présente des résultats préliminaires et exploratoires sur les effets non linéaires observés sur les agrégats multicellulaires. Il est légitime de se poser la question de l'existence de phénomènes non linéaires quand on sait que les cellules constituant l'agrégat possèdent une réponse non linéaire. Nous avons donc fait varier la contrainte à laquelle les agrégats ont été soumis, en appliquant une rampe croissante de contrainte ou des créneaux d'amplitudes variables.

6.3.1 Réponse à une rampe croissante

La première expérience consiste à appliquer aux agrégats une rampe croissante de contrainte :

$$\sigma(t) = a \times t$$

Dans l'hypothèse d'un comportement purement linéaire, la déformation de l'agrégat s'écrit :

$$\varepsilon(t) = J(t)\sigma(0) + \int_0^t J(t-t')\dot{\sigma}(t') dt'$$

et dans le cas d'une rhéologie en loi puissance avec $J(t) = j_0(t/t_0)^\alpha$, il vient :

$$\varepsilon(t) = aj_0 \int_0^t \left(\frac{t-t'}{t_0}\right)^\alpha dt' = \frac{aj_0 t_0}{1+\alpha} \left(\frac{t}{t_0}\right)^{1+\alpha}$$

La réponse à une rampe doit donc obéir à une loi puissance d'exposant $1 + \alpha$ si le système est linéaire.

Nous avons soumis des agrégats à une rampe variant de $\sigma = 0$ à $\sigma = f_{Vmax}h_0$ en 100 secondes. La variation de hauteur $\Delta h(t)$ d'un agrégat en réponse à la rampe est présentée sur la Figure I.6.5 en échelle logarithmique. L'agrégat suit d'abord une réponse en loi puissance matérialisée par le trait noir sur le graphe pour ensuite s'en écarter après 50 secondes, la déformation est alors inférieure à celle prévue par la réponse linéaire. L'exposant issu de l'ajustement vaut 1,21, ce qui correspond à une valeur de l'exposant de la fonction de fluage $\alpha = 0.21$ compatible avec les mesures réalisées précédemment (I.6.1). Le préfacteur obtenu par l'ajustement (qui vaut 3.10^{-7} m) est également en bon accord avec la valeur théorique calculée à partir des valeurs moyennes de j_0 et α ($h_0 a j_0 t_0 / (1 + \alpha) = 2,8.10^{-7}$ m).

Nous avons superposé sur le graphe les valeurs de la contrainte atteinte à différents instants : $\sigma(25s) =$

$\sigma_1 = 1/4.f_{Vmax}h_0$, $\sigma(50s) = \sigma_2 = 1/2.f_{Vmax}h_0$, $\sigma(75s) = \sigma_3 = 3/4.f_{Vmax}h_0$ et $\sigma(100s) = \sigma_4 = f_{Vmax}h_0$.

La réponse de l'agrégat suit donc une réponse linéaire jusqu'à la contrainte $\sigma_2 \simeq 1$ Pa pour s'en écarter pour des contraintes supérieures. Le fait que dans ce régime la déformation soit plus petite que la déformation prévue par le régime linéaire indique une augmentation de la rigidité de l'agrégat. Ceci permet d'estimer le seuil de contrainte à partir duquel les phénomènes non linéaires interviennent dans la réponse de l'agrégat.

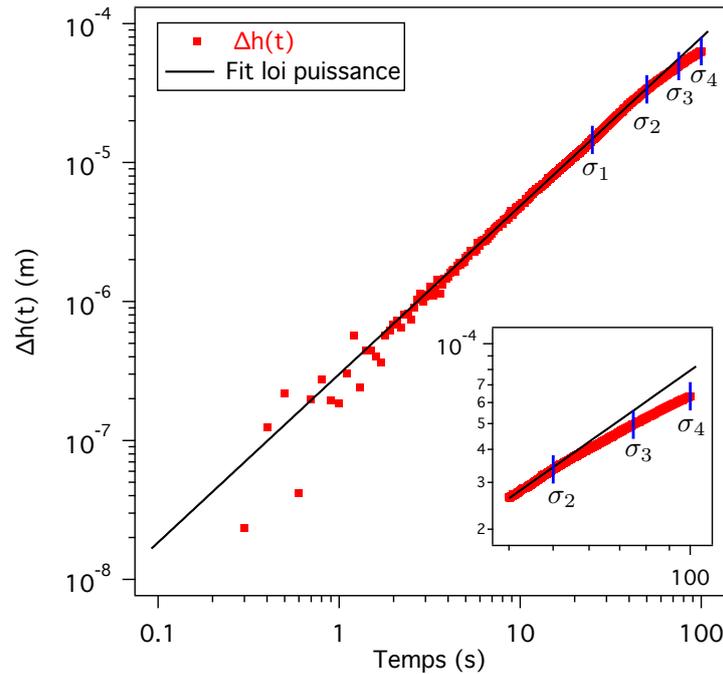


FIGURE I.6.5 – **Réponse à une rampe** Variation de la hauteur d'un agrégat soumis à une rampe croissante (de 0 à f_{Vmax}) de force d'une durée de 100 s. Les traits bleus matérialisent les temps où sont atteintes les contraintes correspondant aux valeurs des 4 marches des signaux en créneaux : σ_1 à $t=25$ s, σ_2 à $t=50$ s, σ_3 à $t=75$ s et σ_4 à $t=100$ s. $\Delta h(t)$ est ajusté par une loi puissance entre $t=0$ s et $t=25$ s qui est tracée en noir et a pour expression $\Delta h(t) = 3 \cdot 10^{-7} t^{1,21}$. L'encart présente un zoom sur la zone où Δh s'écarte de la loi puissance.

Cette non linéarité de la réponse doit se traduire par une variation des paramètres j_0 et α en fonction de la contrainte appliquée. Nous avons donc voulu mesurer cette dépendance en soumettant les agrégats à des créneaux d'amplitude variable.

6.3.2 Réponse à des créneaux d'amplitude variable

La deuxième expérience consiste donc à appliquer des créneaux d'une durée de 10 secondes, espacés entre eux de 100 secondes. L'amplitude des créneaux prend les valeurs $\sigma_1 = 1/4.f_{Vmax}h_0$, $\sigma_2 = 1/2.f_{Vmax}h_0$, $\sigma_3 = 3/4.f_{Vmax}h_0$ et $\sigma_4 = f_{Vmax}h_0$. Les créneaux peuvent se succéder de manière croissante : $\sigma_1/\sigma_2/\sigma_3/\sigma_4$, on parlera d'une séquence « Montée » ; ou de manière décroissante : $\sigma_4/\sigma_3/\sigma_2/\sigma_1$, on parlera d'une séquence « Descente ». La Figure I.6.6.A illustre le signal « Montée ».

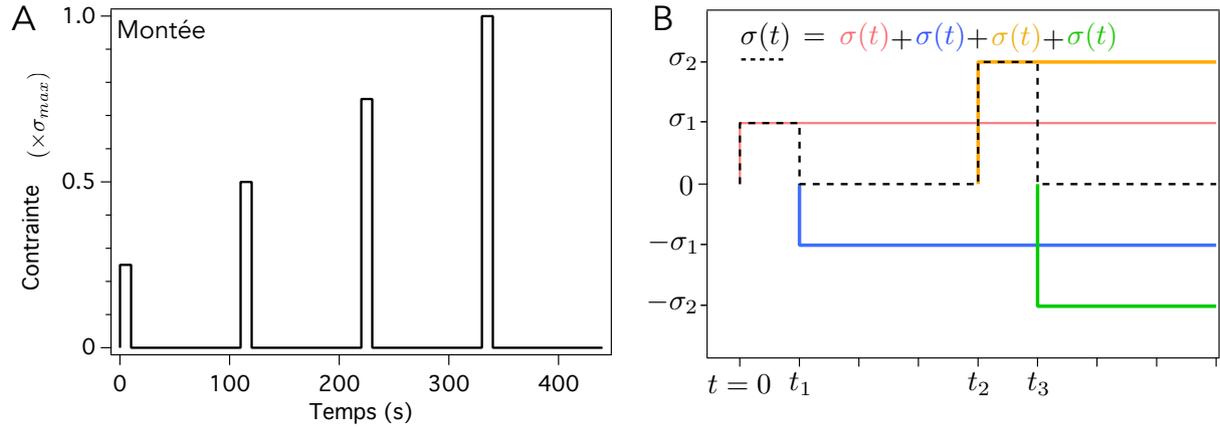


FIGURE I.6.6 – **Signaux en créneaux** (A) Allure du signal « Montée » où les créneaux de contrainte sont de valeurs croissantes. (B) Décomposition utilisée pour le signal $\sigma(t)$ pour l'analyse de la déformation des agrégats.

La Figure I.6.7 présente la déformation d'un agrégat soumis à ces deux signaux (A et B) ainsi qu'à un signal composé de trois créneaux d'amplitude égale à σ_4 (C). Dans un premier temps la déformation de l'agrégat a été ajustée indépendamment pour chacun des créneaux des différentes séquences¹. Cette méthode d'analyse a mis en évidence des variations des paramètres j_0 et α en fonction de la contrainte imposée, cependant les valeurs à la montée et à la descente ne se correspondaient pas et pour le créneau d'amplitude σ_4 , on ne retrouvait pas la valeur moyenne obtenue en I.6.1. Le temps d'attente de 100 secondes entre chaque créneau n'est visiblement pas suffisant pour exploiter les différents créneaux de manière indépendante.

Nous nous sommes inspirés des expériences de cellules uniques, notamment de l'exploitation de la réponse non linéaire en fluage d'une cellule à des marches de hauteurs croissantes [120].

L'ajustement effectué tient compte de l'histoire de la sollicitation. Les paramètres de la fonction de fluage dépendent de la contrainte appliquée :

$$J(t) = j_0(\sigma) \left(\frac{t}{t_0} \right)^{\alpha(\sigma)}$$

Le signal $\sigma(t)$ est interprété comme la superposition de fonctions d'Heaviside décalées dans le temps et de hauteurs successivement positives et négatives correspondant à celles des créneaux. Ce découpage est présenté sur la Figure I.6.6.B. Chacun des écrasements et des relaxations successifs est ajusté de proche en proche en conservant les valeurs des paramètres obtenus aux étapes précédentes. Par exemple pour le signal de la Figure I.6.6.B, les expressions successives des fonctions d'ajustement sont :

$$\begin{aligned} t \in [0, t_1] & \quad \Delta h(t) = \lambda_{E\sigma_1} t^{\alpha_{E\sigma_1}} \\ t \in [t_1, t_2] & \quad \Delta h(t) = \lambda_{E\sigma_1} t^{\alpha_{E\sigma_1}} - \lambda_{R\sigma_1} (t - t_1)^{\alpha_{R\sigma_1}} \\ t \in [t_2, t_3] & \quad \Delta h(t) = \lambda_{E\sigma_1} t^{\alpha_{E\sigma_1}} - \lambda_{R\sigma_1} (t - t_1)^{\alpha_{R\sigma_1}} + \lambda_{E\sigma_2} (t - t_2)^{\alpha_{E\sigma_2}} \end{aligned}$$

Les paramètres en rouge sont ceux qui sont ajustés à chaque étape, ceux en noirs sont fixés et ont été

1. Attention ce n'est pas l'ajustement qui est présenté sur la Figure I.6.7

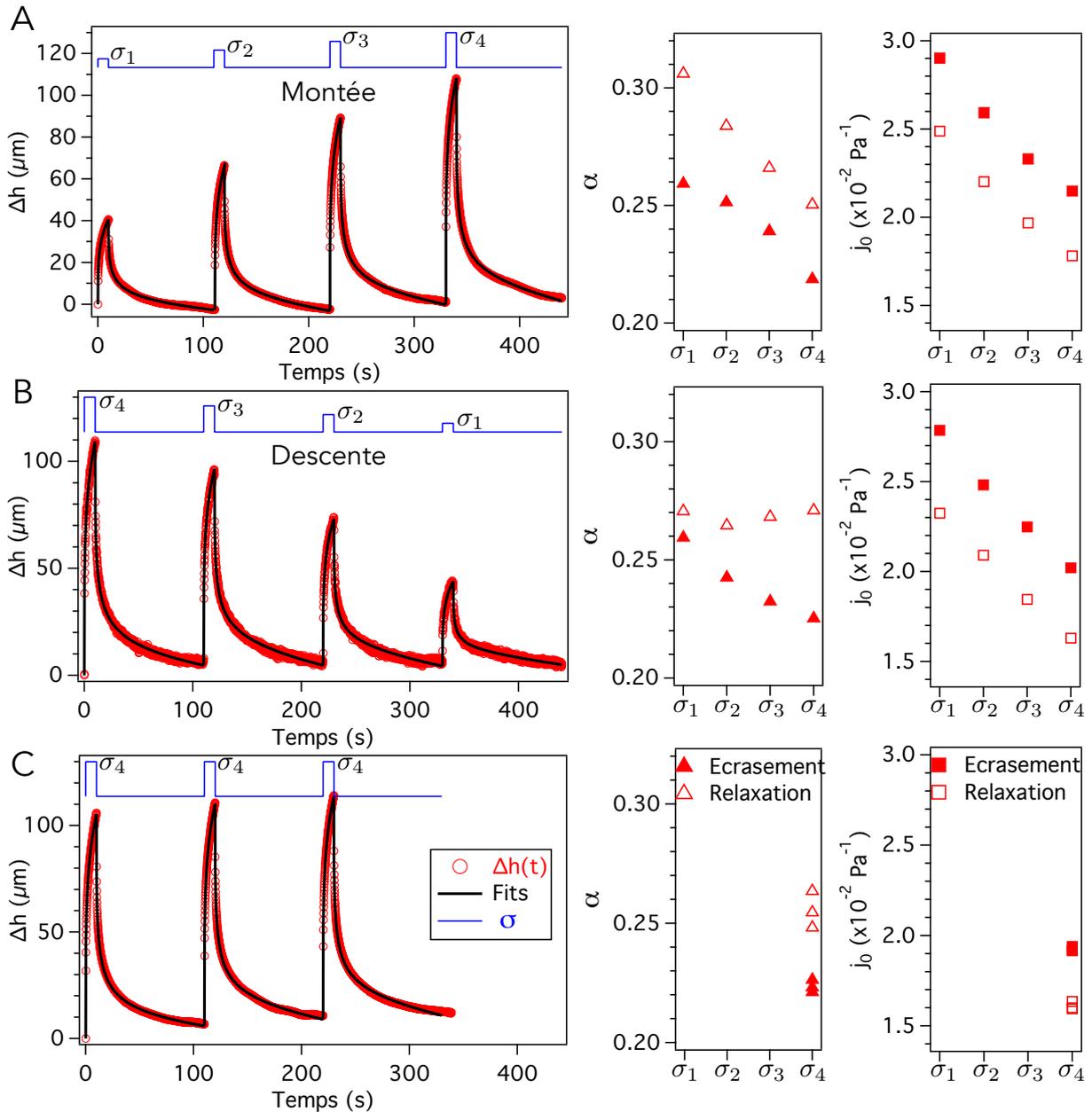


FIGURE I.6.7 – **Réponse à des créneaux de contrainte** Variation de la hauteur Δh au cours du temps d'un agrégat soumis à (A) des créneaux croissants de contrainte (« Montée »), (B) des créneaux décroissants (« Descente ») et (C) des créneaux de hauteur constante. L'allure du signal $\sigma(t)$ est rappelée en bleu sur chaque graphe. Les points $\Delta(t)$ sont ajustés selon la procédure décrite ci-contre et les ajustements sont superposés en noir. Pour chaque signal d'écrasement, les paramètres $j_{0E\sigma_i}$, $j_{0R\sigma_i}$, $\alpha_{E\sigma_i}$ et $\alpha_{R\sigma_i}$ sont présentés dans les graphes de droite. Les symboles pleins correspondent aux valeurs d'écrasement et les symboles vides à la relaxation.

déterminés aux étapes précédentes. L'indice E correspond à l'écrasement et l'indice R à la relaxation. Le paramètre $j_{0E/R}(\sigma_i)$ se calcule à partir des $\lambda_{0E/R\sigma_i}$: $j_{0E/R}(\sigma_i) = \lambda_{0E/R\sigma_i} / (h_0\sigma_i)$.

La Figure I.6.7 présente l'ajustement et les différents paramètres obtenus avec cette méthode. Les valeurs obtenues pour j_0 et α à la montée et à la descente pour une contrainte donnée sont très proches. De plus $\alpha_{E\sigma_4}$ et $j_{0E\sigma_4}$ sont en accord avec les valeurs mesurées précédemment en I.6.1. On observe une diminution des paramètres j_{0R} , j_{0E} et α_E lorsque la contrainte augmente. Le paramètre α_R ne semble pas être affecté par la valeur de la contrainte à la descente, alors qu'il diminue pour le signal en montée.

Ces mesures ont été réalisées sur 6 agrégats différents. L'ensemble des résultats est présenté sur la Figure I.6.8, où chaque paramètre est exprimé en pourcentage de la valeur du paramètre à la contrainte σ_1 . On retrouve les mêmes variations pour j_0 et α en fonction de la contrainte que celles observées avec l'agrégat de la Figure I.6.7. Augmenter la contrainte d'un facteur 4 (passage de $\sigma_1 \simeq 0,5$ Pa à $\sigma_4 \simeq 2$ Pa) entraîne une diminution du préfacteur j_0 d'environ 30%, soit une augmentation de la rigidité d'un facteur 1,4. Ceci met en évidence un durcissement des agrégats avec la contrainte appliquée.

Concernant l'exposant α , il diminue d'environ 15 % dans les expériences « montée », ce qui indiquerait un comportement plus élastique. Cependant l'exposant reste constant sur les expériences « descente ». Il est donc difficile de statuer sur un éventuel effet de la contrainte sur l'exposant de la loi puissance.

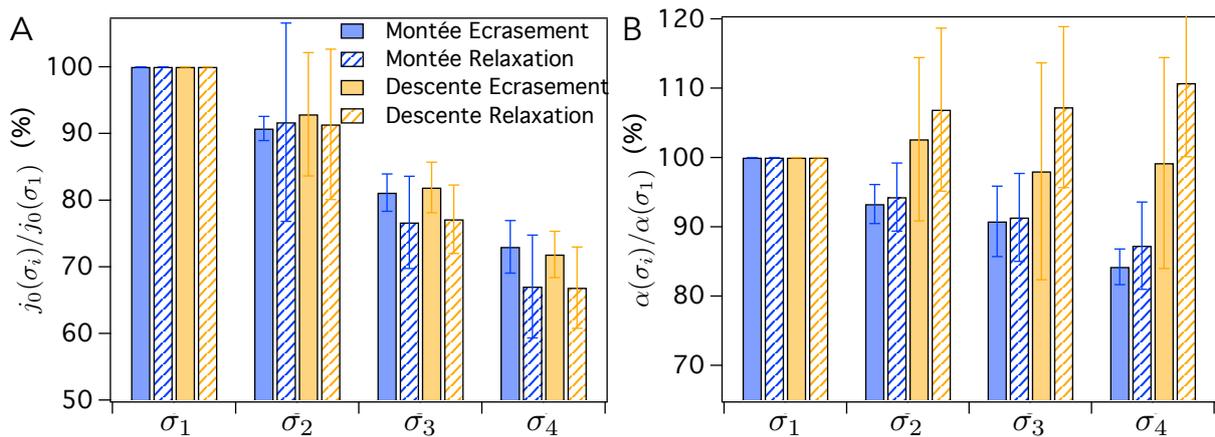


FIGURE I.6.8 – **Variations relatives de α et j_0 en fonction de la contrainte** (A) Le préfacteur $j_0(\sigma_i)$ et (B) l'exposant $\alpha(\sigma_i)$ sont normalisés par la valeur à la contrainte σ_1 . Ces graphes rassemblent les mesures obtenues avec les signaux « Montée » (en bleu) et « Descente » (en jaune) dans les phases d'écrasement (couleur pleine) et de relaxation (couleur hachurée). Les moyennes sont effectuées à chaque fois sur 6 agrégats.

L'expérience avec les 3 créneaux de même amplitude à σ_4 (Figure I.6.7) sert à vérifier que la réponse de l'agrégat est identique pour les trois créneaux et que l'on retrouve bien les valeurs mesurées en I.6.1 pour α et j_0 en écrasement. On obtient des résultats similaires avec les 6 agrégats utilisés.

Il est intéressant de remarquer que l'on a systématiquement $j_{0E} > j_{0R}$ et $\alpha_E < \alpha_R$. Ces observations ont déjà été faites à l'échelle de la cellule unique et les rapports entre les paramètres à l'écrasement et à la relaxation dépendent de l'état des précontraintes du cytosquelette des cellules [120]. Ceci signifie que les agrégats ne restituent pas toute l'énergie lors de la relaxation ($j_{0E} > j_{0R}$) et que la relaxation est associée à un comportement plus fluide avec plus de dissipation ($\alpha_E < \alpha_R$).

L'ensemble des résultats obtenus semble donc mettre en évidence une rigidification des agrégats multicellulaires avec la contrainte.

6.4 Discussion

Observation d'une rhéologie en loi puissance

Observer ce type de rhéologie en loi puissance pour un agrégat multicellulaire est très intéressant. A notre connaissance, cette observation n'a jamais été effectuée auparavant. La valeur de l'exposant mis à jour indique que c'est le comportement élastique qui domine dans la réponse des agrégats. Ces agrégats sont également relativement mous avec un module élastique de l'ordre de la centaine de Pascal. La valeur de l'exposant est proche des valeurs rapportées dans la littérature pour les cellules uniques. Il est donc probable que l'on sonde principalement la contribution des cellules dans ces agrégats ne contenant pas de matrice extracellulaire. L'origine de ce comportement en loi puissance est à rapprocher de la structure multi-échelle du tissu et de l'existence de nombreux processus de relaxation différents (voir détails en I.3.2.2). Nous avons néanmoins montré que les adhésions cellule-cellule contribuaient de manière importante à la rigidité du tissu et donc que nous mesurons bien les propriétés mécaniques du tissu.

Non linéarité

Il est également intéressant d'avoir pu mettre à jour un comportement non linéaire de rigidification de l'agrégat avec la contrainte car ce phénomène existe aussi à l'échelle de la cellule unique (voir détails en I.3.2.3). Les gammes de modifications des paramètres dues aux effets non linéaires sont comprises dans les barres d'erreurs de la mesure d'ensemble. Ce sont donc des effets fins. Ceci explique pourquoi l'expérience de rhéologie oscillatoire, dans laquelle nous nous sommes efforcés de réduire l'amplitude de la modulation sinusoïdale à $f_V/2$, donne des résultats cohérents (I.6.1.2).

Les observations que nous avons faites sont cependant différentes de celles rapportées par Stirbat et al [3] pour des agrégats multicellulaires. Dans cette étude utilisant un rhéomètre commercial pour cisailer simultanément un grand nombre d'agrégats, une diminution de la rigidité avec la contrainte est mise en évidence. Les conditions expérimentales sont différentes, avec notamment des déformations en cisaillement plus importantes (de l'ordre de 40 à 50%). Ceci pourrait expliquer que l'on sonde des contributions non linéaires différentes. Le domaine de l'étude des non linéarités à l'échelle des agrégats est un domaine jeune, il existe peu de contributions à ce sujet dans la littérature.

Relation entre rhéologie de la cellule et rhéologie du tissu

Nous nous sommes intéressés à une question importante en rhéologie des tissus biologiques, à savoir la relation entre les propriétés rhéologiques du tissu et celles des cellules qui le constituent. Nous avons travaillé au laboratoire MSC, avec Atef Asnacios et son thésard Florian Fage qui ont développé un rhéomètre pour cellule unique entre deux microplaques (voir I.3.2.1 et [63]) pour caractériser la rhéologie individuelle des cellules F9 utilisées et la comparer à la rhéologie de l'agrégat. Ce dispositif a l'avantage de travailler en compression, comme notre rhéomètre magnétique, et de sonder l'ensemble de la cellule. Nous avons malheureusement été confronté à des difficultés expérimentales. Comme présenté en I.3.2, les cellules possèdent un comportement en loi puissance par morceau. Pour les cellules F9, la zone de transition entre les deux domaines se situe au milieu de la gamme de fréquences accessibles (0,1 Hz à 6,4 Hz) par le rhéomètre, ce qui ne permet pas une mesure précise de la valeur de l'exposant. De plus, les cellules F9 sont très molles, il a donc fallu utiliser une microplaque souple de très faible rigidité pour

effectuer les mesures. Ceci a pour conséquence de rendre à hautes fréquences la mesure sensible à la viscosité du milieu environnant ; ce qui perturbe l'évaluation précise du module. Il semblerait qu'il soit de l'ordre de quelques centaines de Pascal. Nous travaillons actuellement à améliorer ces mesures.

Il existe quelques études dans la littérature qui rapportent des mesures effectuées sur des cellules F9, il est cependant difficile de tirer des conclusions précises. Des mesures réalisées avec un microscope à force atomique donnent une valeur de 0,2 pour l'exposant et de 3,8 kPa pour le module d'Young [121]. Des études utilisant des billes magnétiques rapportent une valeur de $\alpha = 0.19$ (billes auxquelles on impose un couple) [67] et de $\alpha = 0.3$ (billes que l'on tire avec une pince magnétique) [122, 120] ; les $1/j_0$ associés valant quelques centaines de Pascal.

Statuer sur la valeur de α est délicat, d'autant plus que les valeurs rapportées sont proches de celle mesurée pour les agrégats. Concernant le module élastique, il semble que le tissu (autour de 100 Pa) soit plus mou que les cellules individuelles (plusieurs centaines de Pa). Il est clair que des mesures plus précises avec le dispositif du rhéomètre à microplaques sont nécessaires pour approfondir la question de la relation cellule-tissu.

6.5 Conclusion et perspectives

Nous avons développé un rhéomètre magnétique qui permet d'appliquer une grande variété de contraintes magnétiques dépendant du temps. Ceci nous a permis de mettre à jour un comportement en loi puissance pour les agrégats multicellulaires en travaillant à la fois en régime temporel et fréquentiel. Nous avons également pu commencer à caractériser la réponse non linéaire de ces tissus.

Parmi les perspectives envisagées, un projet s'inscrit dans une collaboration avec Philippe Marcq et Vincent Nier (en thèse) de l'Institut Curie et Cyprien Gay au laboratoire MSC. L'idée est de soumettre l'agrégat à un signal de force riche en fréquences, une sorte de bruit blanc dont on contrôle le contenu fréquentiel et l'amplitude de chacune des composantes. Notre dispositif est bien adapté pour ce type d'expérience car nous pouvons générer n'importe quel signal $f_V(t)$. Philippe et Vincent développent des méthodes numériques d'inférence de modèles rhéologiques à partir des signaux de sollicitation et de réponse du milieu. Ceci devrait permettre de mesurer « toute » la rhéologie (modèle et non linéarité) du système en une acquisition. Des expériences préliminaires prometteuses ont été réalisées montrant qu'un modèle fractionnaire (loi puissance) est le meilleur modèle possible (parmi l'ensemble de modèles à deux paramètres) pour décrire le système. Des développements numériques sont en cours pour tenir compte d'éventuelles non linéarités.

Il reste plusieurs expériences à réaliser, notamment élargir le nombre d'inhibiteurs utilisés et étudier leurs effets sur la réponse non linéaire des agrégats. Faire varier la vitesse à laquelle on sollicite l'agrégat (via la variation de la pente d'une rampe de contrainte par exemple) pourrait apporter des informations importantes sur les mécanismes à l'oeuvre dans la réponse du tissu (vis à vis des réarrangements cellulaires par exemple).

Il serait également intéressant de pouvoir générer des contraintes magnétiques plus fortes pour avoir accès à des déformations plus importantes et donc à des régimes de plus fortes non linéarités. Plusieurs solutions sont envisageables, comme utiliser des cellules capables d'internaliser plus de nanoparticules que les F9 tout en pouvant former des agrégats cellulaires cylindriques, ou utiliser des nanoparticules avec une plus forte susceptibilité magnétique. Les nanocubes d'oxyde de fer utilisés dans la Partie II sont de potentiels candidats.

PARTIE II | Biodégradation de nanoparticules magnétiques

7 | Etat de l'art

Sommaire

7.1	Dégradation des nanoparticules d'oxyde de fer dans l'environnement cellulaire . .	81
7.2	Toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer ?	83
7.2.1	Une faible cytotoxicité dépendant de la dose	83
7.2.2	Mais des effets adverses sur les cellules	83
7.2.3	Des études in vivo contradictoires et peu nombreuses	84
7.2.4	Paramètres influençant la toxicité	84
7.2.5	Nécessité d'une uniformisation des études de toxicité	85
7.3	Homéostasie du fer	85
7.3.1	Fonctionnement	86
7.3.2	Perturbations dues aux nanoparticules d'oxyde de fer	89
7.4	Approche proposée	89

L'utilisation de nanoparticules pour créer des tissus biologiques nécessite de savoir ce que deviennent à long terme ces nanomatériaux. Ce chapitre présente une revue de l'état actuel des connaissances sur le devenir des nanomatériaux en oxyde de fer dans l'environnement intracellulaire. Les nanoparticules peuvent subir une dégradation qui conduit à la libération de fer libre dans le cytoplasme. Ceci pose la question de la toxicité pour les cellules et l'organisme. Cet apport en fer peut notamment perturber l'homéostasie du fer.

7.1 Dégradation des nanoparticules d'oxyde de fer dans l'environnement cellulaire

Une fois internalisées dans les cellules, les nanoparticules d'oxyde de fer peuvent subir une dégradation qui conduit à la perte des propriétés magnétiques et à la libération de produits de dégradation.

Perte de la structure cristalline

La dégradation des nanoparticules dans les cellules est associée à la destruction de l'arrangement cristallin des atomes de fer et d'oxygène. Les nanoparticules sont concentrées dans les endosomes de la cellule. Ces organelles, dont le pH est acide, assurent des fonctions de dégradation des objets endocytés. Cette dégradation a été mise à jour lors des premières études sur l'utilisation des nanoparticules comme agents de contraste. Elle a ensuite été mieux caractérisée par des études in vitro utilisant des solutions reproduisant certaines des conditions intracellulaires des endosomes (pH = 4,5 avec la présence de chélateurs du fer) [123, 124]. Le maximum de dégradation est obtenu pour un pH voisin de 4 en présence de citrate

[125].

Des observations similaires ont été faites chez l'animal après l'injection de nano-particules, en réalisant des clichés de microscopie électronique des organes où les particules sont le plus concentrées (foie et rate) [126, 127, 47]. La quantification de la dégradation des nanoparticules *in vivo* n'est pas facile car seulement une partie de la dose administrée est internalisée par les cellules, le reste étant éliminé par voie rénale.

Il y a très peu d'études étudiant la dégradation intracellulaire sur des cellules en culture. Aucune mesure quantitative de la dégradation de nanoparticules magnétiques dans les cellules d'un tissu n'a été faite jusqu'à présent.

Mécanisme de la dégradation ? Importance de l'architecture et de l'enrobage

Malgré ces observations le mécanisme précis associé à la dégradation n'est toujours pas connu. Certains paramètres comme l'enrobage et l'architecture des nanoparticules semblent avoir une grande influence sur les mécanismes associés à la dégradation.

Le suivi des propriétés magnétiques ainsi que la microscopie électronique haute résolution de nanoparticules dans des milieux acides au pH variable et en présence de citrate (chélatant du fer), ont mis en évidence un mécanisme de dégradation tout-ou-rien pour des nanoparticules d'oxyde de fer [125]. *In vitro* les nanoparticules sont soit intactes, soit complètement dégradées, on n'observe pas de nanoparticules de taille intermédiaire au cours de la dégradation, et l'analyse des courbes d'aimantation ne montre pas de changement significatif de la distribution en taille de la suspension.

Ce constat n'est cependant pas toujours valable, une diminution de la taille moyenne des nanoparticules au cours de leur dégradation a été démontrée *in vitro* pour des nanoparticules cubiques [128], multicoeurs [129] ou avec différents enrobages [130]. Ceci peut être relié à une cinétique plus lente de dégradation une fois que la particule a commencé à être endommagée.

Il semble que l'architecture (taille et structure) et l'enrobage jouent un rôle important vis à vis des mécanismes de dégradation, notamment sur sa cinétique. L'étude [125] compare *in vitro* la dégradation de trois nanoparticules avec des tailles (entre 5 et 10 nm) et des enrobages (citrate ou dextran) différents. Les trois nanomatériaux se dégradent à des vitesses différentes. Les développements récents de la microscopie électronique en phase liquide ont permis de suivre en direct la dégradation de nanocubes avec différents enrobages et de nanoparticules multicoeurs [128, 129]. Ces nanomatériaux subissent une attaque selon des plans cristallins préférentiels, les nanoparticules sont progressivement dissoutes dans le milieu. L'importance de l'enrobage a également été mis en évidence, l'attaque se produit là où la couche de polymère est moins épaisse (sur les arêtes ou sur les cubes présents au bord des amas).

Des efforts sont encore nécessaires pour comprendre les mécanismes à l'oeuvre lors de la dégradation intracellulaire des nanomatériaux.

Prise en charge par les cellules et recyclage

La cellule doit faire face à une augmentation soudaine de la concentration en fer dans son cytoplasme afin d'éviter les effets toxiques qui peuvent y être liés (voir détails des mécanismes associés à la toxicité en II.7.2). Le fer libéré est pris en charge par la cellule via les mécanismes assurant le métabolisme du fer (voir description détaillée en II.7.3). Un recyclage du fer issu de la dégradation a même été mis en

évidence chez la souris et le rat en utilisant des nanoparticules formées de l'isotope ^{59}Fe et en retrouvant cet isotope du fer dans l'hémoglobine des globules rouges des animaux [131, 132]. La cellule peut se servir du fer artificiellement introduit par le marquage magnétique pour l'inclure dans les protéines qu'elle synthétise.

7.2 Toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer ?

Conjointement au développement des applications pour la nano-médecine utilisant des nanoparticules d'oxyde de fer, les inquiétudes quant à de potentiels effets néfastes sur l'organisme persistent. Historiquement ces nanomatériaux sont considérés comme étant biocompatibles. Cette conclusion repose principalement sur des tests de viabilité cellulaire qui ont montré l'absence ou un faible niveau de toxicité. Certaines études ont identifié que l'exposition aux nanoparticules d'oxyde de fer pouvait perturber certaines des fonctions cellulaires. La récente revue de Valdighiesais et al. dresse un panorama de toutes les études conduites jusqu'à présent [46] et vient compléter de précédentes revues sur le sujet [133, 134, 44, 135]. Les résultats restent néanmoins contradictoires. L'ensemble des références présentées dans la suite de cette section ne se veut pas exhaustif, mais vise à donner une meilleure idée de l'état des recherches dans ce domaine.

7.2.1 Une faible cytotoxicité dépendant de la dose

Il existe beaucoup d'études se concentrant sur la cytotoxicité induite après exposition aux nanoparticules sur des cellules cultivées en monocouche. De très nombreux types cellulaires ont été testés avec un grand nombre de nanoparticules de taille et d'enrobage différents avec des doses également très variables. Cependant il n'y a pas ou très peu d'études systématiques sur l'influence d'un paramètre donné. Ce qui rend difficile toute comparaison pour faire apparaître un consensus.

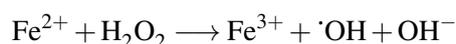
Des études montrent l'absence de cytotoxicité en dessous de concentrations en fer allant de 10 à 100 $\mu\text{g/mL}$ [136, 137]. Dans la majeure partie des études la diminution de la viabilité cellulaire (première définition de la cytotoxicité), quand elle est présente, n'est visible qu'aux doses les plus fortes ou aux temps d'incubation les plus longs. Ceci fait apparaître les nanoparticules d'oxyde de fer comme relativement sûres du point de vue de la cytotoxicité in vitro.

7.2.2 Mais des effets adverses sur les cellules

Par ailleurs d'autres études ont mis en évidence des perturbations de certains processus cellulaires sans qu'elles conduisent nécessairement à la mort cellulaire.

Voici les principaux mécanismes associés aux perturbations du fonctionnement cellulaire qui ont été observés jusqu'à présent :

Génération de ROS Les ions Fe(II) issus de la dégradation peuvent réagir avec du peroxyde d'hydrogène selon la réaction de Fenton :



pour produire des radicaux $\cdot\text{OH}$. La présence de Fe(II) dans les mitochondries peut également conduire à la formation de $\cdot\text{O}_2^-$ qui perturbent le fonctionnement des mitochondries. Ces radicaux sont appelés ROS (pour Oxygen Reactive Species). Ce sont des espèces très réactives qui peuvent réagir avec des biomolécules telles que l'ADN, les protéines, les polysaccharides ou les lipides et les endommager. Ceci

perturbe l'activité cellulaire et crée un stress oxydant [138]. C'est le mécanisme le plus souvent évoqué pour expliquer la toxicité de ces nanomatériaux.

Modification de l'expression des gènes Il est courant d'observer après l'exposition aux nanoparticules une modification de l'expression de certains gènes. Le plus souvent ce sont les gènes impliqués dans le maintien de l'homéostasie du fer (voir II.7.3 pour plus de détails), mais ces dérèglements peuvent aussi toucher les gènes associés aux protéines du cytosquelette ou à la sécrétion d'insuline [139].

Perturbation du cytosquelette La présence de nanoparticules à fortes doses peut modifier l'organisation du cytosquelette d'actine et impacter la migration cellulaire [140].

Il est important de noter que la quasi totalité des études *in vitro* de toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer ont été menées sur des monocouches cellulaires. Or les cellules ont un comportement différent à 2 et à 3 dimensions et les résultats de toxicité peuvent changer en fonction du mode de culture [141]. Cette étude compare la toxicité de nanoparticules de tellure de cadmium sur des cellules de carcinomes hépatiques cultivées à 2 dimensions ou sous forme d'agrégats à 3 dimensions. Les effets toxiques sont diminués de manière significative en culture à trois dimensions. Ceci ouvre de nouvelles perspectives expérimentales en nano-toxicologie, avec notamment l'utilisation de nouveaux modèles plus représentatifs des conditions *in vivo* des cellules.

7.2.3 Des études *in vivo* contradictoires et peu nombreuses

Quelques études ont étudié l'effet des nanoparticules directement sur des organismes vivants, principalement des rongeurs. Les modèles animaux sont importants car ils permettent de soulever les questions de l'internalisation et de la bio-distribution dans l'organisme, ce que la culture en monocouche ne permet pas [142].

Il est important de noter qu'*in vivo* les nanoparticules ne sont pas réparties de manière homogène, mais qu'elles s'accumulent en des points précis, le plus souvent dans le rate et le foie. Malgré une dose globale faible à l'échelle de l'organisme, de fortes concentrations locales peuvent déclencher une réponse toxique qui peut ensuite avoir des conséquences au niveau de l'organisme entier. Les expériences *in vivo* ont donc l'intérêt de pouvoir apprécier la réponse dans son ensemble.

De la même manière qu'avec les études *in vitro*, les conditions expérimentales sont très variables en terme de nanomatériaux et de doses testés, avec notamment avec de nombreux modes d'administration (oral, intraveineux, sous cutané, par voie aérienne, ...) rendant difficile une comparaison et une interprétation systématiques des résultats.

Suite à l'administration des nanoparticules une réaction inflammatoire peut être observée. La littérature rapporte des résultats contradictoires sur la neuro-toxicité, l'immuno-toxicité et même des effets sur la reproduction des animaux exposés. Néanmoins la dose létale rapportée chez la souris pour des nanoparticules citratées de 8 nm (17 mmol de fer par kg) est de l'ordre de 400 fois supérieure à la dose nécessaire à un examen IRM [136]. Ceci va dans le sens d'une relativement bonne biocompatibilité.

7.2.4 Paramètres influençant la toxicité

L'ensemble de ces études a néanmoins permis de mettre à jour certains paramètres qui semblent avoir une influence importante sur le niveau de toxicité et les mécanismes de biotransformation.

Taille La taille des nanoparticules impose le rapport de la surface exposée ramenée au volume du nano-objet. Elle a donc un lien direct avec la réactivité de surface qui est associée à la toxicité. De plus la taille est un facteur important dans l'internalisation et la biodistribution et qui influe donc sur la quantité intracellulaire de fer [143].

Enrobage En plus d'être nécessaire pour assurer la stabilité colloïdale des suspensions, l'enrobage chimique et la fonctionnalisation de surface des nanoparticules sont des paramètres très importants dans la réponse biologique. L'interaction des nanoparticules avec les protéines et la membrane plasmique et donc in fine leur internalisation sont médiées par l'enrobage. La dégradation subie dans les endosomes est dépendante de la surface des nanoparticules [128]. Ce qui conduit à une modulation de la quantité de fer libérée dans le cytoplasme et donc in fine une modulation des processus toxiques [144, 145, 146]. La fonctionnalisation de la surface ajoute la problématique du devenir des molécules greffées en surface qui elles aussi peuvent être dégradées, s'accumuler et être toxiques pour les cellules.

Interaction avec les molécules biologiques Une fois présentes dans l'organisme et en contact avec des fluides biologiques (typiquement le sang après une injection intraveineuse) les nanoparticules interagissent fortement avec les protéines et anticorps présents dans ces fluides. Il en résulte la formation d'une couronne protéique autour des particules (on parle d'opsonisation) qui peut changer leur identité biologique et la manière dont elles interagissent avec d'autres constituants de la cellule. La réponse de la cellule, et la toxicité liée aux nanoparticules peuvent être très différentes en fonction des protéines adsorbées à leur surface [147, 142].

Etat d'oxydation L'état d'oxydation du fer présent dans les nanoparticules semble être un facteur important. Une étude comparant les effets de nanoparticules de maghémite et de magnétite sur le niveau d'oxydation de l'ADN, a montré que la magnétite (son fer Fe(II) peut être oxydé en Fe(III)) provoquait plus de stress oxydant que la maghémite (fer à l'état de Fe(III)), cet effet pouvant être compensé par un enrobage protecteur des nanoparticules de magnétite [41, 148].

7.2.5 Nécessité d'une uniformisation des études de toxicité

Il n'existe pas vraiment de consensus clair pour statuer sur la toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer, si ce n'est qu'elle est relativement basse, voire nulle à faible dose. Cela tient principalement à l'énorme variabilité des conditions expérimentales dans les études déjà menées. Ceci engendre des résultats souvent contradictoires in vitro et in vivo. Un effort est donc nécessaire pour standardiser les méthodes et développer des modèles plus adaptés que la culture en monocouche pour étudier la toxicité de ces nanomatériaux.

Les études à l'échelle d'un organisme entier sont peu nombreuses et les études épidémiologiques sur l'humain sont quasi-inexistantes (2 études rapportées). Il reste donc encore beaucoup de travail à accomplir pour pouvoir répondre de manière complète et systématique à la question de la toxicité des nanomatériaux en oxyde de fer.

7.3 Homéostasie du fer

Le fer est un élément très important pour l'organisme, il est en effet nécessaire à l'activité de certaines protéines associées à des processus cellulaires indispensables à la survie incluant entre autres la respiration, la synthèse de l'ADN et le transport de l'oxygène. Présent en excès, il catalyse la génération de radicaux libres provoquant un stress cellulaire en endommageant les protéines, l'ADN et les lipides.

A l'opposé, un défaut de fer impacte la prolifération des cellules. Des niveaux anormaux en fer sont associés à des pathologies (hémochromatose et maladies neurodégénératives). Dans un organisme sain, la concentration en fer est une grandeur finement régulée.

7.3.1 Fonctionnement

Le fer assimilé par notre alimentation (de 1 à 3 mg par jour) est capté par les cellules de l'intestin puis circule dans le sang à l'état d'oxydation III, lié à un transporteur pouvant fixer deux atomes de fer appelé transferrine (Tf) formant le complexe Tf(Fe₂). Cet apport compense les pertes liées à l'élimination rénale. Le maintien de l'homéostasie du fer repose sur l'équilibre entre l'import, le stockage et l'export de ce fer circulant par les cellules de l'organisme. Cet équilibre est assuré par les protéines régulatrices du fer IRP1 et IRP2. La Figure II.7.1 présente un résumé des différents mécanismes impliqués.

Import cellulaire

Le fer pénètre dans les cellules par liaison du complexe Tf(Fe₂) au récepteur membranaire de la transferrine (TfR1) puis internalisation de l'ensemble par endocytose. Dans les endosomes le pH acide provoque la dissociation du complexe. Le Fer (III) est réduit en Fer (II) par la protéine STEAP3 puis peut être transféré dans le cytosol par le transporteur d'ions divalents DMT1 présent dans la membrane des endosomes. TfR1 et Tf sont quant à eux recyclés à la membrane cytoplasmique. Le Fer (II) peut alors être utilisé pour la formation de protéines nécessitant du fer, être stocké ou être exporté à l'extérieur de la cellule.

Stockage

La protéine ferritine assure le stockage du fer dans les cellules [150, 151, 152]. C'est un complexe protéique issu de l'assemblage de 24 sous-unités qui forme une cavité de 8 nm pouvant renfermer jusqu'à 4000 atomes de fer sous forme de cristaux d'oxyhydroxyde de Fer (III), principalement sous forme de ferrihydrite. Des canaux dans la structure en cage permettent l'entrée des ions Fer (II) qui sont oxydés et forment des cristaux par nucléation.

Les sous unités peuvent être de deux formes (partageant la même séquence d'acides aminés à 55%), la chaîne légère ou ferritine L et la chaîne lourde aussi appelée ferritine H. La ferritine H (21 kDa, 182 acides aminés) possède une activité ferroxidase et peut oxyder le Fe (II) en Fe (III). La chaîne légère (19kDa, 174 acides aminés) est responsable de la liaison au Fe (III) grâce à ses résidus glutamates en position 57 et 60. Dans un complexe ferritine le ratio entre chaînes légères et chaînes lourdes est variable. La ferritine est principalement localisée dans le cytosol mais peut également être présente dans les mitochondries et le noyau. Des ferritines chargées de fer ont également été identifiées sur des clichés de MET dans les endosomes à proximité de nanoparticules d'oxyde de fer internalisées [126, 128].

En MET le fer cristallin présent dans les ferritines est dense aux électrons et les ferritines chargées apparaissent comme des points foncés. Leur taille est reliée au nombre d'atomes de fer enfermés dans la cage [153]. La taille moyenne est de 6 nm.

Des atomes de fer peuvent également être libérés de la cage de ferritine via une sortie par des canaux de la structure. La forme non chargée en fer de la ferritine est appelée apo-ferritine, elle n'est pas visible en MET.

Export cellulaire

La sortie du fer du cytoplasme de la cellule est assurée par la protéine transmembranaire ferroportine [159]. Pour pouvoir être exporté à l'extérieur de la cellule le Fer (II) doit être oxydé en Fer (III) par la

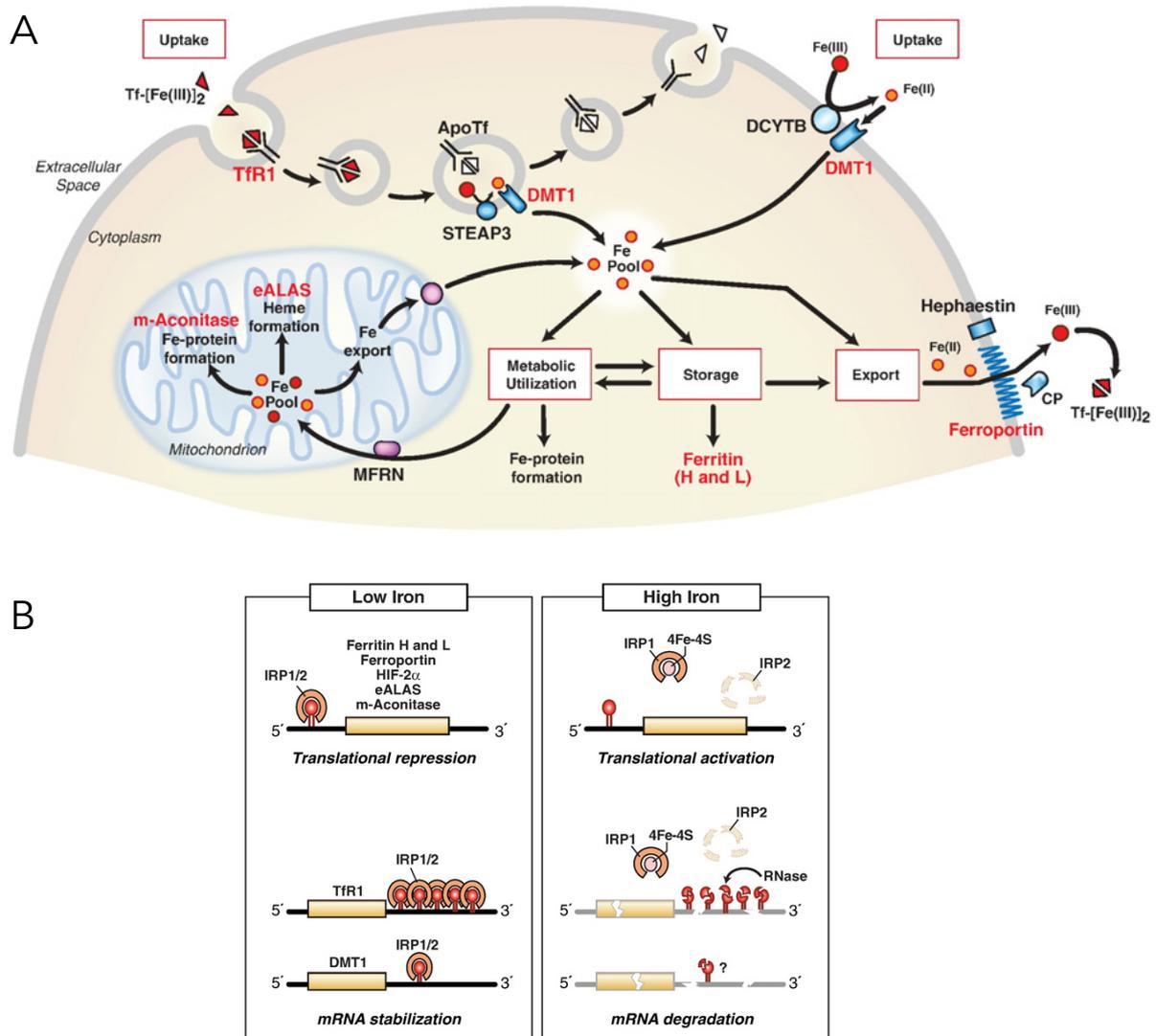


FIGURE II.7.1 – **Métabolisme du fer** (A) Schéma résumant les mécanismes mis en jeu dans le métabolisme cellulaire du fer. Le fer circulant lié à la transferrine $Tf(Fe(III))_2$ (triangle rouge) pénètre par endocytose dans la cellule après liaison au récepteur membranaire de la transferrine (TfR1). Le pH acide (≈ 4) de l'endosome provoque la libération du $Fe(III)$ (rond rouge) qui est oxydé par STEAP3 en $Fe(II)$ (rond orange) et transporté dans le cytosol par DMT1. En parallèle Tf et TfR1 sont recyclés. La réserve de $Fe(II)$ peut servir au métabolisme de la cellule, peut être stockée dans la ferritine ou être exportée à l'extérieur de la cellule par la ferroportine. Les protéines dont les ARNm présentent un site de fixation des IRPs sont écrites en rouge. (B) Résumé du mode de régulation des IRPs sur la traduction des protéines impliquées dans le maintien de l'homéostasie du fer. Extrait de [149].

Cellules	Nanoparticules	Fer / cellule (pg)	Durée exp.	Méthodes	Effet	Ref.
Hela	Ferumoxydes 120-150 nm / dextran	20	28 j. sans passage et 9 sem. avec passage	qPCR, Western Blot	TfR1 ↓ les premiers jours ferritine ↑ à partir de J7	[154]
hMSC	Ferumoxydes 120-150 nm / dextran	45	28 j. sans passage et 9 sem. avec passage	qPCR, Western Blot	TfR1 ↓ 14 premiers jours ferritine ↑ à partir de J14	[154]
macrophage	Ferumoxydes 120-150 nm / dextran	22	28 j. sans passage et 9 sem. avec passage	qPCR, Western Blot	TfR1 = ferritine ↑	[154]
cellules souches neurales (souris)	Ferumoxydes	-	7 jours	qPCR	TfR1 ↓	[155]
macrophage raw264.7	maghémite 10 nm / DMSA	7 à 25	24 à 72 h	qPCR, Western Blot	ARN : L-ferritine et ferroportine ↑ protéines : L-ferritine ↑ ferroportine =	[156]
hMSC	Ferumoxydes	-	-	gene microarray	ferritine ↑ TfR1 =	[45]
oligodendrocyte cerveau de rat	maghémite 2-20nm / DMSA	-	48 h	Western Blot	L-ferritine ↑	[157]
astrocyte cerveau de rat	maghémite 10 nm / DMSA	-	7 jours	Western Blot	ferritine ↑	[158]
rat (in vivo)	maghémite 10nm / PEG et DMSA	-	30 jours	ELISA	ferritine, ferroportin et DMT1 ↑ avec niveaux ≠ dans foie, rate et reins	[146]

Tableau II.7.1 – **Effets des nanoparticules sur l'homéostasie du fer dans la littérature** L'effet sur l'expression des protéines est indiqué par des flèches : ↑ indique une sur-expression, ↓ une sous-expression et = l'absence de modification.

protéine Hephaestin.

Régulation par les protéines régulatrices du fer (IRPs)

Le niveau d'expression des protéines impliquées dans l'entrée, le stockage et la sortie du fer est contrôlé par les protéines régulatrices du fer appelées IRP pour Iron Regulatory Protein présentes dans le cytosol. Les IRPs peuvent se fixer sur des sites spécifiques de l'ARN messager des protéines précédemment évoquées. Ce site de fixation est localisé au niveau de l'extrémité 5' des ARNm codant pour la ferritine H et L, et pour la ferroportine, et au niveau de l'extrémité 3' des ARNm codant pour TfR1 et DMT1. Les IRP peuvent également former un complexe soufré (4Fe-4S) avec le fer présent dans le cytosol.

Lorsque les IRPs sont fixées sur l'extrémité 5' des ARNm, elles répriment la traduction de l'ARN en protéines associées en gênant l'action des ribosomes. Par contre lorsqu'elles sont fixées en 3' elles augmentent la stabilité de l'ARNm qui peut être traduit un plus grand nombre de fois avant d'être dégradé par les RNases. Quand il y a peu de fer dans le cytosol, les IRPs se fixent aux ARNm, réprimant la traduction des protéines de stockage et de sortie du fer. Si le fer est abondant les IRPs forment un complexe avec le fer et ne se fixent pas au ARNm, les protéines de stockage et d'export peuvent alors être synthétisées tandis que les protéines d'entrée sont moins traduites. La Figure II.7.1.B schématise le fonctionnement de ce système de régulation post-transcriptionnelle.

Il est intéressant de noter que les sites de fixation pour les IRPs sur les ARNm codant pour les ferritines L et H sont légèrement différents. Ceci a pour conséquence de rendre la ferritine L plus sensible à la régulation par IRP [160].

7.3.2 Perturbations dues aux nanoparticules d'oxyde de fer

La dégradation des nanoparticules d'oxyde de fer au coeur des cellules conduit à la libération d'une quantité importante de fer sous forme de complexe soluble dans le cytoplasme. Cet apport de fer peut modifier l'expression des différents acteurs de la régulation du métabolisme cellulaire du fer. Il existe quelques études qui se sont intéressées aux variations de l'expression des gènes associés à ces protéines après exposition et/ou internalisation de nanoparticules d'oxyde de fer sur des cellules. Ces études utilisent des nanoparticules avec des tailles et des enrobages variés sur de nombreux types cellulaires avec des conditions d'incubation différentes. Ils est donc difficile de comparer les différents résultats entre eux, néanmoins il existe une tendance générale montrant l'augmentation de l'expression des protéines de stockage ferritine (quand la distinction est faite entre ferritine L et H, c'est systématiquement la ferritine L qui est sur-exprimée) et d'export ferroportine et la diminution de l'expression des protéines d'import du fer TfR1 dans la cellule. De manière logique, la cellule réagit à l'augmentation du fer cytoplasmique potentiellement toxique en augmentant ses capacités de stockage sous une forme non toxique, en favorisant la sortie du surplus de fer et en limitant l'entrée de fer neuf. Le tableau II.7.1 rassemble les différentes conditions expérimentales et les tendances observées dans la littérature. Les variations des niveaux d'expression ne sont pas toutes observées simultanément.

7.4 Approche proposée

Le manque de méthodes standardisées et quantitatives pour étudier la biotransformation et la toxicité des nanoparticules d'oxyde de fer empêche jusqu'à présent d'obtenir une réponse univoque à ces questions importantes. Fort de ce constat, nous proposons un modèle et un ensemble de méthodes permettant un suivi quantitatif, à moyen terme et multi-échelle du devenir de nanomatériaux magnétiques internalisés au sein de cellules souches mésenchymateuses humaines (hMSC) organisées sous la forme d'agrégats

multicellulaires. Les agrégats multicellulaires de hMSC forment un tissu à trois dimensions dans lequel les cellules ont cessé de se diviser et sécrètent de la matrice extracellulaire. Ce modèle tissulaire simple permet une quantification précise de la dégradation en utilisant le magnétisme comme empreinte macroscopique de l'intégrité des nanomatériaux. Les modifications structurales à l'échelle nanométrique sont suivies par microscopie électronique, tandis que la réponse de la cellule est caractérisée par le niveau d'expression de protéines impliquées dans l'homéostasie du fer. Les résultats obtenus seront également plus représentatifs de ce qui se produit *in vivo* par rapport aux expériences en monocouche.

L'ensemble méthodologique proposé se veut être une alternative aux deux systèmes expérimentaux utilisés jusqu'à présent : la culture en monocouche (peu représentative des cellules dans leur environnement natif, difficile de mener un suivi à long terme, la quantité de nanoparticules par cellule n'est pas fixée car elle est divisée par deux à chaque mytose) et les expériences *in vivo* chez l'animal (compliquées à mettre en oeuvre, difficilement quantitatives du fait de la répartition inhomogène dans l'organisme et où il est difficile de faire varier systématiquement les paramètres face au nombre d'animaux à gérer). Le modèle proposé permet de produire un grand nombre d'agrégats identiques pour pouvoir faire varier systématiquement les paramètres influençant la dégradation et la toxicité des nanoparticules. Ceci diminue la variabilité entre échantillons (par rapport aux modèles animaux) et rend possible une vraie comparaison pour mieux comprendre les mécanismes en cause.

L'ensemble des méthodes proposées est décrit dans le Chapitre II.8. Elles sont ensuite mises en oeuvre dans le Chapitre II.9 pour démontrer leur efficacité et mettre à jour une dégradation massive et rapide, d'origine endosomale de nanoparticules de maghémite citratée en moins d'un mois. Enfin, le Chapitre II.10 montre que notre approche est généralisable à l'étude de la dégradation de n'importe quel nanomatériau magnétique et permet des comparaisons utiles notamment pour étudier une stratégie de protection de nanofleurs d'oxyde de fer par une couche d'or.

8 | Méthodes développées pour l'étude de la biodégradation des nanomatériaux

Sommaire

8.1	Formation des agrégats	91
8.2	Quantification du fer	93
8.2.1	Mesure de la quantité de fer magnétique	93
8.2.2	Mesure de la quantité de fer totale	95
8.3	Caractérisation des nanomatériaux	95
8.3.1	Microscopie électronique en transmission	95
8.3.2	Analyse des courbes d'aimantation	96
8.4	Quantification de l'expression génique	97
8.5	Modèle endosome	97
8.5.1	Extraction des endosomes	97
8.5.2	Mesure de l'aimantation des endosomes	98
8.6	Conclusion	99

Ce chapitre présente l'ensemble des méthodes utilisées et mises au point pour étudier la biodégradation de nanoparticules magnétiques internalisées dans des cellules souches mésenchymateuses formant un tissu modèle à trois dimensions. Nous utilisons les propriétés magnétiques des agrégats pour quantifier et caractériser la biotransformation intracellulaire subie par les nanoparticules. La méthode de formation des agrégats magnétiques est d'abord présentée. Les différents protocoles utilisés - pour quantifier la masse de fer magnétique et de fer total au sein de chaque agrégat - et pour caractériser les modifications structurelles des nanomatériaux, sont ensuite détaillés. Nous avons également étudié la réponse cellulaire suite à l'internalisation des nanoparticules via la quantification de l'expression de certaines protéines impliquées dans l'homéostat du fer. Enfin la procédure mise en place pour étudier la dégradation à l'échelle de l'endosome unique sera décrite. Toutes ces méthodes sont utilisées dans les Chapitres II.9 et II.10.

8.1 Formation des agrégats

Les agrégats sont formés en utilisant la méthode de centrifugation (voir 2.1.3). Cette technique a été privilégiée par rapport au moulage magnétique ou à d'autres techniques classiques car elle permet de former un grand nombre d'agrégats identiques en parallèle, dans de bonnes conditions de stérilité. Le protocole de formation (illustré par la Figure II.8.1) s'inspire des études de différenciation de cellules souches mésenchymateuses en chondrocytes, précédemment réalisées par l'équipe [36]. Les agrégats sont placés pendant un mois dans un milieu de maturation utilisé pour la différenciation en chondrocytes.

Les cellules cessent de se diviser et se mettent à produire de la matrice extracellulaire riche en collagène. La composition du milieu de maturation est détaillée en Annexe A.3.

Culture cellulaire et marquage magnétique Des cellules souches mésenchymateuses (LONZA), issues du même lot, sont cultivées dans du MSCBM (Lonza) à 37°C et à 5% de CO₂. Elles sont amplifiées jusqu'au 4^e passage et atteignent 90% de confluence avant d'être utilisées. Les cellules sont ensuite marquées magnétiquement avec les nanoparticules d'intérêt. Dans les conditions classiques, les nanoparticules citratées de maghémite (utilisées dans l'étude du Chapitre II.9) sont diluées à [Fe] = 0,1 mM dans du RPMI (dans lequel on a ajouté 5 mM de citrate pour assurer la stabilité colloïdale) avant d'être incubées pendant 30 minutes sur les cellules. Les cellules sont ensuite rincées avec du milieu neuf et laissées une nuit dans l'incubateur pour que l'internalisation soit totale.

Formation Un fois l'étape de marquage achevée, les cellules sont décollées à la trypsine avant d'être rincées avec le milieu de maturation. On place 200.000 cellules avec 1 mL de milieu de maturation dans des tubes de 15 mL qui sont ensuite centrifugés à 180 g pendant 2 minutes pour former un culot.

Maturation Les tubes sont placés à l'incubateur (37°C, 5% de CO₂) pendant 27 jours. Très vite après la centrifugation initiale les cellules adhèrent entre elles et le culot s'arrondit pour former une sphère au bout de 3 jours. C'est une manifestation de la tension de surface du sphéroïde. Le milieu de maturation est changé tous les trois jours. On observe une diminution progressive du diamètre des agrégats qui correspond à l'augmentation de la cohésion du tissu.

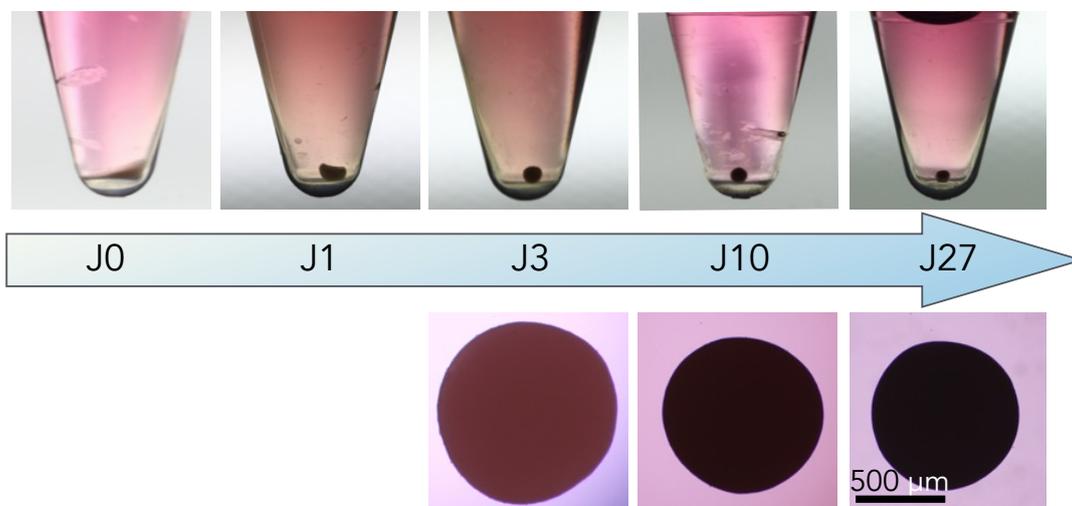


FIGURE II.8.1 – **Formation des agrégats par centrifugation** Illustration du processus de formation par des photos d'un agrégat prises à différents jours de la période de maturation (J0, J1, J3, J10, J27). Après le marquage magnétique, au jour zéro (J0), 200.000 cellules sont mises en contact par centrifugation dans une tube de 15 mL pour former un culot. L'adhésion entre cellules se développe et le culot s'arrondit pour former au bout de quelques jours un sphéroïde.

L'expérience est conçue de la manière suivante : on forme à J0 un grand nombre (typiquement une centaine) d'agrégats identiques et, à différents temps (J0, J3, J9 et J27), on arrête la maturation d'un certain nombre d'entre eux :

- Pour les mesures d'aimantation, les sphéroïdes sont fixés dans la formaline pendant une heure.
- Pour l'analyse élémentaire, ils sont aussitôt digérés dans l'acide nitrique (voir II.8.2.2).
- Pour la microscopie électronique, les agrégats sont fixés avec une solution de glutaraldéhyde.
- Pour la quantification de l'expression protéique, l'ARN est immédiatement extrait (voir II.8.4).

Nous avons vérifié, en mesurant à deux mois d'intervalle l'aimantation d'un agrégat fixé et stocké dans du PBS à 4°C, que le processus de dégradation ne se poursuivait pas après fixation.

8.2 Quantification du fer

Le fer présent au sein des cellules constituant les agrégats peut avoir deux origines. Il peut soit être présent de matière native, soit avoir été introduit par l'internalisation des nanoparticules. Suite à leur entrée dans les cellules, les nanoparticules peuvent être intactes ou dégradées. Le fer cristallin dans les nanoparticules possède des propriétés magnétiques, tandis que les produits de dégradation n'en ont pas. Il est donc important de pouvoir mesurer séparément la quantité de fer magnétique (nanoparticules non dégradées) et de fer non magnétique (endogène et produits de la dégradation).

8.2.1 Mesure de la quantité de fer magnétique

On accède à la masse de fer magnétique par agrégat en mesurant l'aimantation d'un agrégat lorsqu'on le place dans un champ magnétique extérieur. Deux méthodes ont été utilisées pour cette mesure - un protocole « classique » de magnétométrie avec un magnétomètre à échantillon vibrant (VSM pour Vibrating Sample Magnetometer) - et une méthode de magnétophorèse développée durant cette thèse, facile et rapide à mettre en oeuvre au laboratoire.

Magnétométrie

Le magnétomètre utilisé (Quantum Design, Versalab) mesure l'aimantation d'un agrégat fixé et conservé dans du PBS en fonction du champ magnétique extérieur appliqué à 300 K. Le porte échantillon oscille mécaniquement sur l'axe d'une bobine à une fréquence fixée. La mesure de la tension aux bornes de la bobine permet de remonter au moment magnétique de l'échantillon. La Figure II.8.2 présente la courbe d'aimantation de trois agrégats différents formés le même jour dans les mêmes conditions. La mesure inter agrégat est reproductible, cela confirme que le protocole de formation permet d'obtenir des agrégats avec les mêmes caractéristiques (taille, nombre de cellules, aimantation).

Magnétophorèse

Cette méthode a été développée pour sa facilité et sa rapidité de mise en oeuvre. Elle s'inspire de la technique de magnétophorèse de cellules uniques utilisée pour quantifier la quantité de nanoparticules internalisée par cellule (voir Annexe A.4). Son principe est illustré par la Figure II.8.3.A. Un agrégat d'aimantation M , préalablement fixé, est immergé dans du glycérol pur à 37°C. On place ensuite la cuve dans un gradient de champ magnétique homogène ($B=150$ mT et $\text{grad}B=17,5$ T/m) créé par un aimant permanent cylindrique en néodyme (diamètre : 25 mm, hauteur : 10 mm). Le dispositif est intégré sur un microscope inversé (DMIRB, Leica) équipé d'un objectif 2,5x, pour permettre d'enregistrer le mouvement du sphéroïde.

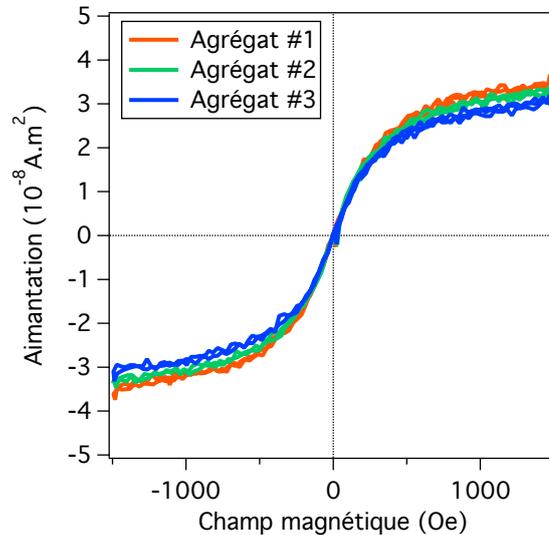


FIGURE II.8.2 – **Aimantation des agrégats magnétiques** Courbes de l'aimantation en fonction du champ magnétique appliqué de trois sphéroïdes différents formés dans les mêmes conditions. Mesures réalisées avec un magnétomètre VSM à 300 K.

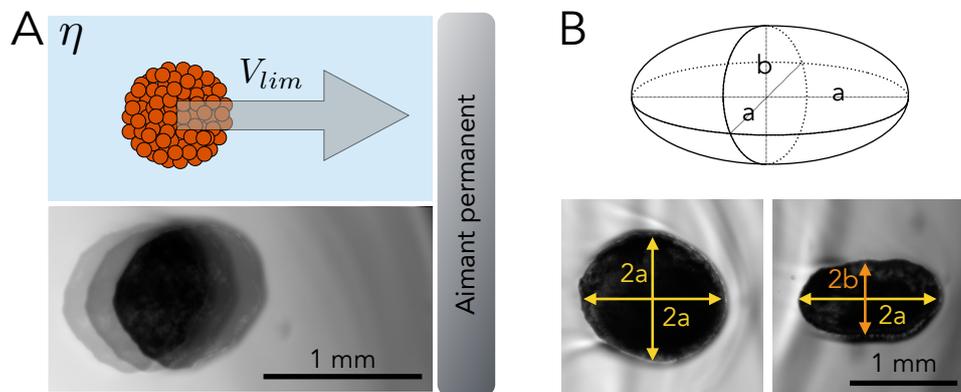


FIGURE II.8.3 – **Magnétophorèse d'agrégats magnétiques** (A) Illustration du principe de l'expérience. Après fixation l'agrégat est placé dans un gradient de champ magnétique connu créé par un aimant permanent. L'agrégat est immergé dans un fluide visqueux (glycérol pur à 37°C). Il atteint une vitesse limite lorsque la force magnétique est équilibrée par la traînée. Superposition de trois images (intervalle de temps égal à 4,5 secondes) d'un agrégat pendant l'expérience. (B) Définition des paramètres décrivant la forme d'un agrégat. Photos selon deux axes orthogonaux d'un agrégat pendant l'expérience de magnétophorèse.

L'agrégat est attiré vers l'aimant par la force magnétique : $F_{mag} = MgradB$ tandis que le fluide visqueux exerce une force de trainée F_{Stokes} . Le nombre de Reynolds associé à l'expérience vaut $Re \simeq 10^3 - 10^4$, ainsi $F_{Stokes} = 6\pi\eta V_{lim}a\kappa$, où $\eta = 0,32 Pa.s$ est la viscosité dynamique du glycérol à 37°C et V_{lim} la vitesse limite atteinte par l'agrégat. L'agrégat est décrit comme un ellipsoïde aplati (voir Figure II.8.3.B) se déplaçant parallèlement à son demi grand axe a (b étant l'autre demi axe). Cette forme aplatie est due à la taille des agrégats. Le facteur de forme κ s'exprime dans ce cas [161] :

$$\kappa = \frac{8}{3} \frac{(\beta^2 - 1)^{3/2}}{\beta(3\beta^2 - 2)\tan^{-1}((\beta^2 - 1)^{1/2}) - \beta}$$

où $\beta = a/b$. Lorsque le régime permanent est atteint ($F_{mag} = F_{Stokes}$) la mesure de V_{lim} , a et b par traitement des films permet de déterminer l'aimantation M de l'agrégat.

A partir de l'aimantation d'un agrégat on peut calculer la masse de fer magnétique correspondant en connaissant l'aimantation à saturation par unité de masse de fer du nanomatériau (mesuré indépendamment), qui vaut $5,6 \cdot 10^{-2} A.m^2$ par gramme de fer pour les nanoparticules citratées utilisées.

Il faut noter qu'il n'est pas possible de réaliser la mesure de l'aimantation par magnétophorèse le jour de la formation de l'agrégat (J0) car ce dernier n'est pas suffisamment cohésif pour être manipulé et n'a pas une forme permettant une bonne estimation du facteur de forme κ (voir Figure II.8.1). Ainsi à J0, la mesure de l'aimantation est seulement faite par VSM.

Ces deux méthodes donnent des résultats identiques, ce qui confirme le bien fondé de la technique de magnétophorèse (voir Figure II.9.5). Cette dernière est très facile à mettre en oeuvre. Cependant la magnétométrie permet en plus d'obtenir des informations sur la taille et la polydispersité des nanoparticules (voir II.8.3.2). Ces deux techniques sont donc complémentaires.

8.2.2 Mesure de la quantité de fer totale

Pour mesurer la quantité de fer totale au sein d'un agrégat, on utilise une technique d'analyse élémentaire (Spectro ARCOS ICP-AES). L'agrégat est dissocié dans 200 μL d'acide nitrique à 70% (Sigma Aldrich, trace metal analysis grade) porté à ébullition pendant 1h. Ce traitement détruit toutes les nanoparticules restées intactes. Tout le fer est donc présent sous forme ionique. La solution est alors diluée avec de l'eau ultrapure pour ensuite réaliser la mesure. Dans les expériences réalisées, la quantité de fer endogène (masse de fer dans un agrégat non marqué magnétiquement) est sous la limite de détection. Elle est donc négligeable par rapport à la quantité apportée par l'internalisation des nanoparticules.

8.3 Caractérisation des nanomatériaux

En plus des mesures quantitatives à l'échelle de l'agrégat entier, il est aussi important de pouvoir avoir accès aux caractéristiques du processus de dégradation à l'échelle nanométrique. L'évolution de la taille, de la polydispersité et de la morphologie des nanomatériaux sont des données très importantes. On peut obtenir ces informations en réalisant des clichés de microscopie électronique en transmission ou en analysant les courbes d'aimantation réalisées avec le VSM.

8.3.1 Microscopie électronique en transmission

Les agrégats utilisés pour la microscopie électronique en transmission (MET) sont d'abord fixés pendant une heure à température ambiante dans une solution de cacodylate à 0,1 M avec 2,5% de glutaraldéhyde

puis pendant une heure à température ambiante dans une solution de cacodylate à 0,1 M avec 1% de tétraoxyde d'osmium. Ils sont ensuite déshydratés par des bains successifs dans l'éthanol avant d'être inclus dans de la résine Epon. L'échantillon est ensuite découpé en tranches de 80 nm d'épaisseur (avec un ultramicrotome UC6 Leica équipé d'un couteau Ultra Diatome) qui sont contrastées par traitement avec des solutions d'acétate d'uranyle et de citrate de plomb avant d'être observées avec un microscope Phillips Tecnai 12. Les expériences ont été réalisées à la plateforme ImagoSeine de l'institut Jacques Monod, où j'ai été formé pour la préparation des échantillons et leur observation. L'analyse des images obtenues permet d'observer la morphologie et la répartition des nanomatériaux au coeur des cellules et d'en mesurer la taille.

8.3.2 Analyse des courbes d'aimantation

L'aimantation d'un matériau superparamagnétique en présence d'un champ magnétique externe H est donnée par une loi de Langevin. Du fait de la polydispersité des nanoparticules, elle doit être pondérée par la distribution en taille des nanoparticules ($P(d)$) car le moment magnétique M^{np} de chaque nanoparticule dépend de sa taille ($M^{np} = M_V^{sat} V^{np}$, $V^{np} = \pi d^3/6$). M_V^{sat} est l'aimantation volumique à saturation de la maghémite ($M_V^{sat} = 2,8 \times 10^5$ A/m). L'aimantation volumique d'un échantillon s'écrit :

$$M_V(H) = \int P(d) M^{np}(d) \mathcal{L}(\xi(d)) dd \quad (8.3.1)$$

avec :

$$\xi(d) = \frac{\mu_0 H M^{np}(d)}{k_B T}$$

où μ_0 est la perméabilité magnétique du vide, k_B la constante de Boltzmann, T la température et $\mathcal{L}(x) = \coth(x) - 1/x$ la fonction de Langevin. De plus la distribution en taille peut être approximée par une loi log-normale de diamètre caractéristique d_0 et d'écart type σ :

$$P(d) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma d} \exp\left(-\frac{(\ln(d/d_0))^2}{2\sigma^2}\right)$$

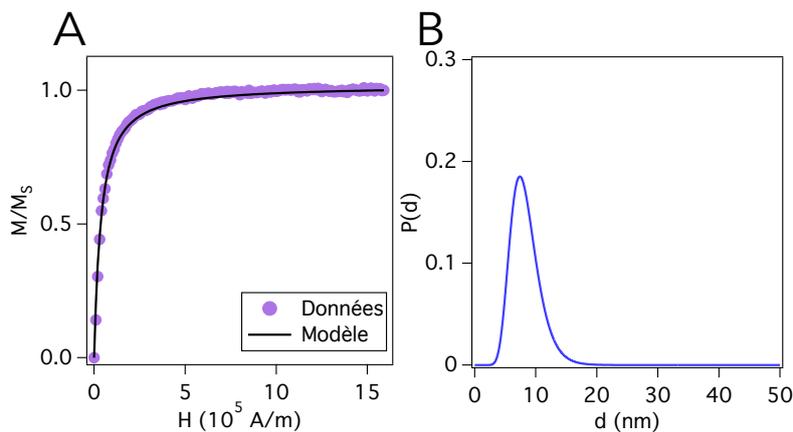


FIGURE II.8.4 – **Courbe d'aimantation de la solution de nanoparticules (A)** Courbe d'aimantation (réalisée par VSM) de la solution de nanoparticules citratées utilisée pour le marquage magnétique (en violet). Le modèle (eq. 8.3.1) ajusté aux données est superposé en noir. L'ajustement donne : $d_0 = 8$ nm, $\sigma = 0,28$. **(B)** Distribution de probabilité $P(d)$ obtenue pour les paramètres d_0 et σ issu de l'ajustement.

L'ajustement des courbes expérimentales par l'expression 8.3.1 permet de déterminer d_0 et σ qui caractérisent l'échantillon. Ce processus est illustré par la Figure II.8.4 avec l'analyse de la courbe d'aimantation de la solution de nanoparticules utilisées (ou ferrofluide dans la partie I).

8.4 Quantification de l'expression génique

L'expression de certains gènes impliqués dans l'homéostat du fer et associés aux protéines de la matrice extracellulaire, a été mesurée par analyse de réaction en chaîne par polymérase quantitative (qPCR). L'ARN des agrégats a été extrait en utilisant le kit NucleoSpin RNA II kit (Machenev-Nagel). La transcription inverse de l'ARN en ADN a été réalisée avec l'enzyme SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen). Enfin la mesure de PCR quantitative a été réalisée avec l'appareil StepOnePlus et le réactif SYBR Green (Applied Biosystem). Les séquences des primers utilisés sont données dans le tableau II.8.1. Dans toutes les expériences de qPCR, RPLP0 est le gène de référence utilisé.

Gène	Sens	Séquence
RPLP0	S	5' TGCATCAGTACCCCATCTATCAT 3'
	AS	5' AAGGTGTAATCCGTCTCCACAGA 3'
FerrL	S	5' CGAATTGGCCGAGGAGAA 3'
	AS	5' GCCACGCTGGTTTTGCAT 3'
FerrH	S	5' TGGCTTGGCGGAATTTCTGT 3'
	AS	5' GCCCGAGGCTTAGCTTTCAT 3'
SLC40A1	S	5' TGGCATGGGTCTTGCTTTC 3'
	AS	5' GCGTACCCTGTGGTGATG 3'
DMT1	S	5' CATCGTGGGAGCTGTCATCA 3'
	AS	5' TTATTGTTCCGGTTTACCTGTCTAGA 3'
Aggrecan	S	5' TCTACCGCTGCGAGGTGA 3'
	AS	3' TGTAATGGAACACGATGCCTTT 3'
Col2A	S	3' ACTGGATTGACCCCAACCAA 5'
	AS	3' TCCATGTTGCAGAAAACCTTCA 5'
Col1	S	3' GCTACCCAACTTGCCTTCATG 5'
	AS	3' TTCTTGCAGTGGTAGGTGATGTTTC 5'

Tableau II.8.1 – Liste des primers utilisés pour la qPCR.

8.5 Modèle endosome

Afin de pouvoir étudier le processus de dégradation plus en détail, notamment le rôle des endosomes, un protocole d'extraction des endosomes magnétiques et de suivi de leur aimantation hors de la cellule a été mis en place.

8.5.1 Extraction des endosomes

Le protocole pour extraire les endosomes de cellules MSC après qu'elles ont été marquées (dans les mêmes conditions que pour la formation d'agrégats) est le suivant :

1. Les cellules sont détachées, centrifugées puis resuspendues dans un tampon au pH ajusté à 4,7 ou 7 (250 mM de sucrose, 3 mM d'imidazole, 1 mM de DTT et un cocktail d'inhibiteurs des protéases (PIC, Sigma, 1/1000)).
2. Les cellules sont à nouveau centrifugées puis une vingtaine de passages du culot dans une aiguille 25G permet de rompre les cellules.
3. La solution est centrifugée (10 minutes à 700g) pour éliminer les cellules intactes et les noyaux.
4. Dans le surnageant on conserve les endosomes magnétiques par tri magnétique grâce à un aimant puissant. Les débris cellulaires non magnétiques sont ainsi élués.
5. Les endosomes magnétiques sont resuspendus dans le tampon.

Ce protocole permet d'obtenir des endosomes intacts [162]. La solution d'endosomes obtenue est placée à l'incubateur (37°C, 5% CO₂). Chaque jour où une mesure de l'aimantation est prévue, le volume nécessaire à la mesure est prélevé.

8.5.2 Mesure de l'aimantation des endosomes

L'aimantation des endosomes est mesurée en utilisant le même principe que pour la magnétophorèse des agrégats. Pour s'adapter à la taille et à l'aimantation de ces objets le gradient de champ magnétique est créé par un cylindre en nickel de 50 μm de diamètre qui est aimanté par un champ magnétique extérieur de 150 mT créé par un aimant permanent. La solution d'endosomes est placée dans une chambre scellée contenant la pointe en nickel. Le dispositif est placé sur un microscope inversé (DMIRB, Leica) et l'on enregistre le mouvement des endosomes attirés par la pointe grâce à un objectif 100x. Dans la fenêtre d'observation le gradient de champ magnétique vaut : gradB=190 mT/m. La mesure de la vitesse limite d'un endosome permet de déterminer son aimantation. Pour le calcul, la taille des endosomes est fixée à un diamètre moyen de 0,6 μm (obtenu par analyse d'images de MET).

Cette méthode a été développée pour mesurer l'aimantation d'objets micrométriques [163], mais nous l'utilisons pour la première fois avec des endosomes magnétiques.

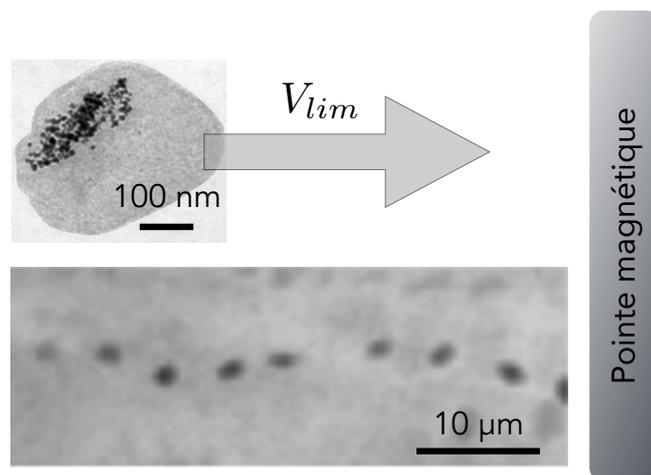


FIGURE II.8.5 – **Magnétophorèse d'endosomes magnétiques** Illustration du principe de l'expérience. Les endosomes chargés magnétiquement (image de MET) sont attirés par le gradient de champ magnétique créé par une pointe de nickel et atteignent la vitesse V_{lim} . Exemple de suivi de la migration d'un endosome avec un objectif 100x (intervalle de temps entre les images superposées : 120 ms) .

8.6 Conclusion

Cet ensemble de méthodes fournit un outil quantitatif unique pour étudier de manière systématique la biotransformation intracellulaire des nanomatériaux magnétiques dans un environnement tissulaire. Il permet un suivi multi-échelle et à long terme du devenir des nanoparticules internalisées dans les cellules d'un tissu à trois dimensions ainsi qu'une évaluation de la réponse cellulaire.

Les chapitres II.9 et II.10 démontrent l'efficacité de l'approche proposée en étudiant la dégradation de différentes nanoparticules. Ces méthodes permettent de quantifier précisément le taux et la vitesse de dégradation en fonction des caractéristiques des nanomatériaux internalisés (taille, enrobage chimique lors de la synthèse, enrobage par des biomolécules, architecture, ...) et donc de comparer l'influence de ces différents paramètres dans le but d'élucider précisément les mécanismes associés à leur biotransformation.

9 | Une dégradation intracellulaire massive et rapide de nanoparticules d'oxyde de fer citratées

Sommaire

9.1	Les sphéroïdes : un modèle de tissu viable à long terme	101
9.2	Quantification multi échelle de la dégradation	106
9.2.1	A l'échelle du tissu	106
9.2.2	A l'échelle nanométrique	107
9.2.3	Une dégradation d'origine endosomale	111
9.2.4	Effet de la dose sur la dégradation	114
9.3	Réponse biologique des cellules	114
9.4	Conclusion	116

Ce chapitre présente l'ensemble des résultats obtenus sur la biodégradation intracellulaire de nanoparticules de maghémite citratées (9 nm de diamètre) au sein d'un tissu modèle : les agrégats multicellulaires. Les méthodes utilisées dans cette étude sont présentées en II.8. Ces résultats ont été publiés dans *ACS Nano* en juillet 2016 [164]. L'article est présenté en Annexe E. On montrera d'abord que les sphéroïdes utilisés constituent un bon modèle de tissus cohésifs et viables sur le long terme. On verra qu'au coeur de ces agrégats les nanoparticules subissent une très forte dégradation en moins d'un mois. Cette dégradation est étudiée quantitativement à l'échelle de l'agrégat, à l'échelle nanométrique et à l'échelle de l'endosome. On caractérisera enfin l'influence de ce processus sur l'homéostat du fer.

9.1 Les sphéroïdes : un modèle de tissu viable à long terme

Les agrégats multicellulaires sont utilisés comme modèles pour l'étude de la dégradation de nanoparticules. Ils reproduisent l'environnement à trois dimensions que les cellules connaissent in vivo. Les sphéroïdes forment un système fermé et contrôlé, idéal pour pouvoir conduire une étude quantitative. Avant toute chose il a d'abord fallu s'assurer que ces agrégats formaient effectivement un bon modèle de tissu.

La viabilité des cellules a été vérifiée en réalisant des coupes d'agrégats à différents temps de maturation et en les marquant avec de l'hématoxyline et de l'éosine. Le cytoplasme des cellules vivantes est alors coloré en rose et leur noyau en violet. Les images de microscopie de ces coupes sont présentées sur la

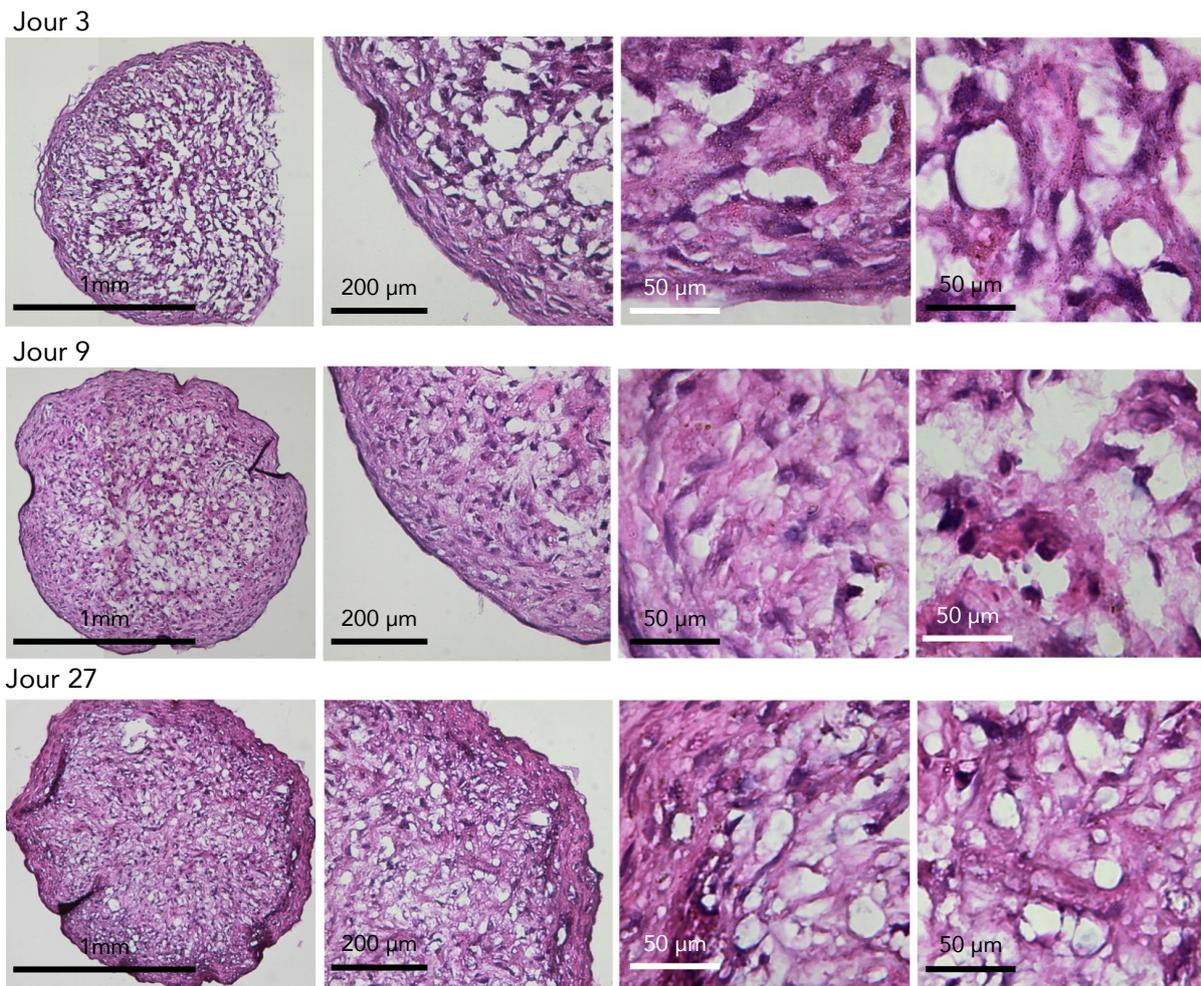


FIGURE II.9.1 – **Viabilité des cellules au coeur de l'agrégat** Coupes d'agrégats à différents jours de maturation (J3, J9, J27) marquées à l'hématoxyline et à l'éosine. Le cytoplasme des cellules vivantes est coloré en rose et les noyaux en violet. Même au coeur de l'agrégat les cellules sont viables après un mois de maturation.

Figure II.9.1. Sur ces clichés on peut voir que même après un mois de maturation les cellules sont vivantes jusqu'au centre des agrégats. On n'observe pas de nécrose centrale malgré la taille de ces agrégats (supérieure à la limite de 300 μm qui est souvent présentée dans la littérature comme la limite au delà de laquelle la diffusion des nutriments n'est pas suffisante pour assurer la survie cellulaire). Ceci peut s'expliquer par le fait que les MSC supportent bien la privation de nutriment [113, 112] et les conditions d'agrégation [36]. Elles ne se divisent plus et entrent dans une phase de différenciation. Des agrégats encore plus gros (jusqu'à 500.000 cellules) sont des conditions classiques dans les expériences de chondrogénèse où aucune nécrose centrale n'est observée [36]. Les clichés d'histologie de la Figure II.9.1 sont à mettre en parallèle avec ceux de la Figure I.4.4, où l'on observe que les cellules MSC des agrégats formés par moulage magnétique sont également viables (en comparaison à des agrégats pour lesquels on a induit la mort cellulaire par chauffage).

Les coupes histologiques de la Figure II.9.1 montrent que la périphérie de l'agrégat est plus dense en cellules et que ces cellules sont alignées parallèlement au bord. On observe également que la cohésion du tissu (densité des cellules sur les coupes) augmente au fur et à mesure de la maturation. Ceci est également visible sur les photos des agrégats lors de leur maturation (Figure II.8.1) où leur volume apparent varie de 0,2 mm^3 à J9 à 0,1 mm^3 à J27.

Pour vérifier la bonne cohésion du tissu, les coupes d'un agrégat après 27 jours de maturation ont été marquées par des techniques d'immunofluorescence (actine, cadhérine et noyaux). La figure II.9.2 présente ces images de microscopie confocale. Les cellules au centre de l'agrégat sont bien cohésives. Là encore, on observe une structuration différente entre l'intérieur de l'agrégat et sa périphérie qui a l'aspect d'une coque.

La microscopie électronique permet d'accéder aux structures fines du tissu. Le cliché de la Figure II.9.3 montre la présence de structures fibreuses identifiées comme de la matrice extracellulaire autour des cellules de l'agrégat (après un mois de maturation). Cette présence de matrice extracellulaire est attendue du fait des conditions de maturation utilisées pour favoriser l'agrégation. La présence du facteur de croissance TGF β 3 dans le milieu de maturation induit une production de matrice extracellulaire. L'augmentation de l'expression des gènes codant pour trois protéines de la matrice extracellulaires (aggrecane, collagène 1 et collagène 2) a été mise en évidence après un mois de maturation. Ces résultats sont présentés sur la Figure II.9.4.

Ce protocole permet donc de produire des agrégats qui sont de bons modèles de tissu cohésif produisant de la matrice extracellulaire. Chaque cellule de ce tissu contient en moyenne 2 pg de fer (méthode de mesure présentée en Annexe A) sous forme de nanoparticules localisées dans ses endosomes. Cette quantité de fer par cellule correspond à l'ordre de grandeur des concentrations utilisées dans diverses applications en médecine régénérative.

Dans la Partie I de cette thèse les masses de fer par cellule utilisées étaient plus importantes afin de permettre l'obtention d'une aimantation volumique et donc une force volumique suffisante pour induire des déformations observables sur les agrégats.

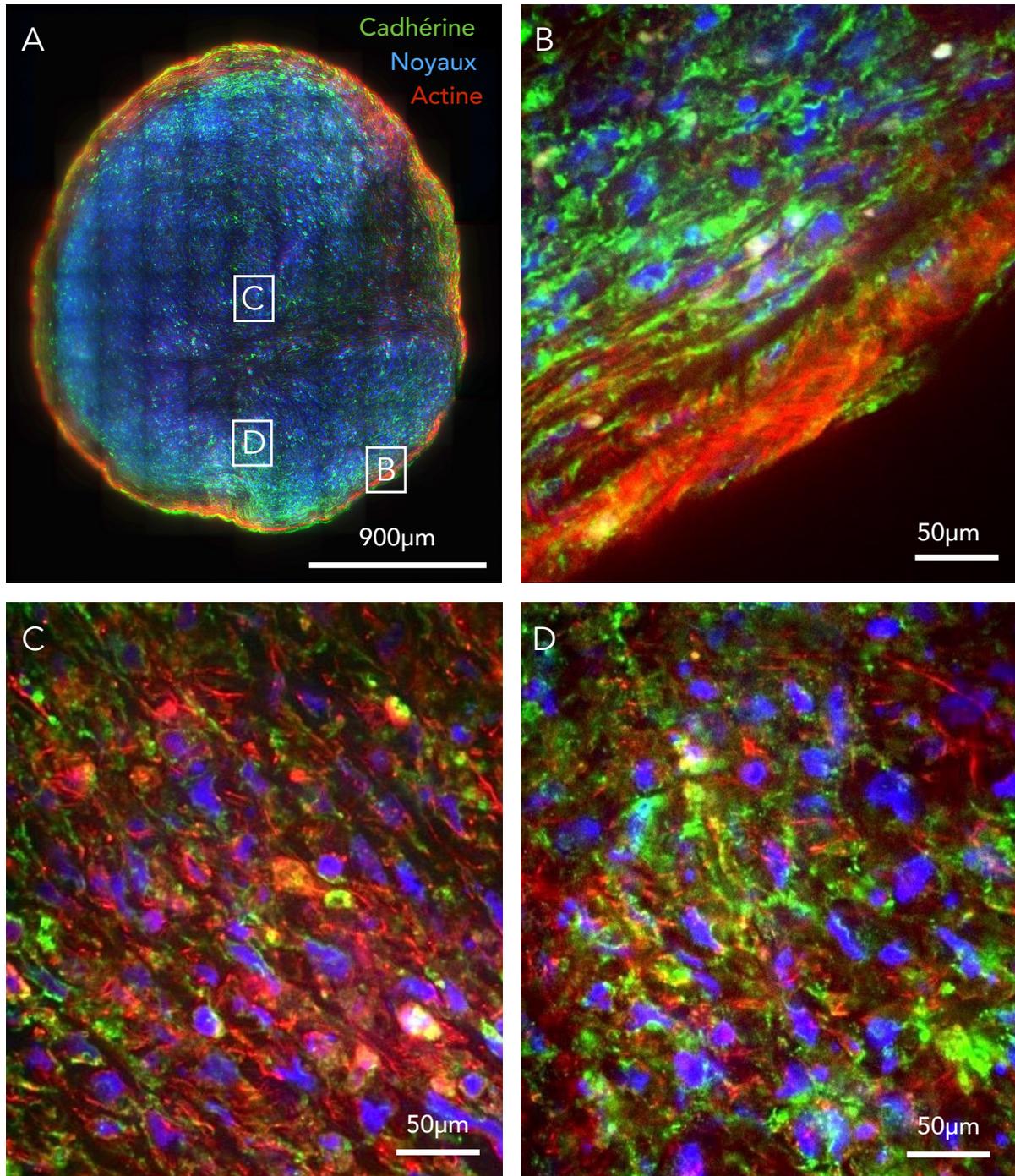


FIGURE II.9.2 – **Structure interne de l'agrégat** Images de microscopie confocale d'une coupe ($30 \mu\text{m}$ d'épaisseur) d'un agrégat après 27 jours de maturation. Les noyaux apparaissent en bleu, l'actine en rouge et les cadhérines en vert. Zooms sur différentes zones de la coupe.

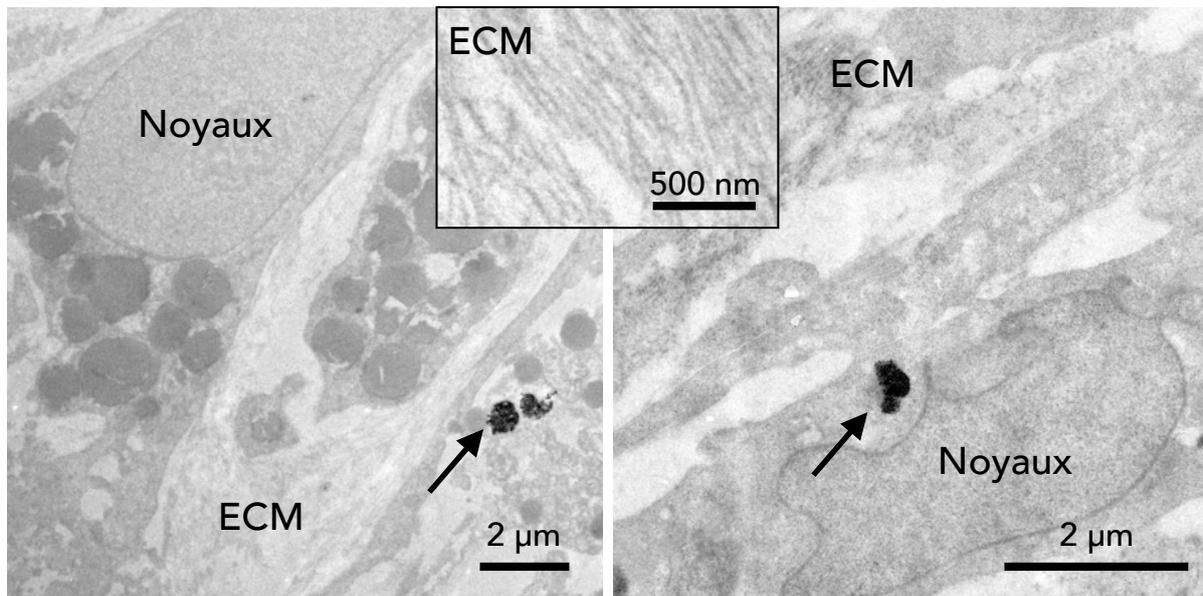


FIGURE II.9.3 – **Structure de l'agrégat à l'échelle cellulaire** Images de microscopie électronique en transmission de la structure interne d'un agrégat après 27 jours de maturation. Des cellules et leurs noyaux sont visibles, elles contiennent des endosomes (indiqués par des flèches) chargés de nanoparticules. Dans l'espace intercellulaire des fibres de matrice extracellulaire (ECM) sont visibles.

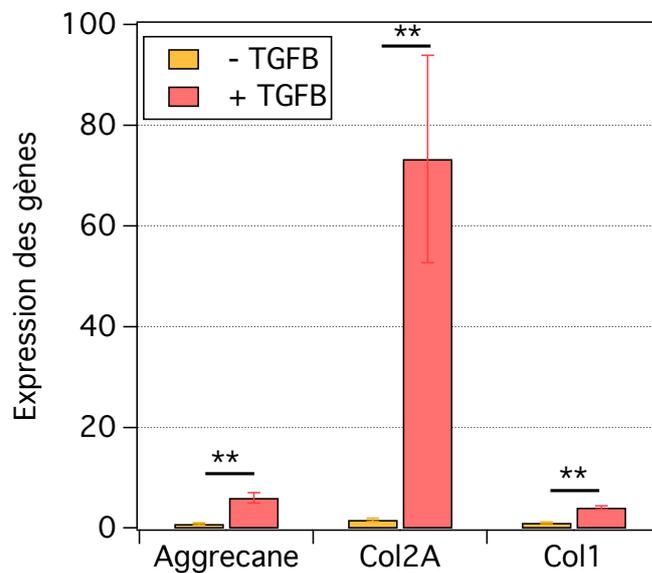


FIGURE II.9.4 – **Expression des gènes codant pour des protéines de la matrice extracellulaire** Influence du facteur de croissance $TGF\beta 3$ sur le niveau d'expression des gènes codant pour trois protéines de la matrice extracellulaire : aggrecane, collagène 2 et collagène 1. Le niveau d'expression a été quantifié par qPCR pour des agrégats marqués magnétiquement ayant maturés 27 jours dans du milieu contenant du $TGF\beta 3$ (+ $TGF\beta$) ou sans $TGF\beta 3$ (- $TGF\beta$). Tous les niveaux d'expression sont comparés à la condition sans marquage magnétique et sans $TGF\beta 3$. $n=3$ par condition.

9.2 Quantification multi échelle de la dégradation

L'ensemble des méthodes développées et rassemblées dans cette étude permet une analyse multi-échelle quantitative et à long terme de la dégradation des nanoparticules dans les tissus.

9.2.1 A l'échelle du tissu

L'évolution de l'aimantation des agrégats au cours du mois de maturation a été mesurée par magnétophorèse et par magnétométrie VSM. Ces deux mesures sont illustrées par la Figure II.9.5. En magnétophorèse, on observe une forte diminution de la vitesse de l'agrégat au cours du temps qui correspond à une diminution de l'aimantation. Cette forte diminution de l'aimantation est également observée sur les courbes d'aimantation réalisées par magnétométrie VSM.

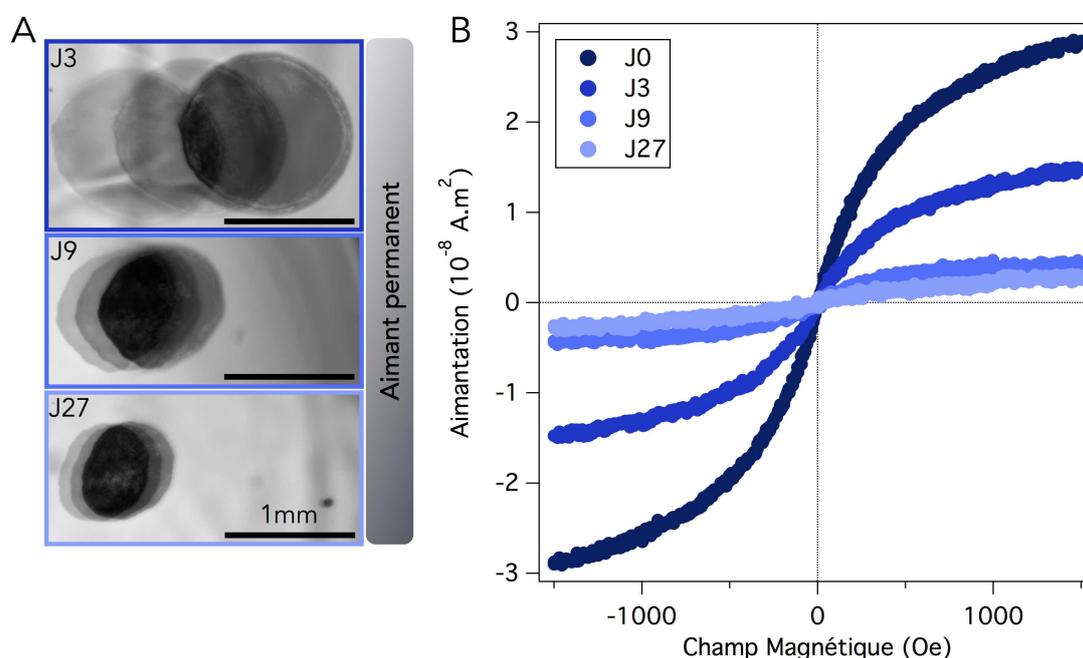


FIGURE II.9.5 – **Mesure de l'aimantation des agrégats au cours du temps** (A) *Expérience de magnétophorèse d'agrégats magnétiques à 3 temps de maturation différents (J3, J9, J27). Trois images successives sont superposées (intervalle de temps : 4,5 secondes).* (B) *Courbes d'aimantation (obtenues par VSM) d'agrégats magnétiques à 4 temps de maturation différents (J0, J3, J9, J27).*

La figure II.9.6 regroupe toutes les mesures de quantification du fer magnétique et total effectuées sur les agrégats durant un mois. Pour chaque point de mesure trois agrégats ont été utilisés.

Sur le plan méthodologique, on peut observer d'une part, que les valeurs des masses de fer magnétique par agrégat obtenues par magnétophorèse et magnétométrie sont en excellent accord, ce qui valide la méthode de magnétophorèse.

D'autre part, la masse de fer totale reste constante au cours du temps, ce qui confirme que les agrégats ne perdent pas de cellules lors de la maturation, ce qui permet de réaliser des mesures quantitatives.

Ces mesures montrent qu'un agrégat perd plus de 90% de son aimantation initiale en un mois et qu'au bout de trois jours il a déjà perdu près de la moitié de son aimantation. Cette diminution de l'aiman-

tation correspond bien à une dégradation des nanoparticules qui perdent leur structure cristalline. En effet comme la masse de fer total reste constante tout le long de l'expérience, ce n'est pas un processus d'expulsion (mécanisme d'exocytose parfois rapporté dans la littérature [165]) des nanomatériaux hors du tissu qui est responsable de cette baisse. Cela signifie également que les atomes de fer libérés par la dégradation des nanoparticules restent dans le tissu et ne sont pas relâchés dans le milieu de culture.

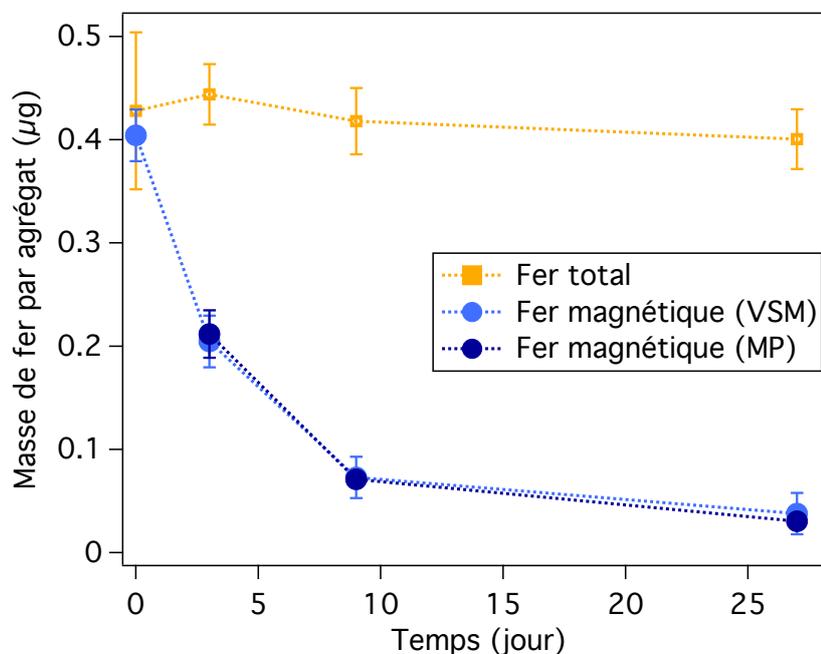


FIGURE II.9.6 – **Diminution de l'aimantation sur un mois** Variation de la masse par agrégat de fer total et de la masse de fer magnétique mesurée par magnétophorèse (MP) et par magnétométrie (VSM) au cours du mois de maturation. $n=3$ par condition.

9.2.2 A l'échelle nanométrique

Pour essayer de mieux comprendre le processus de dégradation, la microscopie électronique en transmission (MET) permet de visualiser la morphologie des nanomatériaux dans leur environnement intracellulaire au cours du temps. La Figure II.9.7 présente différents clichés de MET de coupes d'agrégats fixés à différents temps de maturation. Le jour de la formation (A), on observe que les nanoparticules sont présentes dans les endosomes (A1 et A2). Après trois jours de maturation (B), les nanoparticules sont toujours visibles dans les endosomes (B1 et B2), mais de nouveaux objets (taches plus petites et moins foncées que les nanoparticules) sont présents à la fois dans les endosomes (B2) et dans le cytoplasme (B3). Il faut noter qu'à J0, ces taches sont absentes du cytoplasme (A3). Après un mois (C), la tendance observée à J3 est encore plus marquée, de nombreux endosomes (indiqués par des flèches) contiennent maintenant essentiellement les petites taches (C1, C4 et C5). Elles peuvent aussi coexister avec des nanoparticules au sein de endosomes (C2 et zoom en C3). Ces taches sont également plus nombreuses dans le cytoplasme des cellules (C6).

Ces taches plus petites mais denses aux électrons ont déjà été identifiées comme étant le complexe protéique ferritine assurant le stockage du fer dans les cellules (voir détails en II.7.3). Les expériences de cartographie chimique présentées en II.10.2.2 montrent que ces taches contiennent du fer, ce qui confirme qu'il s'agit bien de ferritines chargées en fer. Il semblerait donc que les nanoparticules se

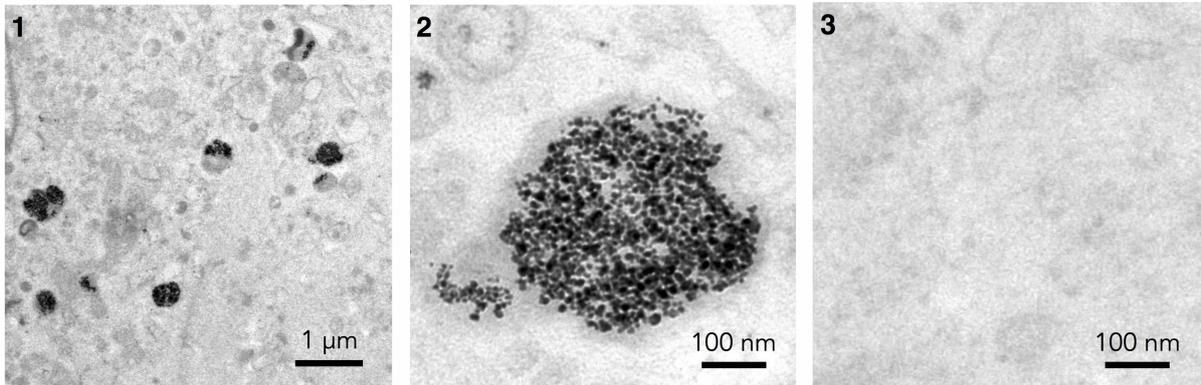
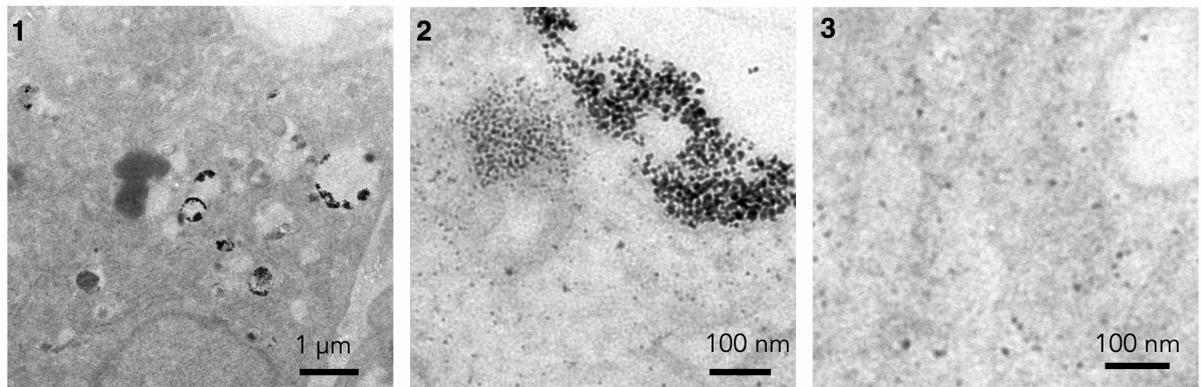
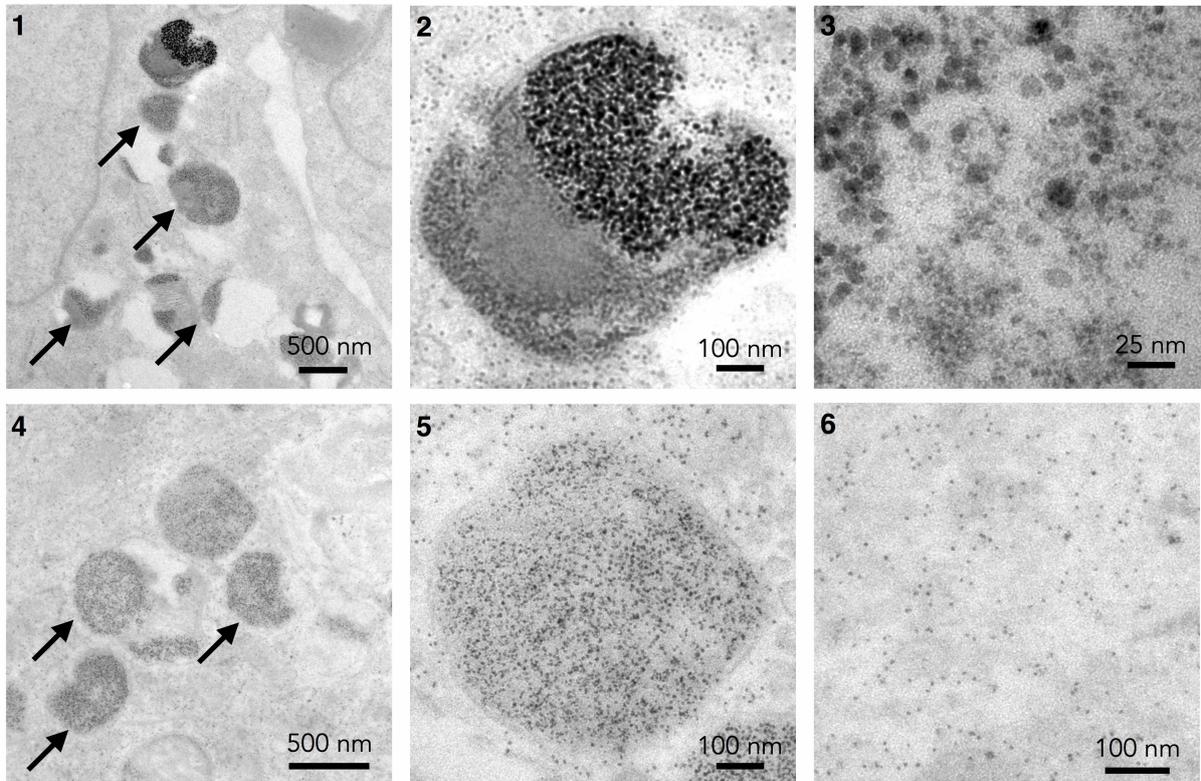
A jour 0**B** jour 3**C** jour 27

FIGURE II.9.7 – **Dégradation à l'échelle nanométrique** Images de microscopie électronique en transmission des agrégats à différents temps de maturation : **(A)** le jour de la formation (*J0*), **(B)** après trois jours (*J3*) et **(C)** au bout d'un mois (*J27*). Les nanoparticules apparaissent en noir sur les clichés car elles sont denses aux électrons.

dégradent au sein des endosomes et que les ions fer libérés soient stockés par les ferritines aussi bien dans les endosomes que dans le cytoplasme.

Il est possible d'analyser les images de MET en détail pour mesurer la taille des différents objets. La Figure II.9.8 présente l'analyse de la taille des nanoparticules. Le diamètre moyen mesuré en solution est de $d = 9,4 \pm 2,5$ nm, de $d = 9,4 \pm 2,6$ nm le jour de formation (J0) et de $d = 9,5 \pm 2,6$ nm après un mois dans les cellules (J27). Les diamètres moyens au cours du temps semblent être identiques. La taille des nanoparticules n'est pas modifiée par l'entrée dans les cellules et celles toujours présentes à J27 ont la taille moyenne.

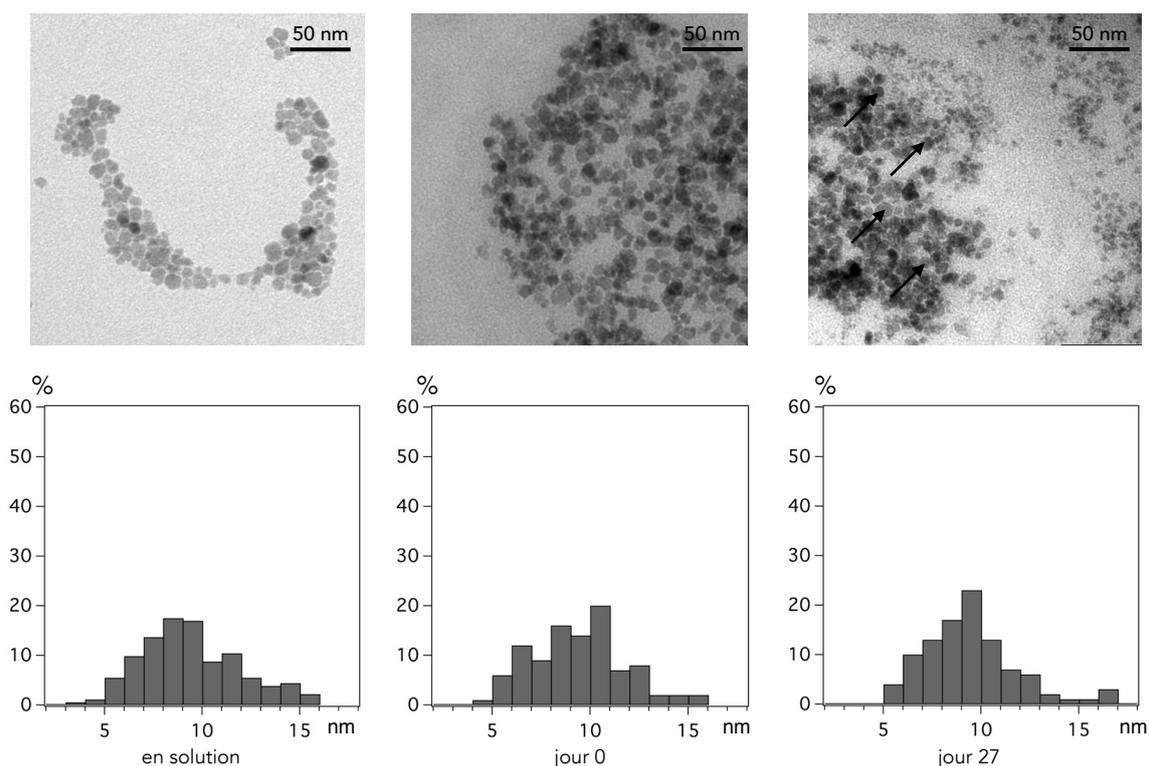


FIGURE II.9.8 – **Taille des nanoparticules au cours du temps** Images de MET à fort grossissement des nanoparticules en solution (avant internalisation), dans les cellules le jour de la formation du tissu (J0), et après un mois de maturation (J27). Pour chaque temps, l'histogramme des diamètres des nanoparticules (déterminés par analyse des images de MET, 100 objets par condition) est présenté. Sur le cliché à J27, les flèches indiquent les nanoparticules, les taches plus petites et plus claires sur la droite de l'image sont identifiées comme étant des ferritines.

On peut également exploiter les courbes d'aimantation obtenues par VSM pour obtenir la distribution en taille des nanoparticules dans l'agrégat (voir détail en II.8.3.2). Cette analyse est présentée sur la Figure II.9.9. Les distributions obtenues à J0 et J27 sont identiques. Elles sont également identiques à la distribution en taille des nanoparticules en solution (présentée sur la Figure II.8.4).

Il est important de remarquer que la taille « physique » mesurée sur les clichés de MET est toujours plus grande que la taille « magnétique » obtenue par ajustement des courbes d'aimantations. Ceci s'explique par le fait que la taille caractéristique d_0 d'une loi log-normal est différente de la taille moyenne $d_{moy} = d_0 e^{\sigma^2/2}$ et/ou qu'une couche extérieure des nanoparticules ne participe pas aux propriétés magnétiques à cause d'effets de bords. Cette observation est également valable avec les nanomatériaux étudiés

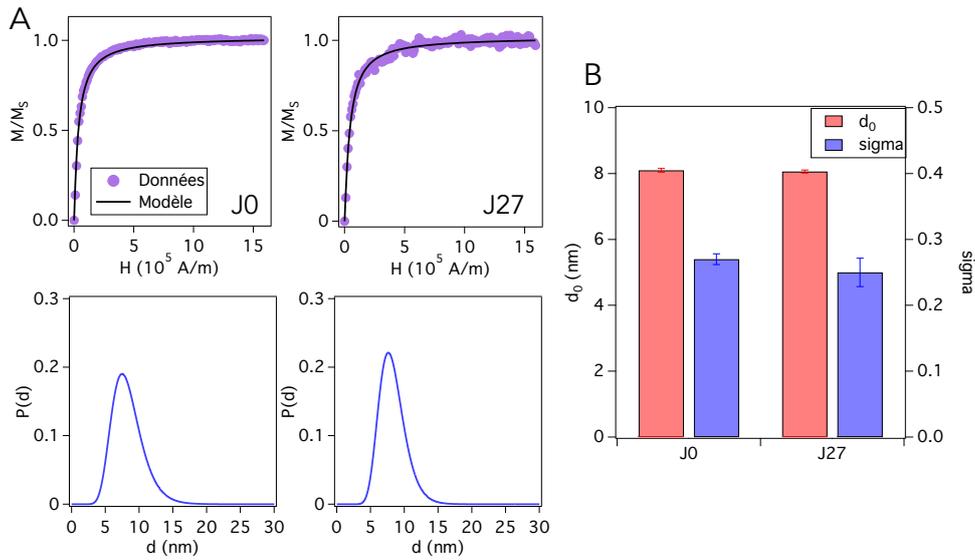


FIGURE II.9.9 – **Taille et polydispersité des nanoparticules au cours de la dégradation (A)** Courbes d'aimantation d'agrégats magnétiques le jour de formation (J0) et après un mois de maturation (J27). Les points expérimentaux sont ajustés par une loi de Langevin pondérée par une distribution log-normale de la taille des nanoparticules (voir II.8.3.2). L'ajustement est superposé en noir. Les lois de distribution $P(d)$ du diamètre issues de l'ajustement sont présentées. **(B)** Récapitulatif du diamètre caractéristique (d_0) et de l'écart type de la distribution (σ) en taille des nanoparticules après un mois de dégradation.

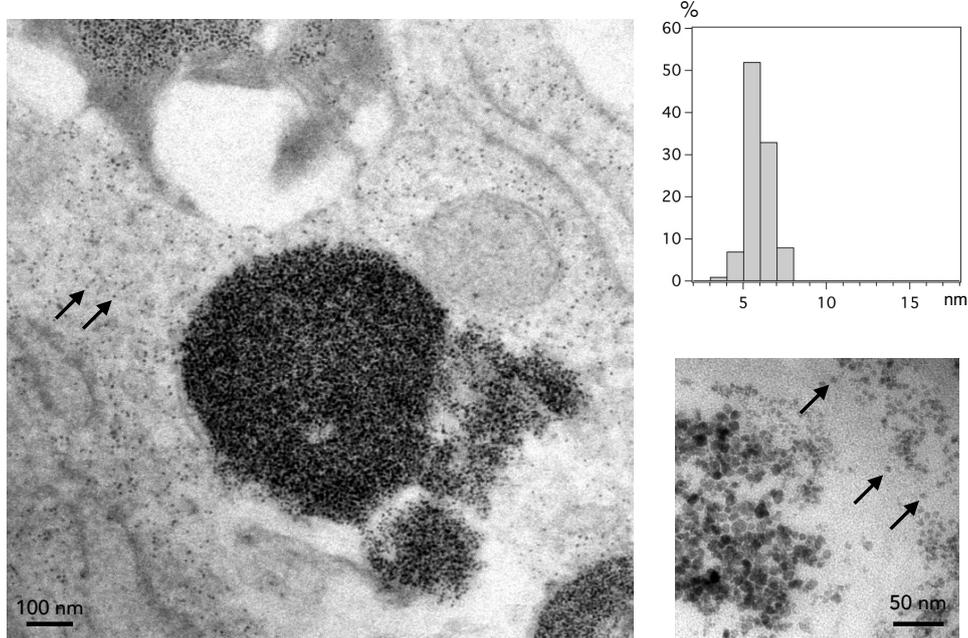


FIGURE II.9.10 – **Taille de la ferritine** Images de MET à fort grossissement de complexes protéiques ferritine chargés en fer (réalisé à J27). L'image de gauche présente un endosome fortement chargé en ferritine, le cytoplasme contient aussi des ferritines (indiquées par des flèches). Ces protéines peuvent coexister avec des nanoparticules (image de gauche). L'histogramme des diamètres de ces complexes est également présenté.

en II.10.1.

Cette invariance de la distribution en taille indique que la dégradation obéit à un mécanisme « tout ou rien », les nanoparticules sont soit intactes soit totalement dégradées et ont disparu. On ne trouve pas de nanoparticules partiellement attaquées qui auraient une taille intermédiaire.

La Figure II.9.10 présente la distribution en taille des ferritines ainsi que des images supplémentaires où l'on peut voir des endosomes très chargés en ferritine. Ces taches ont une taille de $5,8 \pm 0,8$ nm ce qui correspond bien aux dimensions rapportées par la littérature [153].

La dégradation des nanoparticules, et plus particulièrement le transfert du fer des endosomes vers le cytoplasme via le stockage dans la ferritine peuvent être visualisés en réalisant un marquage au bleu de Prusse des coupes des agrégats (voir Figure II.9.11). Ce marquage colore le fer en bleu. Le jour de formation, les points de couleur bleu intense sont bien définis et très localisés, ils correspondent aux nanoparticules présentes dans les endosomes. Au fur et à mesure de la maturation (J3 et J27) les points bleus sont de plus en plus diffus et le cytoplasme se colore en bleu pâle. Ces observations correspondent bien aux clichés de MET.

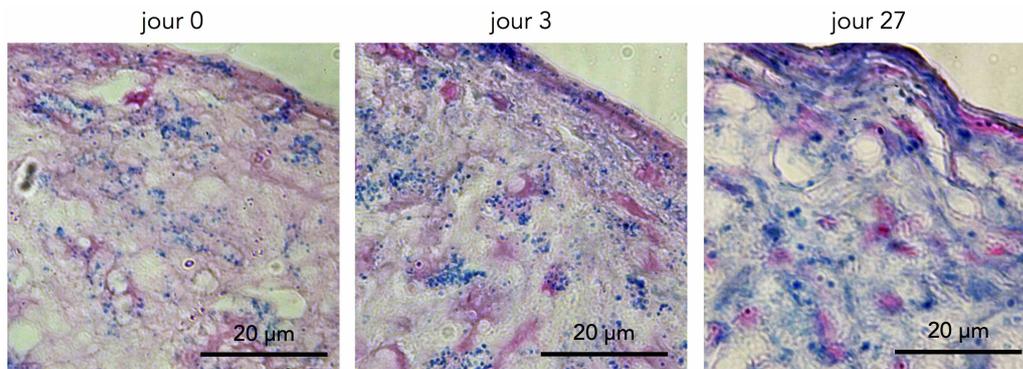


FIGURE II.9.11 – Répartition de la ferritine Coupes d'agrégats à différents temps de maturation (J0, J3, J27) marquées avec du bleu de Prusse qui colore le fer en bleu.

A ce stade, tous les résultats indiquent une forte dégradation des nanoparticules qui intervient relativement rapidement après l'internalisation par un mécanisme « tout ou rien » au sein des endosomes. Les produits de la dégradation sont stockés dans la ferritine à la fois dans les endosomes et le cytoplasme, et ne sortent pas de l'agrégat.

9.2.3 Une dégradation d'origine endosomale

Afin de mieux comprendre le rôle joué par les endosomes, nous avons mis en place un système modèle pour étudier la dégradation. Il est constitué d'endosomes magnétiques extraits des cellules MSC (voir détails en II.8.5). Ces solutions d'endosomes tamponnées à pH 7 et pH 4,7 sont mises à incuber à 37°C. L'aimantation des endosomes est mesurée le jour de l'extraction (J0) puis à J3, J9, J20 et J60. La Figure II.9.12 présente les résultats de ces expériences.

La vitesse limite atteinte par les endosomes lors de leur migration diminue fortement avec le temps de maturation (A), jusqu'à devenir quasi nulle à J60. Pour chaque condition de temps le mouvement d'une centaine d'endosomes est analysé, ce qui permet d'obtenir la masse de fer magnétique moyenne par endosome. La masse de fer magnétique diminue fortement au cours du temps (B). A pH 7, environ la moitié de l'aimantation est perdue entre le dixième et le vingtième jour. A pH 4,7 la dégradation est encore plus

forte et plus rapide, plus de la moitié du fer magnétique a disparu dès le troisième jour.

Ces résultats sont à comparer à l'expérience contrôle où les nanoparticules seules sont dispersées dans le milieu d'extraction tamponné à pH 7 et 4,7 (C). L'aimantation de ces solutions (mesurée par VSM) reste constante après 25 jours d'incubation. Quand les nanoparticules ne sont pas dans les endosomes, elles ne se dégradent pas. On observe une dégradation seulement lorsque l'on ajoute un chélatant du fer dans le milieu (condition pH 4,7 + citrate). Ces résultats semblent indiquer que les chélatants nécessaires à la dégradation des nanoparticules en plus des conditions de pH acide sont présents dans le système d'extrait endosomal.

De manière remarquable le taux et la vitesse de dégradation à pH 4,7 dans le système modèle sont très proches de ce qui est observé pour les agrégats de cellules.

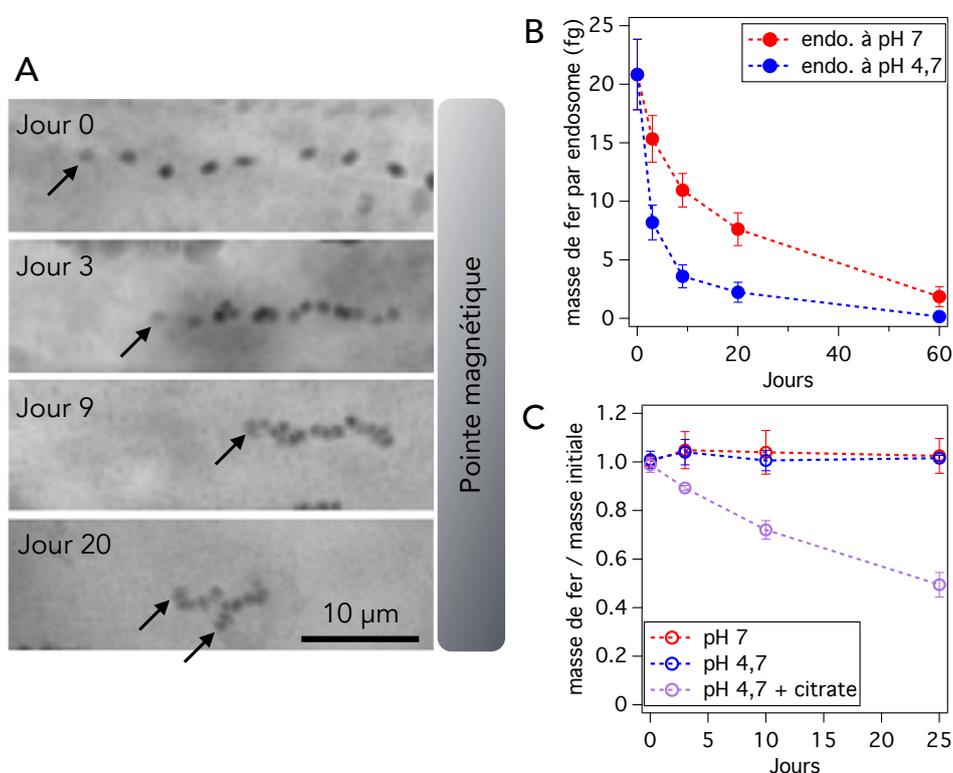


FIGURE II.9.12 – **Dégradation dans les endosomes** (A) Superposition de clichés d'endosomes pendant l'expérience de magnétophorèse à différents temps (intervalle de temps 120 ms, les flèches indiquent la position initiale de chaque endosome). (B) Masse de fer magnétique par endosome en fonction du temps à pH 7 et pH 4,7 (mesurée par magnétophorèse). (C) Masse de fer magnétique en fonction du temps d'une solution de nanoparticules dans le milieu d'extraction à pH 7 et 4,7 et à pH 4,7 avec du citrate à 20 mM (mesurée par VSM). La masse de fer est normalisée par la masse initiale.

Un autre élément défend cette hypothèse de l'origine quasi-exclusivement endosomale de la dégradation. On peut moduler l'activité des cellules constituant l'agrégat par la présence ou non de TGF β 3 dans le milieu de maturation qui contrôle la production de matrice extracellulaire (voir Figure II.9.4). Dans ces deux conditions, on observe le même taux de dégradation au bout de 27 jours (Figure II.9.13), ce qui semble indiquer le peu d'influence qu'a le métabolisme cellulaire sur la dégradation. Le fait que les nanoparticules utilisées se dégradent de manière importante peut masquer la contribution du métabolisme

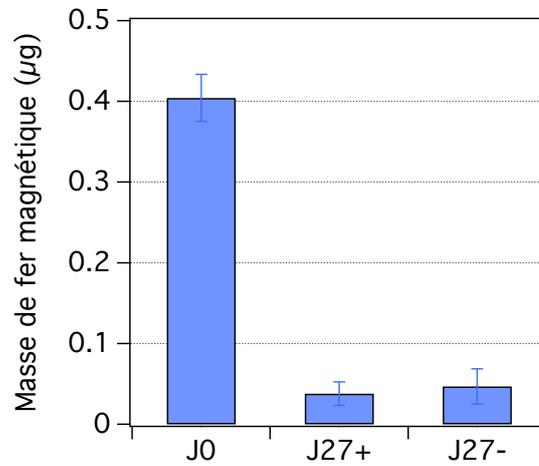


FIGURE II.9.13 – Effet de la production de matrice extracellulaire Comparaison de la dégradation des nanoparticules, entre J0 et J27, en présence (+) ou en absence (-) de $TGF\beta 3$ dans le milieu de maturation. Le $TGF\beta 3$ induit la production de matrice extracellulaire par les cellules de l'agrégat.

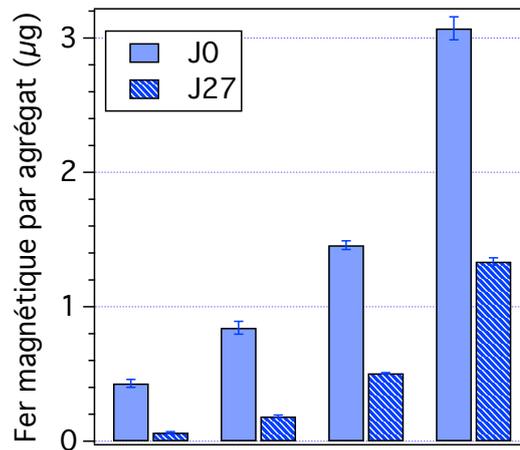


FIGURE II.9.14 – Effet de la dose de nanoparticules Comparaison de l'évolution de la masse de fer magnétique par agrégat entre le jour de formation (J0) et après un mois de maturation (J27) pour quatre conditions de marquage différentes.

cellulaire dans le processus de dégradation. Reproduire cette expérience avec des nanoparticules résistant mieux à la dégradation (voir Chapitre II.10) permettra de mieux caractériser le rôle du métabolisme cellulaire. Des voies alternatives de différenciation (adipogénèse ou ostogénèse) pourraient également être utilisées afin de moduler différemment le métabolisme cellulaire.

9.2.4 Effet de la dose sur la dégradation

Il est possible de contrôler et de faire varier la quantité initiale de nanoparticules dans les agrégats en variant la concentration des solutions qui sont incubées sur les cellules au moment du marquage magnétique. Ceci permet d'étudier l'effet de la dose initiale de nanoparticules sur la dégradation. La figure II.9.14 compare la diminution de la masse de fer magnétique par agrégat en un mois pour 4 conditions de marquage différentes. On constate que plus la dose initiale est forte, plus la masse de fer dégradée est importante, respectivement 0,36 / 0,66 / 0,95 et 1,73 pg, mais que le pourcentage du chargement initial dégradé diminue avec la dose, respectivement 84,9 / 78,6 / 65,1 et 56,3 %. Cela montre que ces cellules possèdent un fort potentiel de dégradation et que dans la gamme de marquage testée, on n'observe pas de saturation de la quantité de fer pouvant être dégradé. Obtenir un marquage magnétique plus important est cependant difficile car la condition de marquage la plus forte est proche de la saturation pour les cellules MSC.

9.3 Réponse biologique des cellules

La dégradation que l'on a mis en évidence et quantifiée précédemment dans ce chapitre entraîne la libération d'une grande quantité de fer dans les cellules, bien supérieure à la dose endogène. Il est donc important d'essayer de comprendre comment les cellules répondent à cet apport interne de fer. Nous avons pour cela étudié l'expression de certains gènes impliqués dans l'homéostasie du fer (pour plus de détails voir II.7.3). Les gènes codant pour quatre protéines ont été considérés :

- la ferritine H, chaîne lourde du complexe ferritine qui possède des propriétés ferroxidases
- la ferritine L, chaîne légère impliquée dans la liaison des Fe (III)
- la ferroportine, une protéine transmembranaire qui permet la sortie du fer du cytoplasme
- la DMT1, un transporteur transmembranaire des métaux divalents.

Dans un complexe ferritine le ratio entre chaîne lourde et chaîne légère est variable. La Figure II.9.15 présente l'évolution de l'expression de ces quatre gènes en fonction du temps (J0, J3, J10 et J27).

On observe une sur expression progressive des gènes codant pour la ferroportine et la ferritine L. Après un mois de maturation les cellules contenant des nanoparticules expriment environ 2,5 fois plus ces deux protéines que les cellules non marquées. Les niveaux d'expression de la ferritine H et du DMT1 ne sont pas impactés par la présence des nanomatériaux. Ces résultats semblent indiquer que le fer continuellement libéré par la dégradation des nanoparticules dans les endosomes est pris en charge au fur et à mesure par la ferritine H, mais que les capacités de stockage dans la ferritine L sont vite dépassées. La production de ferritine L par la cellule est nécessaire pour la rendre capable de stocker cet excès de fer. La cellule cherche également à réduire la quantité de fer intracellulaire en surexprimant la ferroportine afin de le faire sortir du cytoplasme. Ces résultats sont cohérents avec le processus de régulation des protéines impliquée dans l'homéostat du fer par les protéines régulatrices du fer (IRP) (voir détails en II.7.3). Les variations des niveaux d'expression observés sont relativement faibles et surtout progressives. Ceci indique que l'impact de la présence des nanoparticules et de leur dégradation sur les cellules est faible.

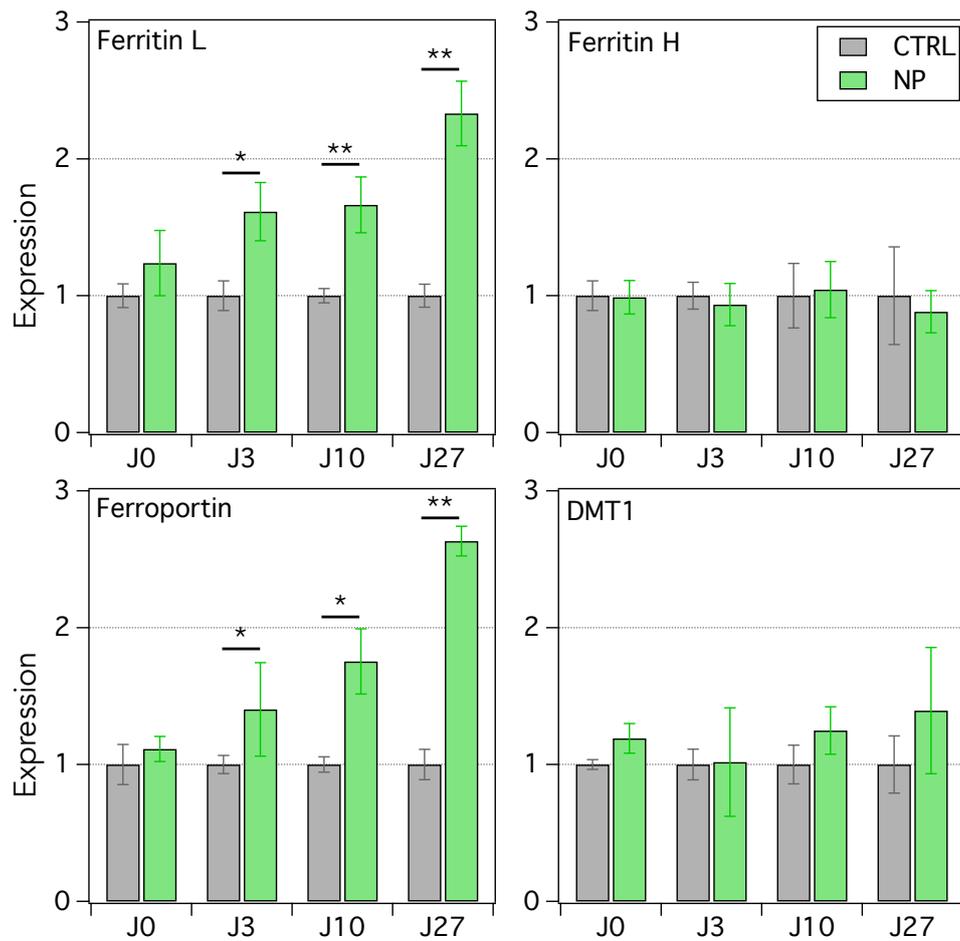


FIGURE II.9.15 – **Impact sur l'homéostat du fer** Niveau d'expression des gènes codant pour la Ferritin L, Ferritin H, Ferroportin et DMT1 mesuré à J0, J3, J10 et J27 pour les sphéroïdes magnétiques (NP, n=6) et les sphéroïdes non marqués (CTRL, n=3). Le niveau d'expression est normalisé par l'expression du contrôle du jour correspondant.

9.4 Conclusion

Cette étude fournit la première quantification précise de la dégradation de nanoparticules d'oxyde de fer dans un tissu biologique modèle. Nous avons mis en évidence une très forte dégradation des nanoparticules internalisées dans les cellules. Cette dégradation se produit dans les endosomes des cellules et le fer libéré est pris en charge par les protéines de stockage ferritines.

Le constat de cette dégradation massive ainsi que l'effet relativement faible sur la réponse des cellules via les modifications associées au métabolisme du fer, sont encourageants pour les applications en médecine régénérative. En effet, il est important que les cellules magnétiques implantées éliminent à terme les nanoparticules qu'elles contenaient avec le minimum d'impact sur leur métabolisme.

Toutefois pour certaines applications comme en ingénierie tissulaire magnétique, où il est important de pouvoir stimuler pendant un certain temps les cellules (mécaniquement via des forces magnétiques pour induire ou favoriser une voie de différenciation par exemple), une dégradation trop rapide peut poser problème si elle intervient alors que la stimulation est toujours nécessaire.

Les méthodes mises en place peuvent être très facilement appliquées et généralisées pour des études plus systématiques des différents paramètres influençant le bio-devenir des nanomatériaux magnétiques après leur internalisation (taille, géométrie, architecture, traitement de surface, biomolécules adsorbées, stimulation ...). Le chapitre II.10 donne un aperçu de la généralité de la méthode développée, en étudiant la dégradation de nanomatériaux avec des géométries plus complexes et en posant la question de la protection des nanomatériaux face à la dégradation afin de pouvoir en contrôler la cinétique.

10 | Application à des nanomatériaux de structure plus complexe.

Sommaire

10.1 Biodégradation de nanocubes et nanodimères Fer-Or magnétiques	117
10.1.1 Architecture et synthèse	117
10.1.2 Suivi de la dégradation des nanocubes et nanodimères	118
10.1.3 Conclusion et perspectives	123
10.2 Protection de nanofleurs d'oxyde de fer par enrobage d'or	125
10.2.1 Stratégie de protection et nanomatériaux utilisés	125
10.2.2 Modulation de la dégradation	127
10.2.3 Conclusion et perspectives	132

Les méthodes développées dans les deux chapitres précédents peuvent être facilement généralisées à l'étude de la biotransformation de n'importe quel nanomatériau magnétique. Ce chapitre démontre ainsi l'universalité de notre approche de nano-biodégradation tissulaire en s'intéressant d'abord à la biodégradation de nanocubes d'oxyde de fer et de nanodimères FeO/Au magnétiques, puis en étudiant l'efficacité d'une stratégie de protection de nanofleurs magnétiques de FeO par enrobage avec une nanocouche d'or. Cette dernière étude est également l'occasion de montrer que de nouvelles méthodes de caractérisation (hyperthermie magnétique et photothermie) peuvent être facilement ajoutées pour mieux caractériser la biotransformation.

10.1 Biodégradation de nanocubes et nanodimères Fer-Or magnétiques

L'architecture des nanomatériaux (taille, enrobage, ...) a une importance capitale sur leur devenir dans l'organisme (voir détails en II.7.1). Les méthodes mises en oeuvre dans cette thèse permettent une quantification précise de la dégradation afin d'effectuer une comparaison systématique de l'influence des différents paramètres sur la dégradation.

10.1.1 Architecture et synthèse

La Figure II.10.1 présente des images de MET des deux solutions de nanomatériaux utilisés. Les nanocubes et nanodimères ont été synthétisés par l'équipe de Teresa Pellegrino à l'Institut Italien des Technologies de Gênes. Ils ont été préparés par décomposition thermique de précurseurs organo-métalliques.

Nanocubes

Les nanocubes (Figure II.10.1.A) sont des particules cubiques formées par chauffage à 200°C d'un mélange de Fer (III) acétylacétone, d'acide décanoïque et de dibenzyle éther [166]. En fin de synthèse les cubes sont rendus solubles dans l'eau par échange des surfactants hydrophobes par du poly-éthylène glycol (PEG) qui est hydrophile. La courbe d'aimantation de la solution est présentée en Figure II.10.7.A. Son aimantation à saturation est de 88.10^{-3} A.m² par gramme de fer. En ajustant la courbe d'aimantation par une loi de Langevin pondérée par la distribution en taille des particules (voir détails en II.8.3.2), on obtient un diamètre caractéristique du volume magnétique des cubes de $d_{mag} = 18,5$ nm (polydispersité de 17%). Sur les images de MET, les cubes ont une arête $d_{MET} = 20,5 \pm 3,2$ nm.

Nanodimères

Les nanodimères (Figure II.10.1.B) sont constitués d'une particule sphérique de maghémite accolée à une particule sphérique d'or. Ils sont obtenus par chauffage à 100°C d'acide oléique, d'oleylamine, de 1,2-hexadecanediol et de 1-octadecene puis par ajout d'un mélange de chlorure d'or (III), d'oleylamine et de 1-octadecene et chauffage à 310°C [167]. En fin de synthèse les particules sont enrobées d'un polymère amphiphile, alkyle polymaléique, pour être solubles dans l'eau [168]. La courbe d'aimantation de la solution est présentée en Figure II.10.7.B. Son aimantation à saturation est de 70 emu par gramme de fer. La taille de la sous unité maghémite obtenue par analyse de la courbe d'aimantation est de $d_{mag} = 10,6$ nm (polydispersité de 20%). Sur les images de MET, la sous unité de maghémite a une taille de $d_{MET} = 10,7 \pm 2,2$ et celle en or de $d_{MET} = 3,5 \pm 0,7$.

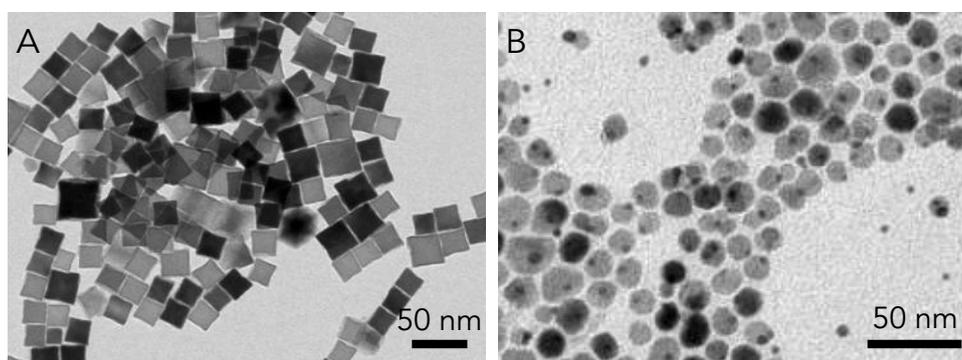


FIGURE II.10.1 – **Nanocubes et nanodimères utilisés** Clichés de microscopie électronique en transmission de (A) la solution de nanocubes et de (B) la solution de nanodimères. Pour les dimères la particule d'or est plus foncée et plus petite que la particule de maghémite.

10.1.2 Suivi de la dégradation des nanocubes et nanodimères

Le protocole du chapitre précédent pour former les agrégats de cellules MSC marquées a été utilisé pour ces deux nanomatériaux. Leurs enrobages étant différents de celui des nanoparticules citratées du chapitre II.8, les conditions du marquage magnétique ont dûes être adaptées pour atteindre une quantité de fer par agrégat similaire. Les nanocubes ont ainsi été incubés pendant 20h avec $[Fe] = 0,025$ mM et les nanodimères pendant 1h avec $[Fe] = 0,1$ mM.

A l'échelle macroscopique

L'évolution de l'aimantation a été suivie par magnétométrie pendant un mois ce qui a permis de mesurer la décroissance de la masse de fer magnétique par agrégat. D'autre part la quantité de fer totale a été mesurée par analyse élémentaire. Ces résultats sont présentés sur la Figure II.10.2.

La masse initiale de fer magnétique par agrégat dans les deux conditions est proche de celle utilisée au chapitre II.9 pour les nanoparticules citratées ($0,4 \mu\text{g}$ par agrégat), on peut donc comparer les taux de dégradation entre ces expériences, en s'affranchissant d'un éventuel effet de la dose. La masse de fer totale reste constante au cours du mois de maturation tandis que la masse de fer magnétique chute de 27% pour les cubes et de 20 % pour les dimères. Ceci montre que ces deux nanomatériaux subissent une dégradation une fois internalisés au coeur des cellules. Cette dégradation est néanmoins plus faible que les 90% observés avec les nanoparticules citratées. Comme pour les nanoparticules citratées, le fer issu de la dégradation reste dans le tissu des agrégats.

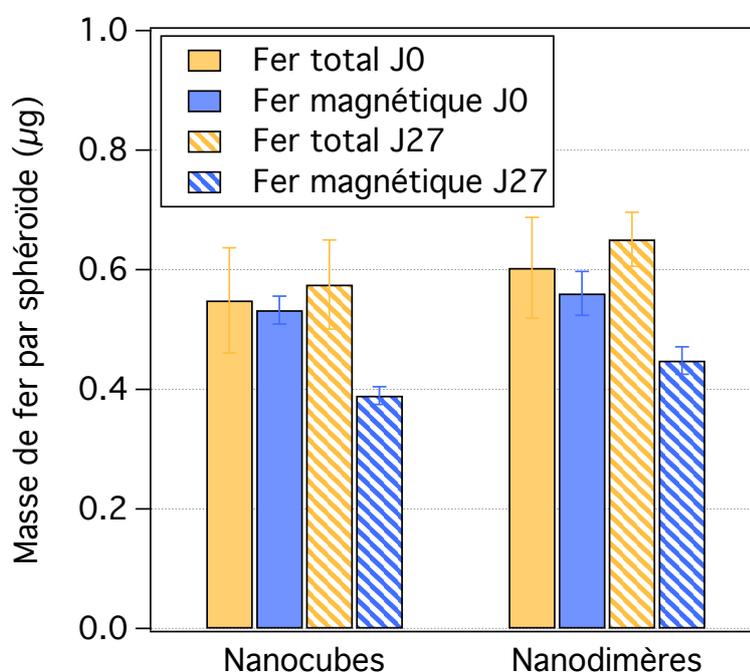


FIGURE II.10.2 – **Dégradation des nanocubes et nanodimères** Variation de la masse de fer total (mesurée par ICP) et de la masse de fer magnétique (mesurée par VSM) entre le jour de formation (J0) et après un mois de maturation (J27) pour les nanocubes et les nanodimères.

A l'échelle nanométrique

La microscopie électronique permet d'observer cette dégradation à l'échelle nanométrique. De plus les deux nanomatériaux utilisés présentent des structures spécifiques qui permettent une étude plus précise des modifications subies à l'échelle nanométrique lors de la dégradation. Les cubes présentent des arêtes très nettes ce qui rend plus facile l'observation de modifications structurales. La partie en or des dimères peut servir de traceur étant donné que l'or ne se dégrade pas (ou beaucoup plus lentement que le fer)

dans les cellules.

La Figure II.10.3 présente des images de MET de coupes fines d'agrégats marqués avec des nanocubes le jour de leur formation et après un mois de maturation. Des images additionnelles sont fournies en Annexe C. On observe que les nanocubes sont présents dans les endosomes des cellules. A J0 les cubes ont des

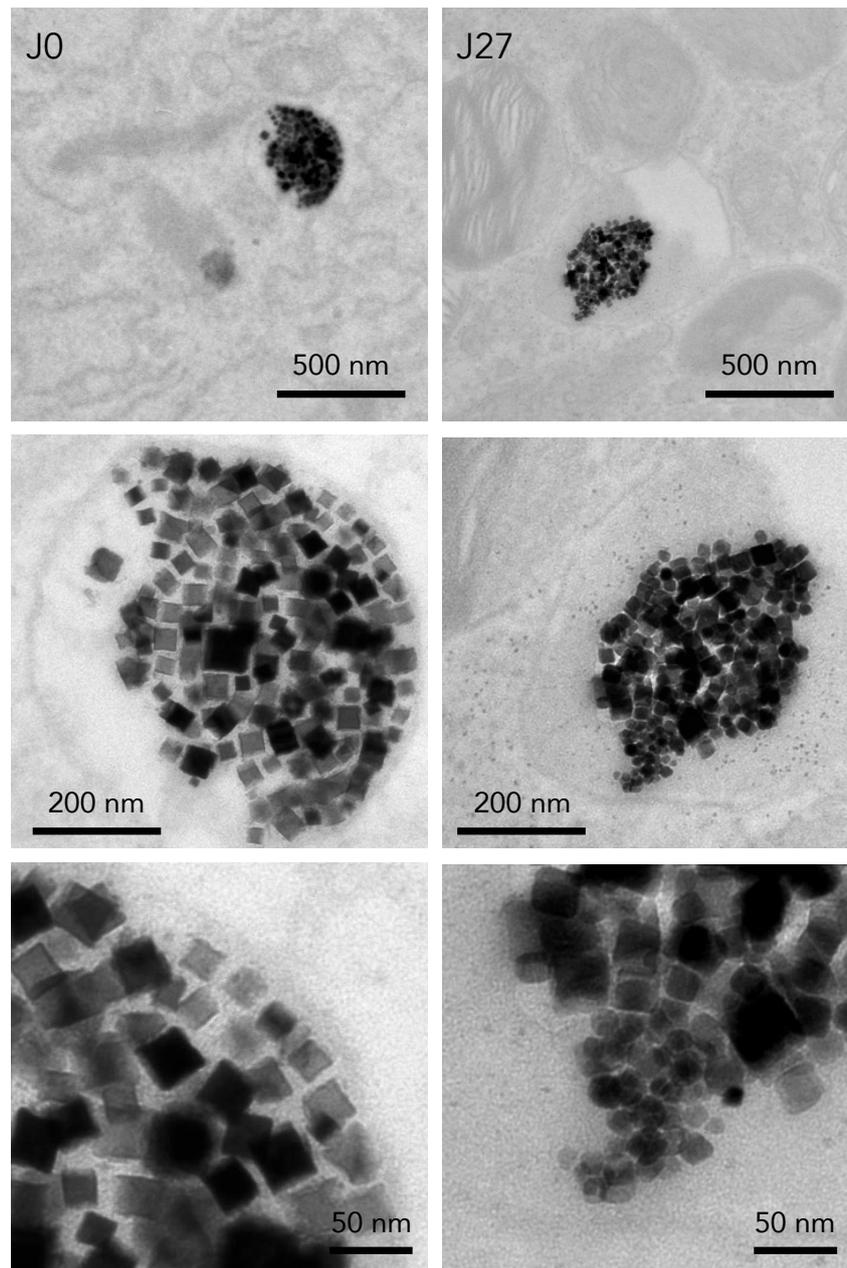


FIGURE II.10.3 – **Dégradation à l'échelle nanométrique des nanocubes** Images de microscopie électronique en transmission avec zooms successifs de coupes fines d'agrégats contenant des nanocubes le jour de formation (J0) et après un mois de maturation (J27). De la ferritine est visible dans l'endosome et le cytoplasme sur la deuxième image à J27.

arêtes bien définies et il n'y a pas de ferritine visible dans les endosomes et le cytoplasme. Après un mois dans les cellules (J27) certains cubes, surtout ceux en périphérie de l'amas présent dans l'endosome, ont des arêtes beaucoup plus arrondies, et sont également plus petits. L'analyse des clichés de MET permet d'identifier les cubes intacts et les cubes attaqués. La Figure II.10.4 illustre sur un fort grossissement l'identification des cubes attaqués. Ainsi à J27 environ 83% des cubes sont intacts (sur 1768 cubes). Ce chiffre ne tient pas compte des cubes totalement dégradés qui ont disparu. Ces observations qualitatives sont de fait en bon accord avec les mesures de perte d'aimantation.

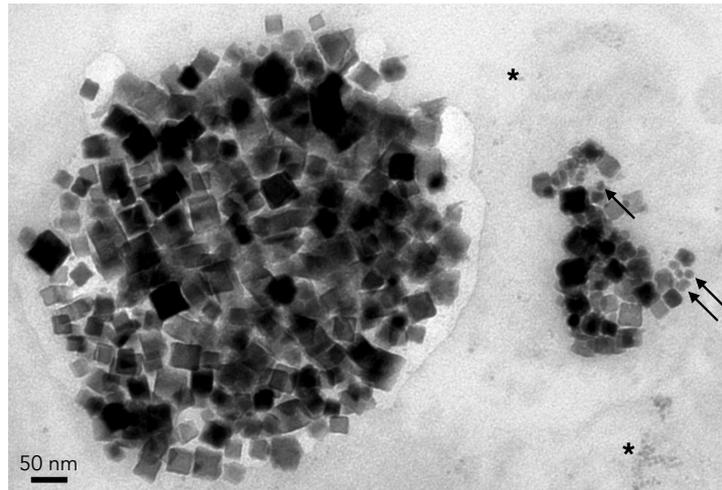


FIGURE II.10.4 – **Attaque des nanocubes** Clichés de microscopie électronique de nanocubes après 27 jours dans un agrégat. Des résidus de cubes de petite taille et aux arêtes attaquées sont visibles et indiqués par des flèches. Des protéines ferritines chargées sont aussi présentes à proximité (indiquées par des étoiles).

Sur la Figure II.10.5, on peut observer l'évolution de la structure des dimères sur un mois. Ils sont à nouveau concentrés dans les endosomes. A J0, les dimères sont intacts et présentent la structure caractéristique d'une particule de maghémite accolée à une particule d'or plus petite. Il n'y a pas de ferritine ni dans les endosomes, ni dans le cytoplasme. A J27, on observe des particules d'or seules, les particules en maghémite auxquelles elles étaient jointes ont été dégradées. De la ferritine est également visible à proximité des zones d'accumulation des particules d'or seules. On peut analyser les clichés de MET en comptant les particules d'or seules. Il faut néanmoins remarquer que des particules d'or seules sont déjà présentes dans la solution avant internalisation (voir la Figure II.10.6 qui illustre le comptage). En solution il y a 7% de particules d'or seules (sur 667 particules considérées), ce ratio est le même à J0. A J27, 24% des objets comptabilisés sont des particules d'or seules (sur 1212 particules). Si l'on soustrait les particules initialement présentes on obtient un ratio de dégradation de 17% qui est en bon accord avec les mesures de diminution de l'aimantation. Les particules d'or servent de traceurs de la localisation des nanoparticules. Leur présence dans les endosomes à J27, même en l'absence de la partie en maghémite, montre bien une fois de plus que la dégradation a lieu dans les endosomes.

A J27 on observe soit des dimères avec des particules de maghémite qui semblent avoir la même taille qu'à J0 ou des dimères dont la particule de maghémite a disparu. Ceci laisse penser comme dans le cas des particules citratées (Chapitre II.9), à un mécanisme tout ou rien de dégradation. L'analyse des courbes d'aimantation présentées sur les Figures II.10.7.C et D permet de confirmer que la distribution de la taille des sous unités en maghémite n'est pas modifiée au cours du temps. Ceci confirme bien ce

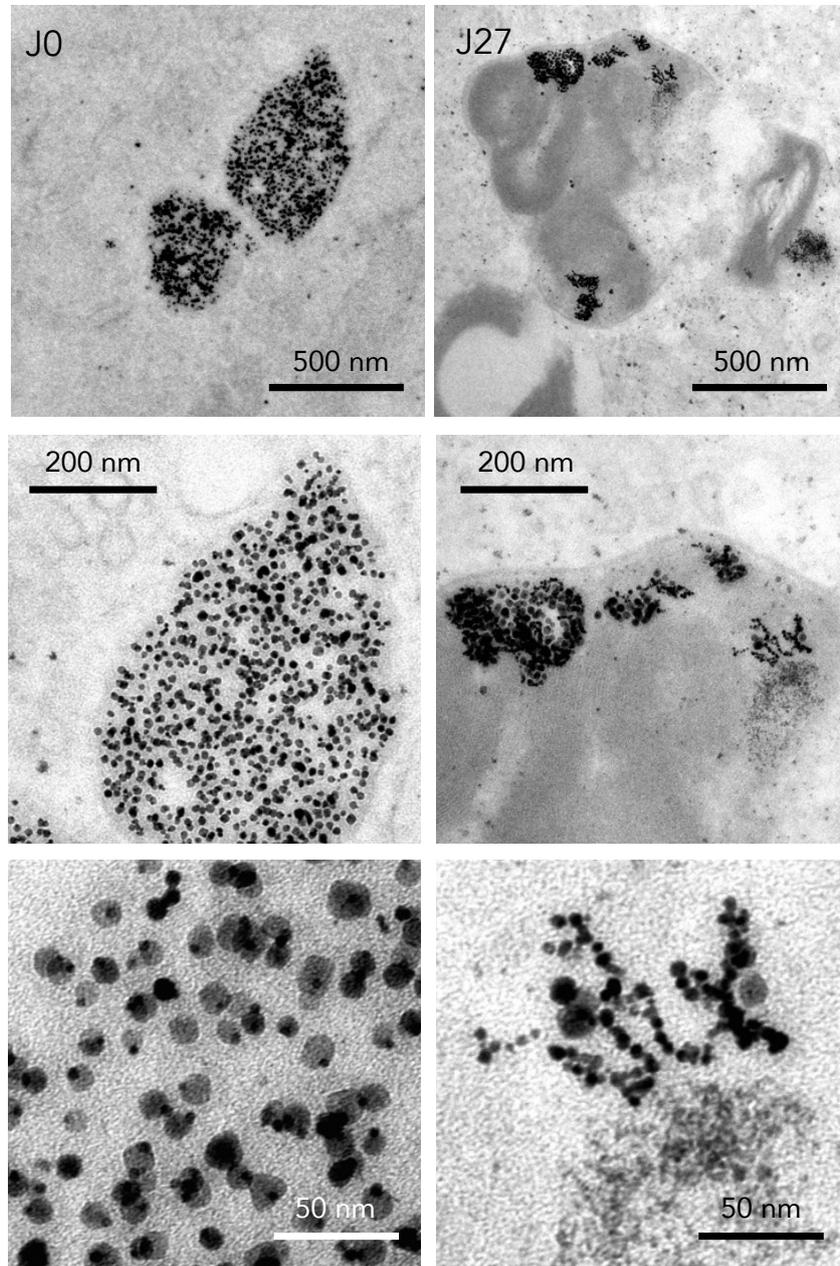


FIGURE II.10.5 – **Dégradation à l'échelle nanométrique des nanodimères** Images de microscopie électronique en transmission avec zooms successifs de coupes fines d'agrégats contenant des nanodimères le jour de formation (J0) et après un mois de maturation (J27). L'or apparaît plus foncé que le fer..

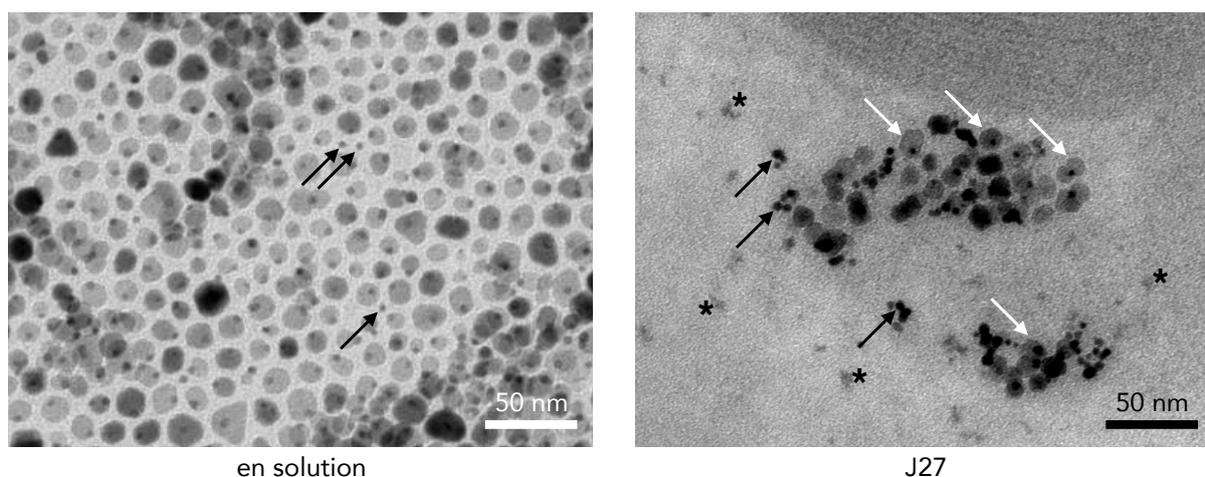


FIGURE II.10.6 – **Attaque de la partie oxyde de fer des dimères** Clichés de microscopie électronique des nanodimères en solution et dans le tissu après 27 jours de maturation. En solution certains grains d'or sont seuls (indiqués par des flèches noires). Après 27 jours certains dimères sont intacts (indiqués par des flèches blanches) et de nombreux grains d'or seuls sont présents (flèches noires). Des ferritines chargées en fer sont également visibles (indiquées par une étoile).

mécanisme qu'il est intéressant de retrouver malgré l'enrobage de surface différent.

Pour les nanocubes la situation est différente, la dégradation est bien plus progressive. Il est en effet possible d'observer des cubes en cours de dégradation sur les clichés de MET. Concernant l'analyse des courbes d'aimantation, on observe un phénomène intéressant sur la Figure II.10.7.A. A J0 et J27, la courbe d'aimantation présente l'ouverture d'un cycle d'hystérésis et la diminution de la susceptibilité magnétique (pente à l'origine). Cette tendance s'accroît légèrement entre J0 et J27. Ceci est dû aux interactions magnétiques entre nanocubes provoquées par leur fort confinement au sein des endosomes. Rien de tel n'est visible en solution où la rotation des cubes est possible. Ces interactions après internalisation dans les tissus empêchent d'analyser les courbes d'aimantation avec le formalisme de Langevin. Ceci illustre néanmoins comment l'internalisation et le confinement dans les endosomes peuvent modifier les propriétés magnétiques macroscopiques d'un nanomatériau.

10.1.3 Conclusion et perspectives

Cette étude nous montre que l'on dispose d'un outil général pour étudier les paramètres influençant la biodégradation de nanomatériaux magnétiques dans les tissus biologiques. Les nanocubes et nanodimères considérés se dégradent beaucoup moins que les nanoparticules citratées. Ceci met en évidence l'importance de l'enrobage des nanomatériaux sur leur devenir au cœur des cellules. La comparaison si l'on fait abstraction de la présence de la particule d'or, entre dimères et nanoparticules citratées qui ont une taille très proche, montre que la couche de polymère protège mieux les nanomatériaux que les molécules de citrate. Ces résultats laissent aussi apparaître une importance du ratio de la surface sur le volume. Concernant le mécanisme de la dégradation, l'attaque progressive des cubes avait déjà été mise en évidence en solution [128]. Il apparaissait que les cubes sont attaqués préférentiellement là où la couche de polymères PEG présente des défauts et permet l'accès des chélateurs du fer à la surface de la particule.

Les perspectives sont nombreuses. Pour mieux comprendre l'influence de chacun des paramètres il faut

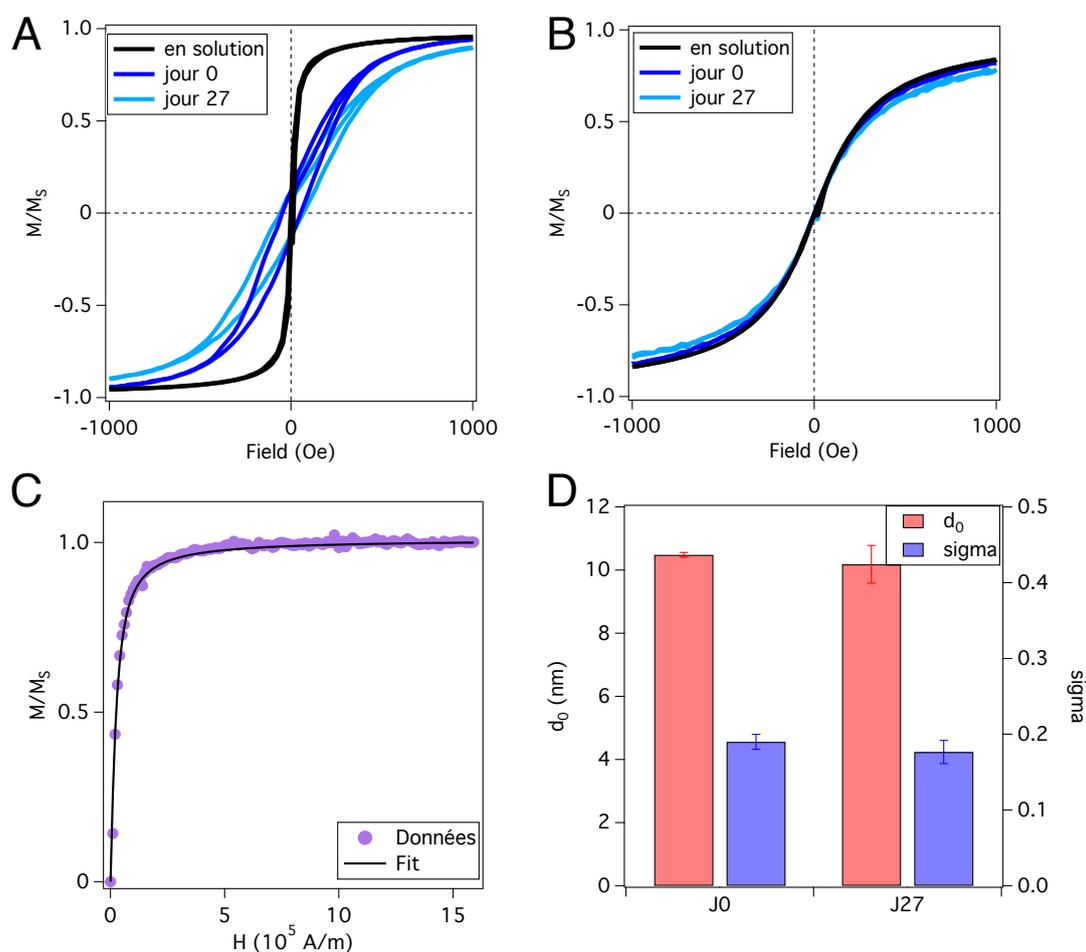


FIGURE II.10.7 – **Analyse des courbes d’aimantation** Courbes d’aimantation normalisées par l’aimantation à saturation (M_S) en solution, à J0 et à J27 pour (A) les nanocubes et (B) les nanodimères. Pour les nanocubes, on observe à J0 et J27 l’ouverture d’un cycle d’hystéresis et une diminution de la susceptibilité magnétique (pente à l’origine de la courbe d’aimantation). (C) Courbe d’aimantation d’un agrégat marqué avec les nanodimères à J27 ajusté par une loi de Langevin pondérée par la distribution log-normal de la taille des sous unités maghémite. (D) Evolution des paramètres (taille caractéristique d_0 et polydispersité σ) de la distribution log-normal de la taille des particules en maghémite des dimères en fonction du temps.

dra utiliser des particules où un seul paramètre structural change et comparer les taux et mécanismes de dégradation.

10.2 Protection de nanofleurs d'oxyde de fer par enrobage d'or

Nous avons finalement voulu tirer profit des méthodes développées pour traiter un cas pratique : comment protéger les nanoparticules de la biodégradation ? Cette étude de la protection de nanoparticules d'oxyde de fer par une couche d'or est également l'occasion de démontrer qu'il est facile d'ajouter d'autres méthodes de caractérisation en fonction des propriétés des nanomatériaux utilisés pour enrichir la compréhension des mécanismes en jeux. Les nanofleurs d'oxyde de fer que l'on cherche à protéger, possèdent une très bonne capacité de chauffage en hyperthermie magnétique. Ralentir ou empêcher leur biodégradation permettrait de rallonger leur activité thérapeutique in-situ.

10.2.1 Stratégie de protection et nanomatériaux utilisés

La stratégie de protection que nous souhaitons mettre en place repose sur la meilleure résistance à la biodégradation de l'or par rapport aux oxydes de fer. Nous l'avons vu en II.10.1 avec la partie en or des dimères qui restait intacte après un mois de maturation alors que la partie en oxyde de fer avait complètement disparue. Recouvrir les nanoparticules d'oxyde de fer avec une couche d'or devrait donc pouvoir limiter la dégradation.

Une stratégie similaire de protection a déjà été testée par Javed et al. en déposant sur des particules d'oxyde de fer une fine couche d'or de quelques nanomètres par déposition pulsée au laser sous vide [129]. Il s'agissait d'une expérience in-situ sans synthèse de particules à proprement parler. Cependant la présence de cette couche d'or ralentissait la cinétique de dégradation dans une solution reproduisant la composition du milieu lysosomal. Ces résultats sont encourageants et montrent la nécessité d'étudier la biotransformation de telles structures dans l'environnement intracellulaire et de quantifier les effets de la protection avec des nanoparticules.

Les particules utilisées dans cette étude présentent l'avantage d'être formées directement avec la couche d'or lors de la synthèse. Les caractéristiques de la couche d'or (épaisseur et pourcentage de recouvrement) peuvent également être modifiées afin de mieux comprendre le mécanisme de protection et de pouvoir moduler la dégradation en limitant l'accès de chélateurs à la surface de la particule.

Synthèse

Les nanoparticules utilisées ont été produites par l'équipe d'Ali Abou-Hassan du laboratoire PHENIX (UMR 8234). La synthèse repose sur la génération de précurseurs d'or à la surface de particules multi-coeurs de maghémite (MagNP) suivi d'une croissance de l'or à la surface [169, 170]. Le contrôle de la phase de croissance permet d'adapter à souhait l'épaisseur de la couche d'or externe. Le principe de cette synthèse est illustré par la Figure II.10.8.A. Les MagNPs ont été synthétisées selon un processus polyol détaillé dans [171]. Leur structure multi-coeurs leur confère de très bonnes propriétés de chauffage en hyperthermie magnétique, meilleures que celles des nanoparticules mono-domaine utilisées au Chapitre II.9 [171].

Architecture

Nous avons utilisé quatre types de nanoparticules différentes qui sont des variations de la même architecture. Les clichés de MET de la Figure II.10.8.B présentent ces différentes nanoparticules.

- Les nanoparticules magnétiques (MagNP) sont constituées uniquement de la partie centrale multi-cœurs en oxyde de fer, aussi appelée nanofleur. Elles ont un diamètre moyen de 30 ± 4 nm (mesuré sur les images de MET). Les MagNP ont un enrobage citrate
- Le premier type de particules magnéto-plasmoniques (MagPlasNP1) est constitué de la nanofleur centrale en oxyde de fer sur laquelle des particules d'or ont nucléé. Le ratio de la quantité d'or sur la quantité de fer vaut $1,13 \pm 0,04$ et leur diamètre moyen $d = 47 \pm 6$ nm.
- Le deuxième type de particules magnéto-plasmoniques (MagPlasNP2) est identique au MagPlasNP1, seule la couverture avec les particules d'or est plus importante (Or/Fer = $3,1 \pm 0,7$ et $d = 53 \pm 7$ nm).
- Le dernier type (MagPlasNP3) correspond à une couverture encore plus importante par l'or des nanofleurs centrales (Or/Fer = $4,7 \pm 0,9$ et $d = 63 \pm 9$ nm).

Toutes les particules magnéto-plasmoniques (MagPlasNP) ont un enrobage en polyvinylpyrrolidone (PVP).

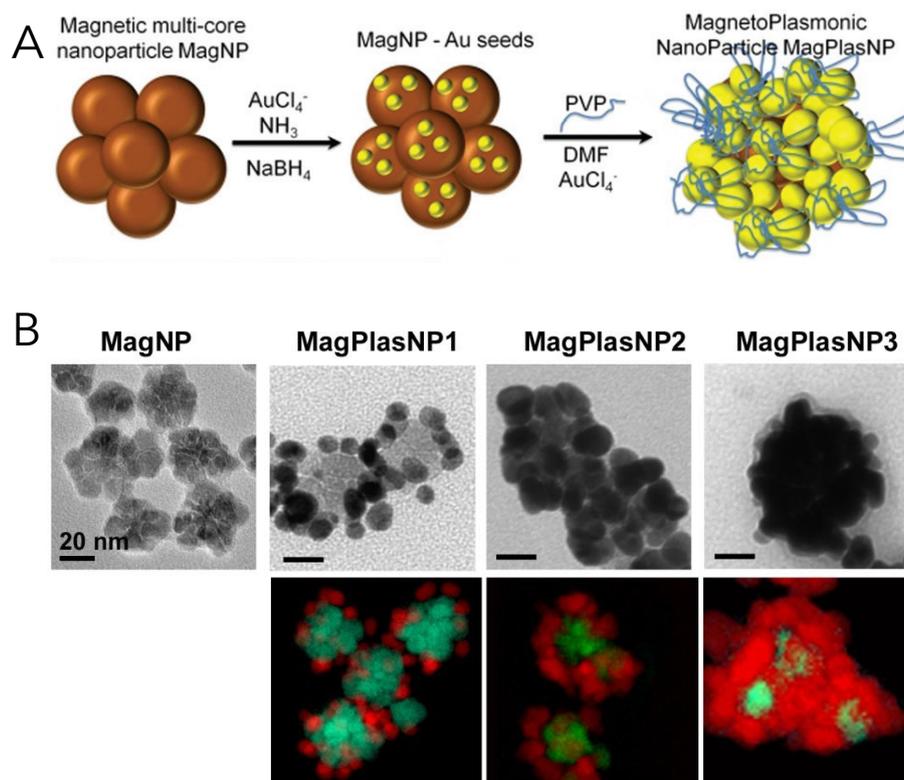


FIGURE II.10.8 – **Structure des nanofleurs** (A) Principe de la synthèse des nanoparticules magnéto-plasmoniques. PVP : polyvinylpyrrolidone, DMF : dymethylformamide. Extrait de [169]. (B) Clichés de microscopie électronique en transmission (MET) des solutions des différents nanomatériaux utilisés. Des clichés de microscopie électronique à balayage par transmission (MEBT) permettent la cartographie chimiques des nanomatériaux. Le fer apparaît en vert et l'or en rouge.

Propriétés magnéto-plasmoniques

Du fait de leur structure constituée d'un multi-coeur de maghémite entouré d'or, ces particules ont des propriétés magnéto-plasmoniques. Le coeur en maghémite fournit les propriétés magnétiques (présentées en détail en 2.2.2) avec notamment une capacité de chauffage par conversion de l'énergie magnétique en énergie thermique en présence d'un champ magnétique oscillant. La couche d'or génère un plasmon à la surface des particules, ceci se traduit par l'apparition d'une bande d'absorption dans le proche infra rouge. La Figure II.10.9 présente les spectres d'absorption des nanomatériaux utilisés. En éclairant les nanoparticules avec un laser de longueur d'onde correspondant au pic d'absorption, on peut générer une augmentation de la température du milieu.

Ces particules permettent ainsi de combiner les chauffages par hyperthermie magnétique et photothermie lorsqu'elles sont placées dans un champ magnétique oscillant ou illuminées dans le proche infra rouge [169]. Elles constituent ainsi une piste thérapeutique très intéressante dans la mesure où la double stimulation permet d'augmenter significativement la chaleur générée.

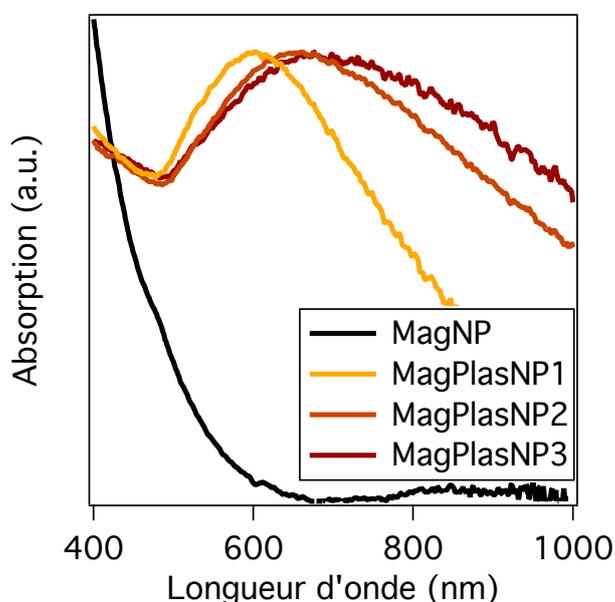


FIGURE II.10.9 – **Spectre d'absorptions des nanoparticules** Spectre visible proche infrarouge des différentes nanoparticules. Les MagNPs n'ont pas de pic d'absorption. Les MagPlasNPs ont un pic d'absorption du fait du plasmon de surface généré par la couche d'or. Les caractéristiques de la couche d'or modifient légèrement l'absorption.

10.2.2 Modulation de la dégradation

Les cellules MSCs ont été marquées magnétiquement avec les différentes nanoparticules en ajustant les conditions pour que les cellules contiennent en moyenne la même quantité de fer. Les agrégats ont ensuite été formés avec ces cellules selon le protocole habituel (voir II.8.1). La masse initiale de fer magnétique par agrégat est d'environ $0,7 \mu\text{g}$. La Figure II.10.10 illustre l'allure des agrégats formés. On observe que la présence de nanoparticules d'or dans le tissu donne une couleur très foncée aux agrégats.

Nous avons ensuite mesuré l'évolution de l'aimantation et des capacités de chauffage par hyperthermie magnétique et photothermie des différents agrégats au cours de leur maturation. Finalement, en plus de la caractérisation classique par MET, nous avons également pu réaliser une cartographie des éléments chimiques par microscopie électronique à balayage par transmission (MEBT) pour suivre le devenir des deux éléments or et fer, dans le cadre d'une collaboration avec Guillaume Radtke de l'IMPMC à l'UPMC (en utilisant le microscope de l'université McMaster au Canada).

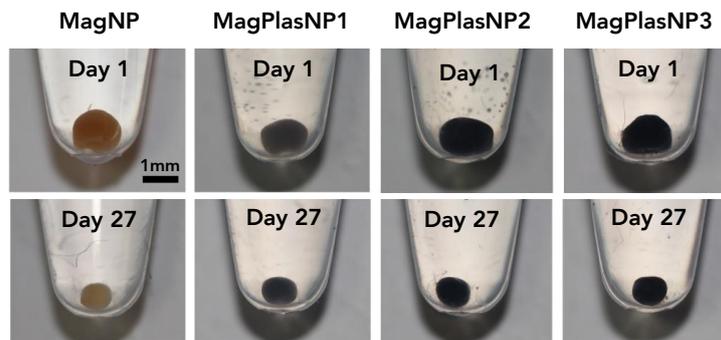


FIGURE II.10.10 – Agrégats multicellulaires marqués avec les nanoparticules magnéto-plasmoniques. Allure des agrégats de cellules MSC marquées avec les différentes nanoparticules utilisées.

Echelle macroscopique

Mesures magnétiques L'aimantation des agrégats a été mesurée par VSM le jour de formation des agrégats et après un mois de maturation. La Figure II.10.11.A présente les courbes d'aimantation obtenues pour les quatre nanomatériaux et la Figure II.10.11.B donne après un mois de maturation, le pourcentage restant de l'aimantation à saturation initiale par agrégat. Cette quantité est proportionnelle au pourcentage de coeurs de maghémite non dégradés.

L'efficacité de la protection apparaît clairement. Alors qu'il ne reste que 30% des MagNPs au bout d'un mois, en présence de la couche d'or, il reste 50% de l'oxyde de fer des MagPlasNP2s et ce chiffre passe à 70% pour les MagPlasNP3s qui ont la couche d'or la plus épaisse. La dégradation du coeur d'oxyde de fer a été diminuée de moitié par la présence de la couche protectrice en or pour les MagPlasNP3s.

Pour les MagPlasNP1s, bien que la dégradation soit légèrement moins importante que pour les MagNPs la différence n'est pas significative. La présence de simples germes d'or isolés sur la surface du multi-coeur de maghémite n'est pas suffisante pour avoir une action protectrice (ceci s'apparente à la dégradation des dimères). Les chélateurs du fer ont toujours accès à la surface de l'oxyde de fer. Il faut que la couche d'or soit la plus continue possible pour assurer une protection.

Les MagNPs et les trois MagPlasNPs n'ont pas le même enrobage. Cette différence peut contribuer en partie aux niveaux de dégradation observés. Cependant la corrélation de la meilleure protection avec le taux de recouvrement en or montre clairement que l'effet principal provient de la présence de l'or à la surface des nanofleurs de maghémite.

Dans la suite, les mesures de chauffage n'ont pas été réalisées pour les agrégats marqués avec les MagPlasNP2s, pour se concentrer sur les nano-architectures extrêmes : multi-coeurs nus, multi-coeurs avec germes d'or et multi-coeurs avec couche d'or quasi-continue.

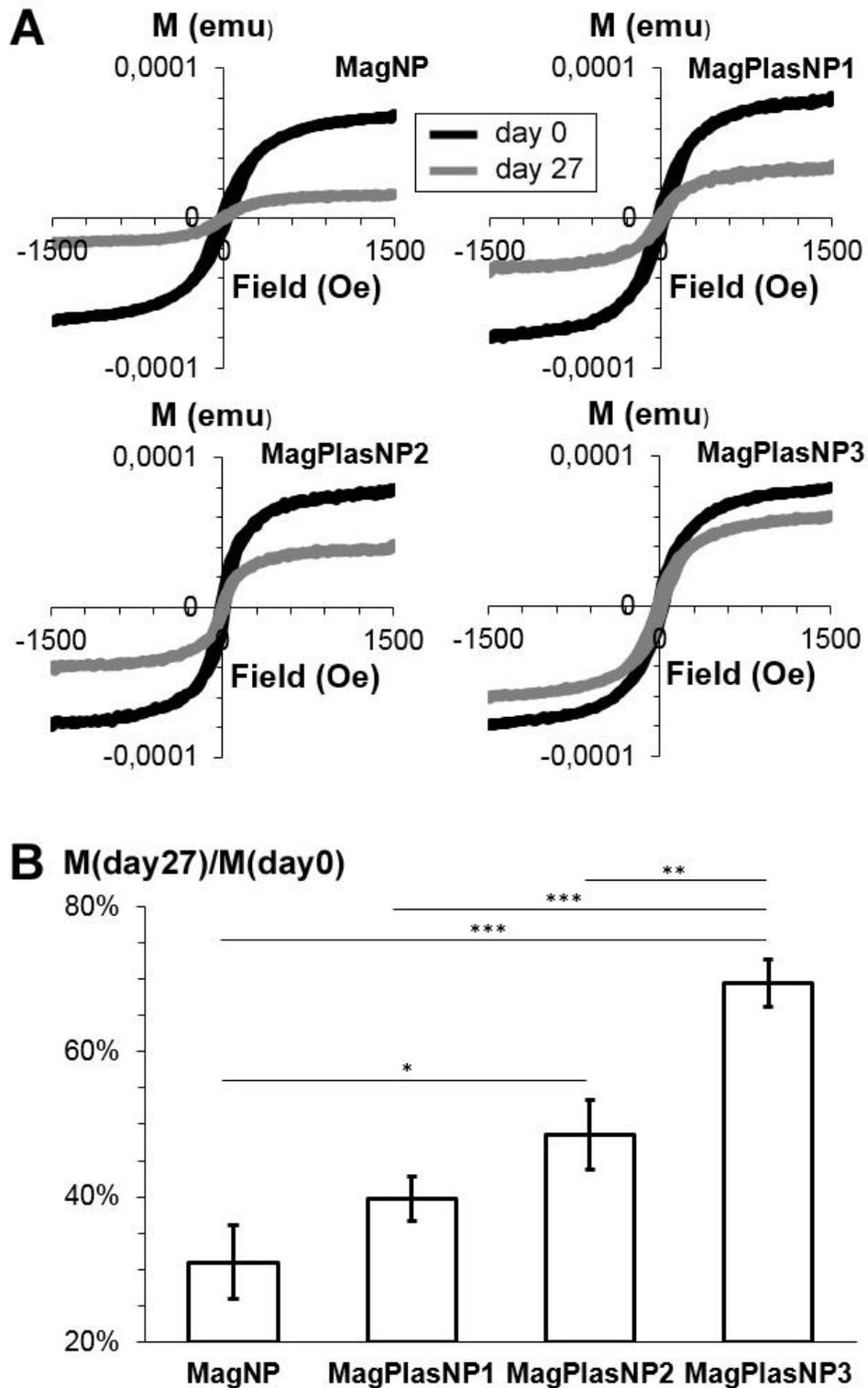


FIGURE II.10.11 – Evolution de l'aimantation des agrégats (A) Courbes d'aimantation mesurées par VSM des agrégats marqués avec les quatre nanomatériaux différents le jour de leur formation et après un mois de maturation. (B) Pourcentage de l'aimantation initiale à saturation persistant à J27 pour les quatre nanomatériaux.

Chauffage par hyperthermie magnétique La Figure II.10.12.A présente les mesures de l'élévation de température obtenues lorsque l'on place les agrégats (contenant les différentes nanoparticules, à J0 et J27) dans un champ magnétique oscillant (180 Gauss à 470 kHz) généré par deux bobines en configuration de Helmholtz (DM3, NanoScale Biomagnetics)). L'élévation de température est mesurée, au centre de l'agrégat, après 2 minutes d'application du champ magnétique, avec une caméra thermique infrarouge (FLIRSC 7000).

Le jour de formation les agrégats possèdent la même capacité de chauffage par hyperthermie (entre 3 et 4°C). Ceci correspond au fait que les agrégats contiennent la même quantité de nanoparticules aux coeurs de maghémite identiques.

Après un mois de maturation, la diminution de la capacité de chauffage des agrégats MagNP et Mag-PlasNP1 est similaire avec respectivement une perte de 2 et de 2,3°C de l'élévation de température. Cette baisse est deux fois plus importante que pour les agrégats MagPlasNP3 (1,1°C). Ceci est à mettre en lien avec la perte d'aimantation mesurée au cours du mois de maturation car ce sont les coeurs magnétiques des nanoparticules qui sont responsables du chauffage par hyperthermie magnétique. On retrouve bien que la protection par la couche d'or la plus épaisse diminue la dégradation d'un facteur deux.

Chauffage plasmonique L'élévation de température induite par l'exposition des agrégats à un laser (longueur d'onde : 680 nm, puissance : 0,3 W/cm², Laser Components SAS) en fonction des nanoparticules internalisées et du temps de maturation est présentée sur la Figure II.10.12.B. La mesure de température est réalisée après 1 minute d'exposition au laser, quand la température de l'agrégat sature.

A J0, la capacité de chauffage par photothermie est fonction de la capacité d'absorption des nanoparticules à 680 nm : $\Delta T = 6^\circ\text{C}$ pour MagPlasNP1 et $\Delta T = 11^\circ\text{C}$ pour MagPlasNP3 (voir spectre d'absorption en Figure II.10.9). La capacité de chauffage des MagNPs n'est pas nulle ($\Delta T = 2,5^\circ\text{C}$) malgré l'absence d'or dans ces nanoparticules, ceci montre qu'elles sont quand même capables d'absorber une partie du rayonnement laser.

Après un mois de maturation la capacité de chauffage n'est pas modifiée de manière significative pour MagPlasNP1 et MagPlasNP3, pour lesquelles la majeure partie de la capacité de chauffage est donnée par l'or, tandis qu'elle diminue pour MagNP, où c'est l'oxyde de fer qui permet le chauffage. Ceci montre que les propriétés plasmoniques sont conservées et donc que la couche d'or n'a pas été dégradée.

L'ensemble de ces mesures indique que la partie centrale d'oxyde de fer subit une dégradation tandis que la couche d'or reste intacte. La présence de la couche d'or est efficace. L'efficacité de la protection est proportionnelle à l'épaisseur et à la continuité de la couche d'or.

Echelle nanométrique

La Figure II.10.13 présente les clichés de MET et de MEBT de coupes des agrégats contenant les différents nanomatériaux le jour de leur formation et après un mois de maturation. Les nanoparticules sont présentes dans les endosomes des cellules.

Le jour de la formation, on retrouve bien la structure multi-coeurs des MagNPs observées en solution sur la Figure II.10.8. A J27, la dégradation est clairement visible sur les images de MET, les particules ont en partie perdu leur structure multi-coeurs, les différents domaines se séparant les uns des autres et étant eux même attaqués. On observe également l'apparition de protéines ferritine chargées en fer présentes à la fois dans les endosomes et le cytoplasme.

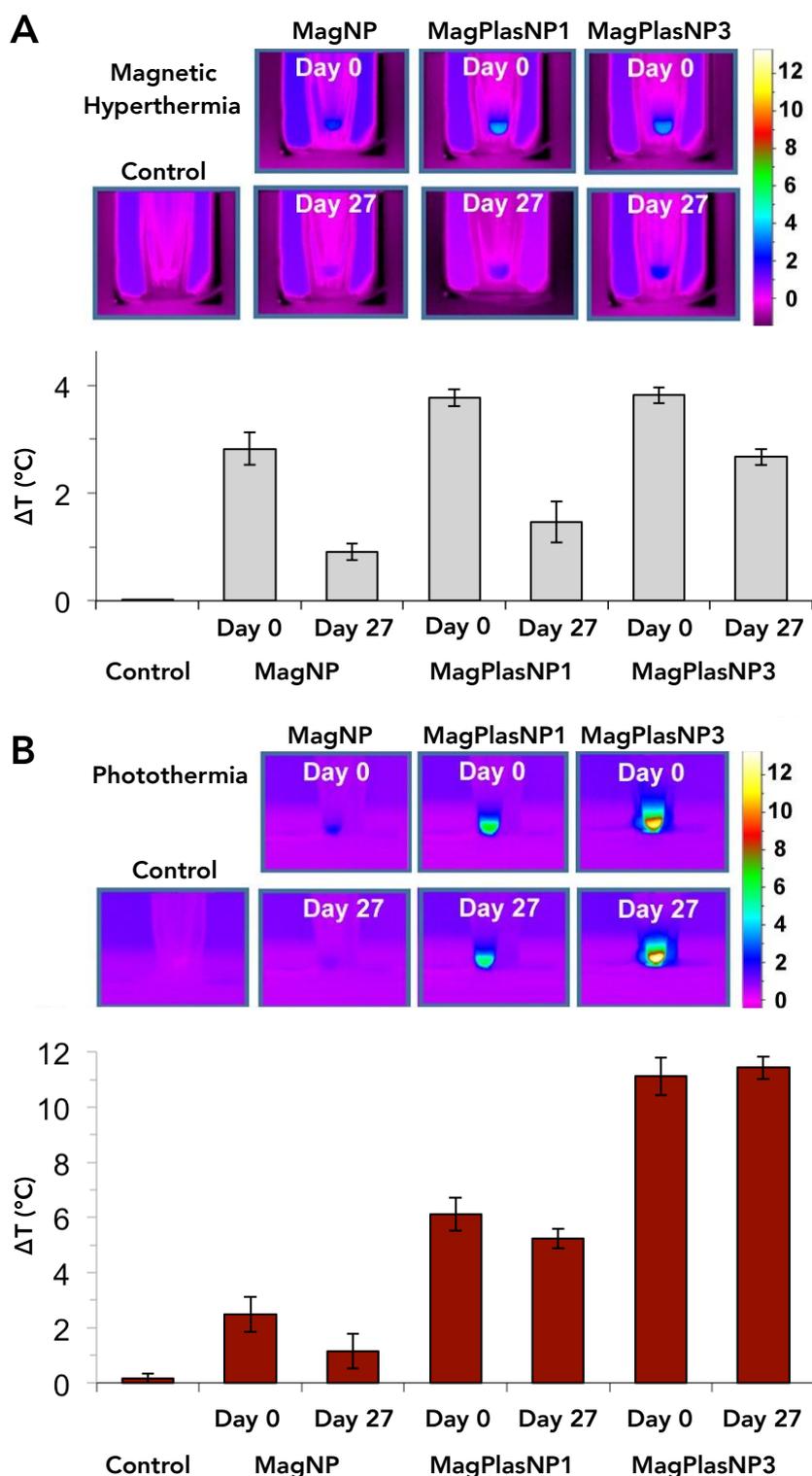


FIGURE II.10.12 – Evolution des propriétés de chauffage (A) Chauffage par hyperthermie magnétique. (B) Chauffage par photothermie. Images prises à la caméra thermique infrarouge d'agrégats (dans un tube de 1,5 mL) placés entre deux bobines générant le champ magnétique oscillant (A) ou éclairés par un laser (B). L'échelle de couleur correspond à l'élévation de température avant et pendant la stimulation. L'échantillon contrôle est un agrégat sans nanoparticule. Le graphique résume les élévations de température mesurées au centre de l'agrégat pour les quatre nanomatériaux à différents temps de maturation dans les tissus (J0 et J27).

Les images de cartographie chimique sont très utiles pour les particules hybrides car elles font clairement apparaître les différentes structures des particules.

Pour les MagPlasNP1s la dégradation est facilement identifiable sur les clichés. A J27 le coeur d'oxyde de fer de nombreuses particules a disparu, laissant des « cages » d'or vides ou contenant seulement un résidu du coeur de maghémite.

Pour les MagPlasNP2s, dont la couche d'or est plus épaisse, on observe qu'à J27 la plupart des particules possèdent encore un coeur de maghémite mais qu'il présente des modifications structurales avec une perte de la structure multi-coeurs et une réduction de la taille globale de la partie en oxyde de fer.

Enfin pour les MagPlasNP3s, les morphologies des particules à J0 et J27 sont très semblables. Certaines particules ont cependant des coeurs de maghémite qui semblent avoir été attaqués du fait de leur taille légèrement réduite.

Il faut noter que dans les trois conditions MagPlasNPs on n'observe pas de modification évidente de la structure de la partie en or.

La présence de petites taches de fer en périphérie des particules à J27 illustre la présence de ferritines chargées en fer. A J0 aucune tache n'est visible. Ceci témoigne bien de la présence de fer dans le cytoplasme, qui a été libéré au cours de la maturation et correspond au fait que tous les types de particules ont subi une dégradation.

La découpe des agrégats pour faire des coupes de 40 nm d'épaisseur peut créer des artefacts sur les images en coupant une partie des particules (elles peuvent avoir une taille allant jusqu'à 60 nm pour les MagPlasNP3s). Ceci peut donc faire apparaître de manière artificielle des particules où il manque la partie centrale ou une partie de la couverture d'or.

Les nanotransformations subies par les nanoparticules correspondent bien aux mesures macroscopiques de suivi de la dégradation. La dégradation de la partie centrale en maghémite est d'autant plus faible que la couverture d'or est continue et épaisse comme en témoignent la perte d'aimantation et la diminution de la capacité de chauffage par hyperthermie magnétique. La partie en or reste quant à elle intacte, ce qui est illustré par la non modification de la capacité de chauffage par photothermie au cours de la maturation.

10.2.3 Conclusion et perspectives

La stratégie de protection présentée est donc efficace pour réduire la dégradation de nanoparticules d'oxyde de fer. La présence de la couche d'or la plus épaisse permet de réduire le taux de dégradation à 30% alors que celui-ci est de 70% pour les particules nues. Cette protection est également modulable, en modifiant les caractéristiques de la couche d'or. Ceci est intéressant et ouvre des perspectives pour les applications où le contrôle du temps pendant lequel les propriétés magnétiques doivent être maintenues est important (utilisations thérapeutiques ou en ingénierie tissulaire).

D'un point de vue thérapeutique, l'effet de la couche d'or est double. Elle donne une meilleure capacité de chauffage aux particules en combinant la photothermie à l'hyperthermie magnétique, et en réduisant la dégradation du coeur en maghémite de particules elle permet une meilleure persistance dans le temps de cette capacité de chauffage.

La possibilité de protéger les nanomatériaux magnétiques d'une dégradation trop rapide pourrait en particulier être utile pour les études de mécanique des tissus menées dans la Partie I. En utilisant ces nanomatériaux qui gardent plus longtemps leur propriétés magnétiques, on pourra exercer une force

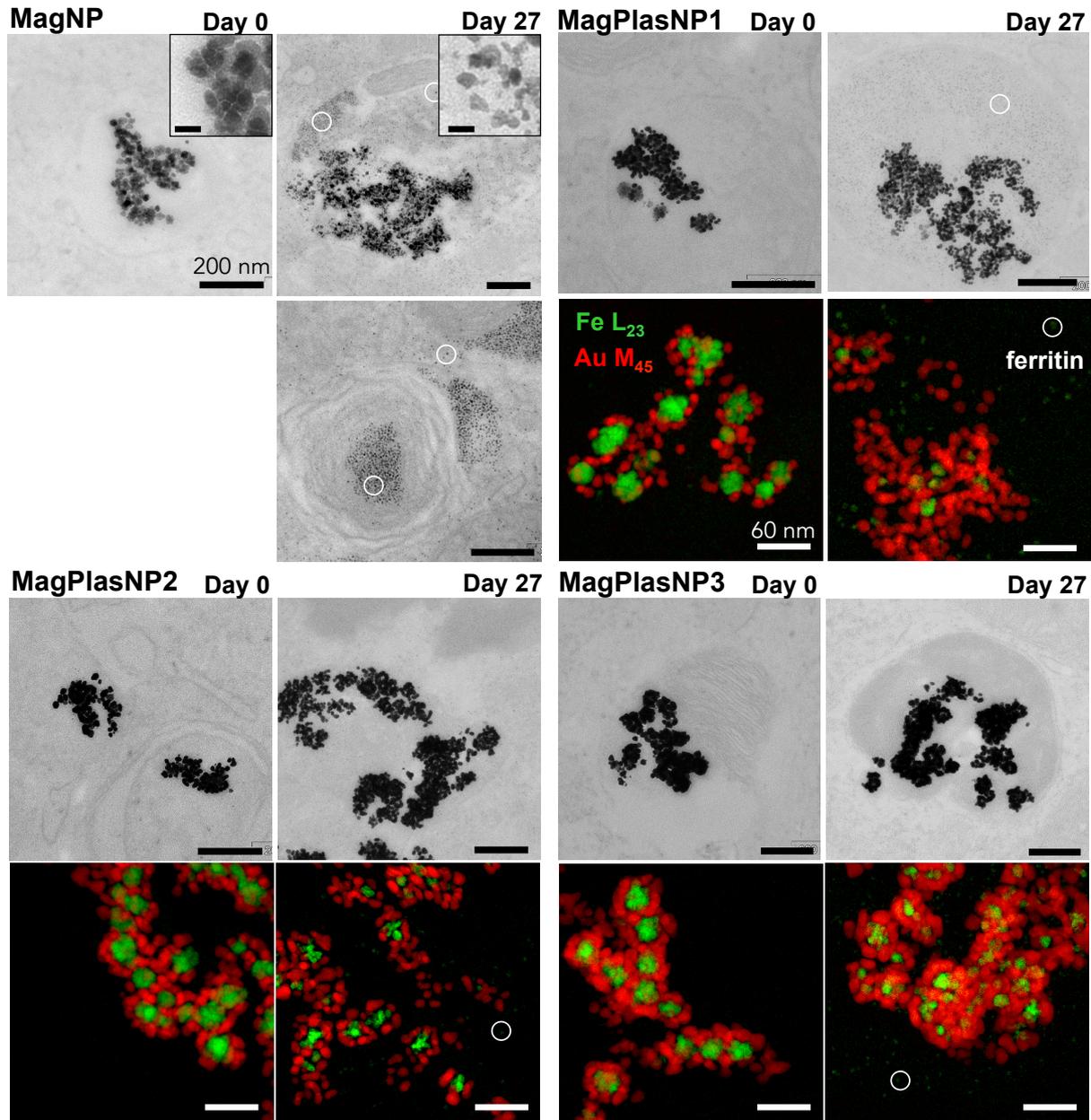


FIGURE II.10.13 – Dégradation de nanofleurs à l'échelle nanométrique Images de MET et de MEET dressant la cartographie chimique de coupes d'agrégats contenant les quatre nanoparticules à deux temps de maturation différents (J0 et J27). Le fer apparaît en vert tandis que l'or apparaît en rouge. Les ronds blancs entourent certaines des ferritines visibles sur les clichés. La barre d'échelle pour les agrandissements des MagNPs représente 20 nm.

magnétique sur des agrégats en cours de différenciation pendant des temps beaucoup plus longs.

11 | Conclusion générale

Cette thèse traite de deux thématiques, la mécanique des tissus et le devenir des nanomatériaux magnétiques dans les tissus biologiques, qui se rejoignent autour de l'ingénierie tissulaire magnétique. Les nanoparticules magnétiques servent à aimanter les cellules afin de pouvoir contrôler leur organisation sous forme d'un tissu et de le stimuler. La question de leur devenir et de l'impact de leur présence au coeur des tissus ainsi formés se pose naturellement quand on envisage l'utilisation de ce tissu.

Ce travail s'inscrit dans le domaine récent de l'assemblage, du contrôle et de la stimulation magnétiques des tissus. Il comporte deux facettes principales. La première est méthodologique, nous avons développé de nouveaux outils magnétiques pour répondre à des besoins expérimentaux précis. La deuxième est expérimentale, nous avons tiré profit des méthodes mises en place pour observer et quantifier des phénomènes nouveaux ou peu étudiés du fait des limitations techniques préexistantes.

La méthode de moulage magnétique permet de former des agrégats multicellulaires de formes et de tailles contrôlées excédant celles permises par les techniques classiques de formation. En ce sens, elle constitue un outil prometteur pour contrôler l'assemblage tissulaire à partir de différents types de cellules individuelles et pour produire de manière reproductible des agrégats cellulaires.

Le tensiomètre et le rhéomètre magnétiques sont des outils originaux qui permettent de déformer à distance les agrégats magnétiques en les soumettant à une super-gravité magnétique, constante dans le cas du tensiomètre, ou modulable dans le temps dans celui du rhéomètre. L'écrasement à distance des agrégats permet une mesure simple et précise de leur déformation ainsi qu'un suivi de la dynamique de leur réponse mécanique. Le rhéomètre est un dispositif très versatile qui permet d'appliquer un grand nombre de motifs de contraintes pour réaliser une large gamme d'expériences de rhéologie. Ces deux dispositifs viennent ainsi combler un manque expérimental vis à vis des techniques existantes et ouvrent de nouvelles perspectives dans l'étude de la mécanique des agrégats cellulaires.

Le tensiomètre magnétique nous a permis de mesurer la tension de surface d'agrégats multicellulaires de cellules souches et de mettre à jour deux modes de déformations différents pour ces agrégats en fonction de leur taille. Nous avons interprété cette observation en terme d'une transition élastocapillaire qui définit un rayon critique, frontière entre ces deux comportements.

Le rhéomètre magnétique a rendu possible la caractérisation de la réponse dynamique des agrégats en révélant une réponse en loi puissance qui est la signature de la structure et de l'organisation multi-échelle des tissus biologiques ainsi que de la contribution de la mécanique cellulaire aux propriétés de l'ensemble. Nous avons également identifié un comportement non linéaire des agrégats qui se rigidifient lorsqu'ils sont soumis à une contrainte d'écrasement suffisamment importante.

Les propriétés observées sont similaires à celles de la cellule unique. Ces résultats semblent indiquer que dans ces tissus sans matrice extracellulaire, la réponse de l'ensemble dans la gamme de contraintes utilisées, dépend beaucoup de celle des cellules. Néanmoins la contribution des adhésions cellule-cellule

est nette, comme nous l'avons mis en évidence via leur impact sur la rigidité globale.

Pour répondre à la question du devenir des nanomatériaux magnétiques dans ces tissus biologiques modèles, nous avons assemblé et défini un ensemble de méthodes pour étudier et caractériser de manière quantitative et à long terme la nano-biodégradation intratissulaire. Ceci répond à un réel besoin d'uniformisation des modèles et des méthodes utilisés pour fournir un outil de comparaison quantitatif de la biotransformation des nanomatériaux. L'agrégat multicellulaire de cellules souches sécrétant de la matrice extracellulaire est le modèle au coeur de la solution que nous proposons. Chaque agrégat constitue un environnement contrôlé et reproductible davantage représentatif des cellules dans leur environnement natif que les cultures à deux dimensions. Ceci permet de réaliser des mesures quantitatives et de comparer systématiquement l'influence des paramètres caractéristiques des nanomatériaux afin de mieux comprendre les mécanismes associés à leur bio devenir. La dégradation est caractérisée par des méthodes quantitatives (mesure de l'aimantation, mesures élémentaires, mesure de la capacité de chauffage et qPCR) et qualitatives (microscopie électronique).

Nous avons ainsi mis à jour une dégradation massive de nanoparticules d'oxyde de fer citratées dans les cellules des agrégats : près de 80% des nanoparticules perdent leur structure cristalline et sont dégradées en un mois. L'augmentation de la quantité de fer libéré dans la cellule entraîne une sur-expression par les cellules des protéines de stockage et d'export du fer. L'origine de cette dégradation est principalement endosomale.

Nous avons également montré avec l'étude conduite sur les nanocubes et nanodimères, que cet ensemble de méthodes est applicable à n'importe quelle nanoparticule magnétique et qu'il constitue un outil de comparaison intéressant pour comprendre l'influence de l'enrobage, de la taille et de la structure sur la dégradation. L'étude de la dégradation des particules magnéto-plasmoniques a montré sur un cas concret qu'il est possible de moduler la dégradation en recouvrant le coeur central d'oxyde de fer d'une couche plus ou moins épaisse d'or.

Les méthodes mises en place et les résultats obtenus dans cette thèse ouvrent de nombreuses perspectives. Certaines s'inscrivent dans la suite logique de chacune des deux parties de cette thèse tandis que d'autres utilisent une combinaison des différents résultats obtenus, et illustrent ainsi les connexions entre ces deux thématiques.

Concernant la mécanique des agrégats multicellulaires, il s'agira de poursuivre la caractérisation afin de mieux déterminer la contribution des différents constituants biologiques sur la réponse en loi puissance des agrégats et l'origine des non linéarités observées. Mieux comprendre expérimentalement les relations entre les propriétés mécaniques des cellules et celles du tissu est un enjeu important car de nombreux développements théoriques sont menés actuellement sur ces questions.

Le rhéomètre magnétique pourrait également être utilisé pour étudier la rhéologie d'objets inertes de la matière molle, la seule condition étant que les nanoparticules soient stables dans le matériau considéré pour pouvoir générer une super-gravité homogène.

En ce qui concerne la biodégradation des nanomatériaux, varier systématiquement un à un les différents paramètres des nanoparticules (taille, enrobage, structure, ...) sera nécessaire pour comprendre les mécanismes à l'oeuvre dans ces nano-biotransformations. Une telle approche, se concentrant sur l'influence de l'enrobage, est menée actuellement dans l'équipe. Un autre élément très important dans le

devenir intracellulaire des nanoparticules est l'interaction de ces dernières avec différentes biomolécules qui peuvent s'adsorber à leur surface (on parle d'opsonisation) avant qu'elles ne soient internalisées dans les cellules. Il est difficile à étudier car le contrôle des conditions expérimentales avec les méthodes usuelles est compliqué. A ce titre nos méthodes semblent particulièrement bien adaptées pour étudier cet aspect.

Nous avons finalement montré qu'il était possible de diminuer la dégradation des nanoparticules magnétiques en les protégeant avec une couche d'or. Ceci ouvre des perspectives particulièrement prometteuses concernant l'étude de la mécanique des tissus biologiques sur des temps plus longs. Jusqu'à présent la dégradation rapide des nanoparticules dans le tissu empêchait de suivre l'évolution des propriétés mécaniques sur le long terme. La perte de l'aimantation du tissu empêchait de générer des forces suffisantes pour les déformer. Avec ces particules se dégradant moins, il sera possible de déformer les agrégats même après un mois de maturation du tissu et donc de mesurer l'évolution des propriétés rhéologiques d'un tissu en cours de différenciation. Ceci permettra également de considérer les effets mécaniques de la matrice extracellulaire produite par les agrégats au cours de leur maturation sur un système contrôlé. Ceci est nouveau dans le domaine et constituerait un pas de plus, pour le bio-physicien, vers la compréhension de la physique d'un tissu biologique complexe.

Annexes

A | Protocoles classiques

Cette Annexe présente les protocoles classiques utilisés en routine durant cette thèse ainsi que les réactifs associés. Les autres protocoles développés ou optimisés spécifiquement pour les travaux de thèse sont décrits dans le corps du texte.

A.1 Culture cellulaire

Cellules souches mésenchymateuse (MSC)

Les cellules souches mésenchymateuses (LONZA) sont issues de deux lots différents (un lot pour les expériences avec le tensiomètre magnétique, l'autre pour les expériences de dégradation). Elles sont cultivées dans du MSCBM (Lonza) à 37°C et à 5% de CO₂. Les cellules sont amplifiées jusqu'au quatrième passage en les divisant au tiers à chaque passage (Trypsin avec EGTA, Gibco®) lorsqu'elles atteignent la confluence (environ une dizaine de jours).

F9

Les cellules F9 sont cultivées dans du DMEN (Gibco®) complété avec 5% de sérum (FBS, Gibco®) et de la Penicillin Streptomycin (Gibco®). Les flacons de culture doivent être traités avec une solution stérile de gélatine 0,1% (Sigma) dans du PBS (Gibco®) pendant au moins 30 minutes à 37°C. La solution de gélatine est retirée avant de transférer les cellules dans la nouvelle flasque lors du passage. Les cellules sont divisées lorsqu'elles atteignent la confluence.

A.2 Marquage magnétique

Pour aimanter les cellules cultivées en monocouche dans une flasque on utilise le protocole suivant :

1. Lorsque les cellules à marquer arrivent à l'état de confluence souhaité, elles sont rincées au RPMI 1640 (Gibco®).
2. La solution de nanoparticules préparée à la concentration souhaitée dans du RPMI 1640 (avec 5 mM de citrate) est ajoutée dans la flasque de culture. La solution est incubée à 37°C et 5% de CO₂ pendant la durée souhaitée.
3. Une fois ce temps d'incubation écoulé, les cellules sont rincées au RPMI 1640.
4. Du milieu complet DMEM est ajouté et on place les cellules à 37°C et 5% de CO₂ pour une durée de quelques heures appelée « chasse » qui sert à ce que le processus d'internalisation soit total.
5. Les cellules peuvent être détachées pour être utilisées.

A.3 Maturation des agrégats

La composition du milieu de maturation des agrégats de cellules souches mésenchymateuses formés par moulage magnétique (Chapitres I.4 et I.5) et par centrifugation (Chapitres II.8, II.9 et II.10), est constitué de :

- DMEM high glucose sans sérum
- dexaméthasone (Sigma, concentration finale 0,1 μM)
- sodium pyruvate (1 mM)
- d'acide ascorbique 2 phosphate (Sigma, 50 μM)
- L-proline (Sigma, 0,35 mM)
- ITS Premix (BD Bioscience, dilution 1/100)
- TGF β 3 (10 ng/L), dans certaines conditions utilisées dans cette thèse, le TGF β 3 n'était pas ajouté au milieu.

A.4 Magnétophorèse des cellules

Pour mesurer la quantité de nanoparticules internalisées par les cellules (le plus souvent traduite en masse de fer par cellule), on mesure leur aimantation par une méthode de magnétophorèse. Après avoir détaché les cellules, on dépose une solution diluée de cellules dans une cuve Helma que l'on place dans un gradient de champ magnétique (17 T/m) créé par un aimant permanent en néodyme. Le dispositif est placé sur un microscope et le mouvement des cellules est filmé avec un objectif 20x. Une cellule d'aimantation M est attirée vers l'aimant par la force magnétique $F_{mag} = MgradB$ qui est compensée par la traînée que le fluide exerce sur la cellule $F_{drag} = 6\pi\eta RV$ (nombre de Reynolds caractéristique $Re \simeq 10^{-3}$). La cellule atteint donc une vitesse limite V_{lim} . La mesure par traitement d'image de cette vitesse ainsi que du rayon de la cellule R permet de déterminer M . La connaissance de l'aimantation à saturation (en $A.m^2/g_{Fe}$, mesurée par VSM) permet de calculer la masse de fer correspondant à cette aimantation. Cette mesure réalisée sur un grand nombre de cellules permet de déterminer la distribution de la quantité de fer par cellule.

A.5 Fixation et préparation des coupes

Les agrégats servant à l'imagerie sont fixés après rinçage au PBS dans une solution de formaline (Sigma) pendant 1 heure à température ambiante. Après la fixation les agrégats sont ensuite rincé au PBS et conservé dans du PBS à 4°C. Les agrégats sont congelés inclus dans l'OCT en les plongeant dans un bain d'isopentane refroidi à l'azote liquide.

Les blocs d'OCT sont coupés au cryotome en coupes d'épaisseurs de 6 à 30 μm .

A.6 Histologie

Hématoxyline/Eosine

Le protocole pour marquer les lame à l'hématoxyline et a l'éosine est le suivant :

1. Incubation pendant 5 minutes à température ambiante (TA) dans du PFA 4%.
2. Rinçage à l'eau du robinet.
3. Colorer avec la solution d'hématoxyline de Harris (Sigma) pendant 5 min à TA.
4. Rinçage à l'eau du robinet.

5. Plonger dans l'eau chlorhydrique (1% d'acide chlorhydrique dans de l'eau distillée).
6. Rinçage à l'eau du robinet.
7. Plonger dans l'eau ammoniacale (1% d'ammoniaque dans de l'eau distillée).
8. Rinçage à l'eau du robinet.
9. Rinçage à l'eau distillée.
10. Colorer avec la solution d'éosine Y (Sigma) pendant 2 min à TA.
11. Rinçage à l'eau du robinet.
12. Plonger dans l'éthanol absolu (environ 1 min).
13. Plonger dans un deuxième bain d'éthanol absolu (environ 2 min).
14. Plonger dans trois bains successifs de toluène (2 min / 2 min / 5 min).
15. Montage de la lame.

Bleu de Prusse

Ce marquage sert à colorer le fer en bleu.

1. Incubation pendant 5 minutes à température ambiante (TA) dans du PFA 4%.
2. Rinçage à l'eau du robinet.
3. Mélanger deux volumes identiques d'une solution à 2% en masse d'acide chlorhydrique dans l'eau avec une solution à 2% en masse de ferrocyanide de potassium trihydrate (Sigma) dans l'eau. Immerger pendant 20 minutes les lames dans la solution obtenue.
4. Rincer trois fois à l'eau distillée
5. Marquer au Fast nuclear red (Sigma) pendant 5 minutes.
6. Rincer deux fois à l'eau distillée.
7. Déshydrater les lames dans un bain à 95% en éthanol puis 2 bains dans 100% d'éthanol et un bain final dans du toluène.
8. Montage de la lame.

A.7 Immunofluorescence

Pour marquer les cadhérines, actines et noyaux des coupes d'agrégats, le protocole est le suivant :

1. Décongeler les lames si elles ont été stockées au -80°C.
2. Incubation pendant 5 minutes à température ambiante (TA) dans du PFA 4%.
3. Trois rinçages successifs (5 minutes) dans du PBS.
4. Rendre les membranes perméables avec du Triton 0,1% pendant 15 min à TA.
5. Bloquer les sites d'interactions non spécifiques avec du FBS 1% dans du PBS pendant 30 min à TA.
6. Incubation pendant 1 heure à TA de l'anticorps anti Pan cadherin (dilué au 1/1000 dans du PBS avec 1% de FBS, LifeTechnologies).
7. Trois rinçages successifs (5 minutes) dans du PBS.
8. Incubation pendant 1 heure à TA de l'anticorps secondaire anti rabbit (dilué au 1/500 dans du PBS avec 1% de FBS, LifeTechnologies).

9. Trois rinçages successifs (5 minutes) dans du PBS.
10. Incubation pendant 20 min à TA de la Phalloïdin (diluée au 1/40 dans du PBS avec 1% de FBS, LifeTechnologies).
11. Trois rinçages successifs (5 minutes) dans du PBS.
12. Incubation pendant 20 min à TA du DAPI ((dilué au 1/1000 dans du PBS)
13. Rinçage au PBS.
14. Montage de la lame.

A.8 Traitement superhydrophobe des lamelles

Les lamelles de microscopes qui servent à fermer le fond de la cuve dans les expériences d'écrasement de gouttes de ferrofluide (I.4.2.2 et I.4.3.2), sont traitée pour être superhydrophobes afin d'obtenir des conditions non mouillantes pour les gouttes

1. Une fine couche de Glaco est déposée sur des lamelles rondes de microscopie (diamètre 40 mm, épaisseur 1) mise en rotation grâce à une tournette.
2. Les lamelles sont placées pendant 30 min à 150°C.
3. Ce processus est répété trois fois par lamelle.

B | Calcul du profil d'une goutte pesante

La forme d'une goutte de liquide déposée sur une surface non mouillante et soumise à une force volumique homogène est donnée par l'équation de Laplace :

$$\gamma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) = \Delta P$$

où R_1 et R_2 sont les deux rayons de courbures de la goutte et ΔP la surpression dans la goutte. Dans le système de coordonnées présenté sur la Figure II.B.1, le système d'équations gouvernant la forme du profil s'écrit :

$$\begin{cases} \frac{dx}{ds} = \cos \theta \\ \frac{dz}{ds} = \sin \theta \\ \frac{d\theta}{ds} = 2b + cz - \frac{\sin \theta}{x} \end{cases}$$

avec $c = f_V/\gamma = \kappa^2$ et b qui est l'inverse du rayon de courbure à l'apex ($x=0, y=0$).

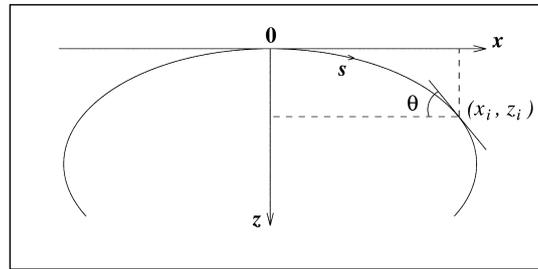


FIGURE II.B.1 – Définition du système de coordonnées pour décrire une goutte pesante

b et c sont les deux seuls paramètres qui déterminent un profil donné. Ce système est intégré numériquement pour générer les profils de Laplace avec la fonction ode45 de Matlab. On arrête le traçage du profil lorsque l'angle θ devient supérieur à 180° , cela traduit les conditions non mouillantes de la goutte sur le support.

Pour ajuster un profil numérique avec un profil expérimental, afin de déterminer le paramètre $c = f_V/\gamma = \kappa^2$ associé au profil expérimental, la fonction L :

$$L = \left(1 - \frac{h_{num}}{h_{exp}} \right)^2 + \left(1 - \frac{w_{num}}{w_{exp}} \right)^2 + \left(1 - \frac{V_{num}}{V_{exp}} \right)^2$$

qui mesure l'écart quadratique de la hauteur (h), de la largeur (w) et du volume (V) entre le profil numérique et le profil expérimental, est minimisée par rapport aux paramètres b et c . La fonction Matlab utilisée est fminsearch.

C | Images supplémentaires de microscopie électronique en transmission

C.1 Nanoparticules

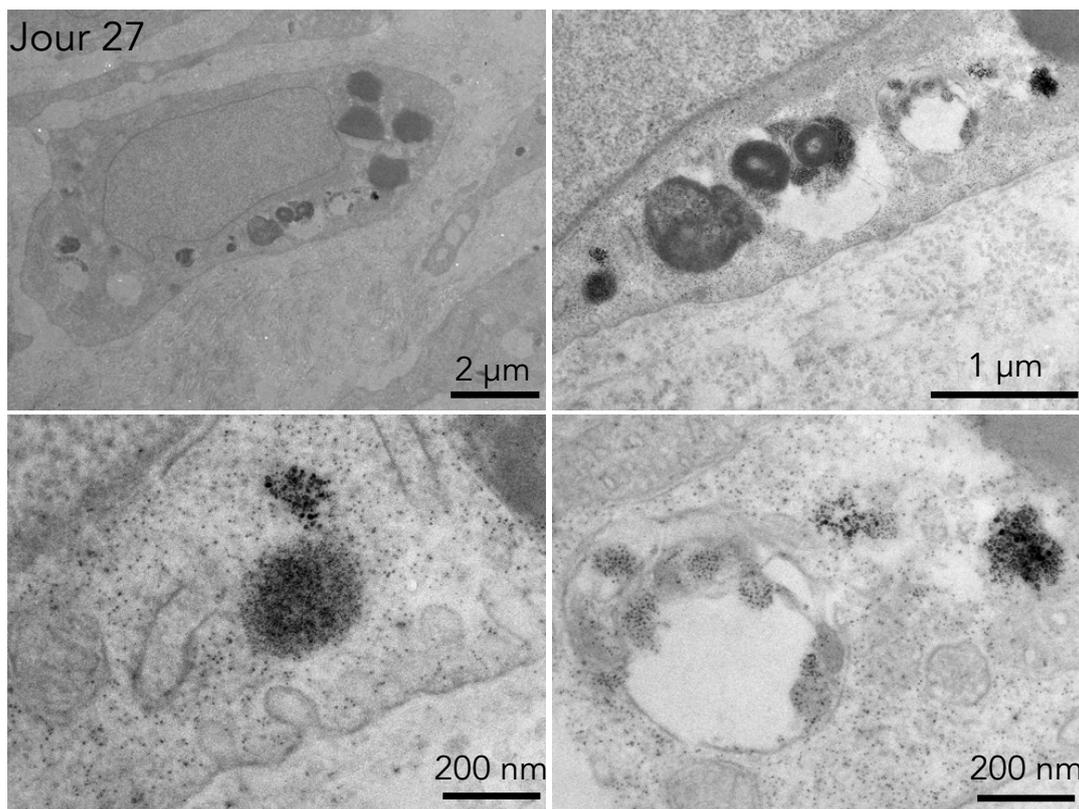


FIGURE II.C.1 – **Dégradation des nanoparticules** Image de microscopie électronique en transmission de nanoparticules internalisés dans les cellules de l'agrégat à J27.

C.2 Nanocubes et nanodimers

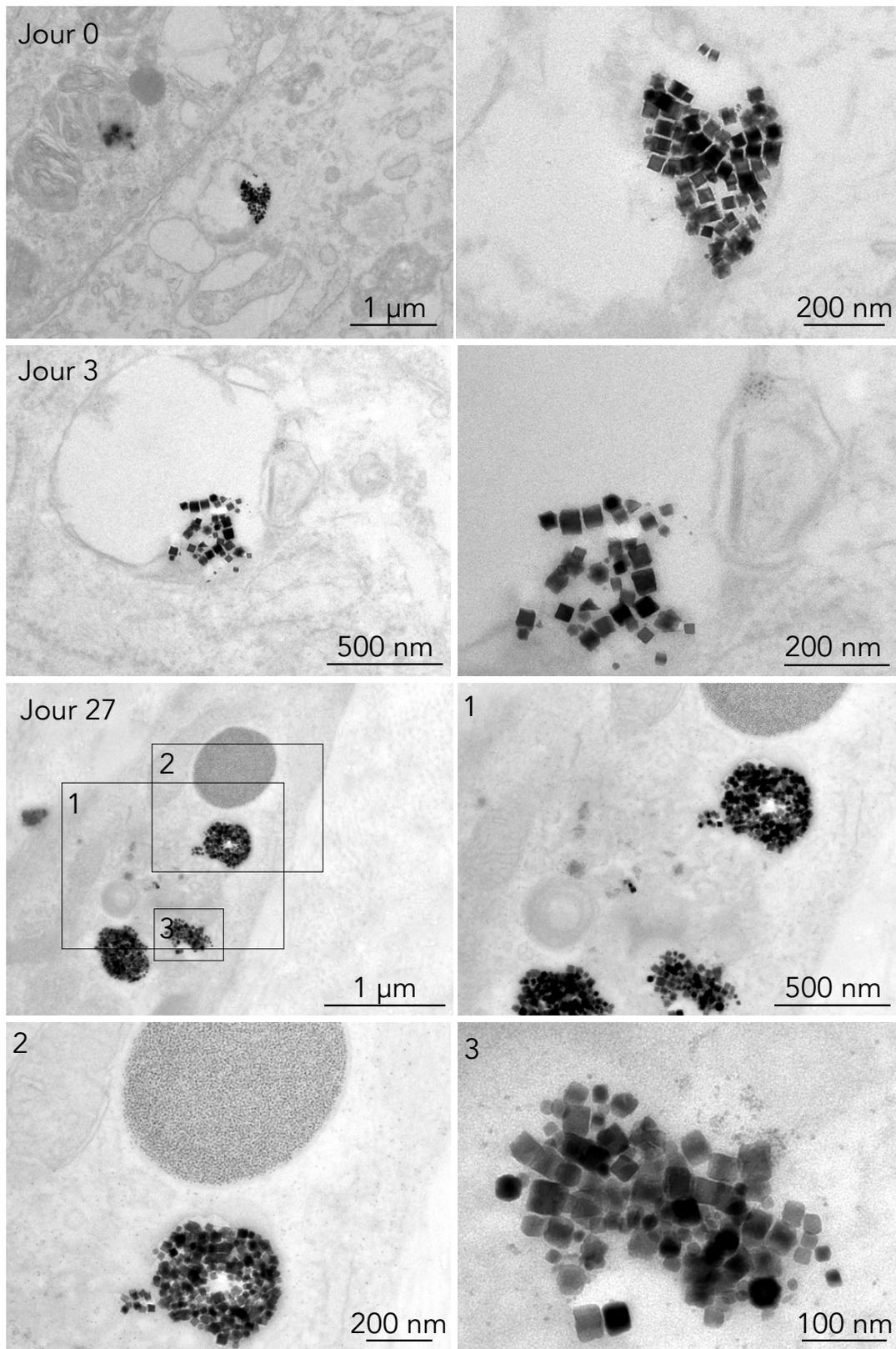


FIGURE II.C.2 – **Dégradation des nanocubes** Image de microscopie électronique en transmission de nanocubes internalisés dans les cellules de l'agrégat à J0, J3 et J27.

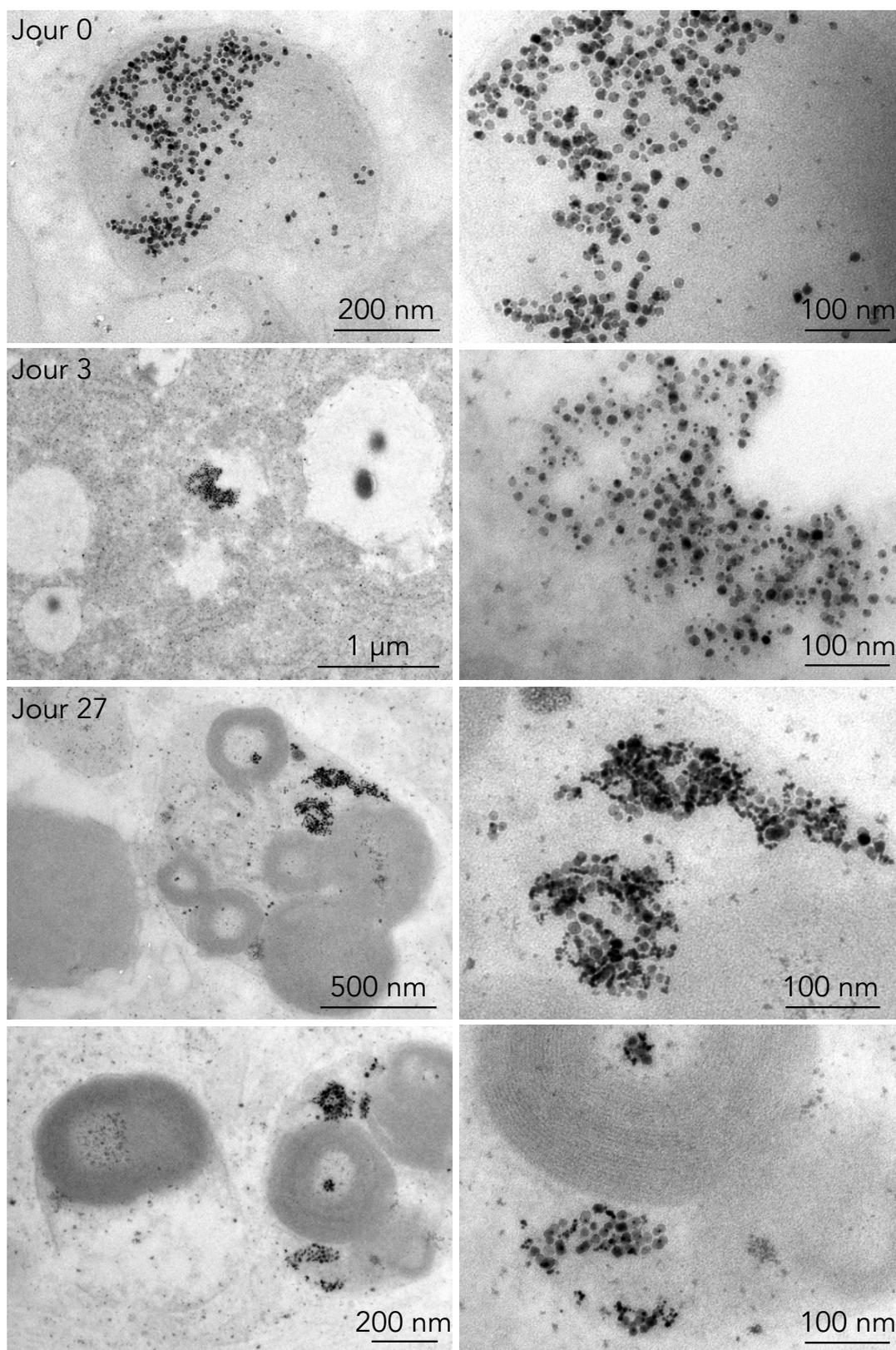


FIGURE II.C.3 – **Dégradation des nanocubes** Image de microscopie électronique en transmission de nanodimers internalisés dans les cellules de l'agrégat à J0, J3 et J27.

D | Article 1

Cette annexe présente la référence [115] publiée en mars 2015 dans *Physical Review Letters*. Cet article reprend les résultats présentés dans le Chapitre I.5 en utilisant les méthodes présentées en I.4.1 et I.4.2.

figures/annexes/annexe_PRL.pdf

figures/annexes/annexe_PRL.pdf

figures/annexes/annexe_PRL.pdf

figures/annexes/annexe_PRL.pdf

figures/annexes/annexe_PRL.pdf

E | Article 2

Cette annexe présente la référence [164] publiée en juillet 2016 dans *ACS Nano*. Cet article reprend les résultats présentés dans le Chapitre II.9 en utilisant les méthodes présentées en II.8.

figures/annexes/annexe_acsnano.pdf

Bibliographie

- [1] Rwei-Zeng Lin, Rwei-Zhen Lin, and Hwan-You Chang. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology journal*, 3(9-10) :1172–84, oct 2008.
- [2] Sritama Nath and Gayathri R. Devi. Three-Dimensional Culture Systems in Cancer Research : Focus on Tumor Spheroid Model. *Pharmacology & Therapeutics*, 2016.
- [3] Tomita Vasilica Stirbat, Sham Tlili, Thibault Houver, Jean-Paul Rieu, Catherine Barentin, and Hélène Delanoë-Ayari. Multicellular aggregates : a model system for tissue rheology. *The European physical journal. E, Soft matter*, 36(8) :84, aug 2013.
- [4] C. Norotte, F. Marga, a. Neagu, I. Kosztin, and G. Forgacs. Experimental evaluation of apparent tissue surface tension based on the exact solution of the Laplace equation. *EPL (Europhysics Letters)*, 81(4) :46003, feb 2008.
- [5] Alison Abbott. Biology 's new dimension. *Nature*, 424(August) :870–872, 2003.
- [6] Linda G. Griffith and Melody A. Swartz. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nature reviews Molecular cell biology*, 7(3) :211–24, 2006.
- [7] Francesco Pampaloni, Emmanuel G Reynaud, and Ernst H K Stelzer. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(10) :839–845, 2007.
- [8] Franziska Hirschhaeuser, Heike Menne, Claudia Dittfeld, Jonathan West, Wolfgang Mueller-Klieser, and Leoni a Kunz-Schughart. Multicellular tumor spheroids : an underestimated tool is catching up again. *Journal of biotechnology*, 148(1) :3–15, jul 2010.
- [9] Adrian Neagu, Karoly Jakab, Richard Jamison, and Gabor Forgacs. Role of physical mechanisms in biological self-organization. *Physical Review Letters*, 95(17) :1–4, 2005.
- [10] Vladimir Mironov, Richard P Visconti, Vladimir Kasyanov, Gabor Forgacs, Christopher J Drake, and Roger R Markwald. Organ printing : tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials*, 30(12) :2164–74, apr 2009.
- [11] R M Sutherland, J a McCredie, and W R Inch. Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute*, 46(1) :113–20, jan 1971.
- [12] A Moscona. The development in vitro of chimeric aggregates of dissociated embryonic chick and mouse cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 43 :184–194, 1957.
- [13] Susan Breslin and Lorraine O’Driscoll. Three-dimensional cell culture : The missing link in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 18(5-6) :240–249, 2013.
- [14] Maria Vinci, Carol Box, and Suzanne A Eccles. Three-dimensional (3D) tumor spheroid invasion assay. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (99) :e52686, 2015.

- [15] Kosuke Ino, Akira Ito, and Hiroyuki Honda. Cell Patterning Using Magnetite Nanoparticles and Magnetic Force. *Biotechnology and Bioengineering*, 97(5) :1309–1317, 2007.
- [16] Guillaume Frasca, Florence Gazeau, and Claire Wilhelm. Formation of a three-dimensional multicellular assembly using magnetic patterning. *Langmuir*, 25(4) :2348–54, mar 2009.
- [17] V. Du, D. Fayol, M. Reffay, N. Luciani, J-C. Bacri, C. Gay, and C. Wilhelm. Magnetic engineering of stable rod-shaped stem cell aggregates : circumventing the pitfall of self-bending. *Integr. Biol.*, 7(2) :170–177, 2015.
- [18] Ruei-Zeng Lin, Wen-Chen Chu, Chao-Chien Chiang, Chih-Huang Lai, and Hwan-You Chang. Magnetic reconstruction of three-dimensional tissues from multicellular spheroids. *Tissue engineering. Part C, Methods*, 14(3) :197–205, sep 2008.
- [19] Vincent H B Ho, Karin H Müller, Alexander Barcza, Rongjun Chen, and Nigel K H Slater. Generation and manipulation of magnetic multicellular spheroids. *Biomaterials*, 31(11) :3095–102, apr 2010.
- [20] Andrés M Bratt-Leal, Kirsten L Kepple, Richard L Carpenedo, Marissa T Cooke, and Todd C McDevitt. Magnetic manipulation and spatial patterning of multi-cellular stem cell aggregates. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro*, 3(12) :1224–32, dec 2011.
- [21] David Gonzalez-Rodriguez, Karine Guevorkian, Stéphane Douezan, and Françoise Brochard-Wyart. Soft matter models of developing tissues and tumors. *Science*, 338(6109) :910–7, nov 2012.
- [22] Fabien Montel, Morgan Delarue, Jens Elgeti, Laurent Malaquin, Markus Basan, Thomas Risler, Bernard Cabane, Danijela Vignjevic, Jacques Prost, Giovanni Cappello, and Jean Fran ?ois Joanny. Stress clamp experiments on multicellular tumor spheroids. *Physical Review Letters*, 107(18) :1–4, 2011.
- [23] Morgan Delarue, Fabien Montel, Danijela Vignjevic, Jacques Prost, Jean François Joanny, and Giovanni Cappello. Compressive stress inhibits proliferation in tumor spheroids through a volume limitation. *Biophysical Journal*, 107(8) :1821–1828, 2014.
- [24] Kévin Alessandri, Bibhu Ranjan Sarangi, Vasily Valériévitch Gurchenkov, Bidisha Sinha, Tobias Reinhold Kießling, Luc Fetler, Felix Rico, Simon Scheuring, Christophe Lamaze, Anthony Simon, Sara Geraldo, Danijela Vignjevic, Hugo Doméjean, Leslie Rolland, Anette Funfak, Jérôme Bibette, Nicolas Bremond, and Pierre Nassoy. Cellular capsules as a tool for multicellular spheroid production and for investigating the mechanics of tumor progression in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(37) :14843–8, sep 2013.
- [25] M Krieg, Y Arboleda-Estudillo, P-H Puech, J Käfer, F Graner, D J Müller, and C-P Heisenberg. Tensile forces govern germ-layer organization in zebrafish. *Nature cell biology*, 10(4) :429–36, apr 2008.
- [26] George M Whitesides. The 'right' size in nanobiotechnology. *Nature biotechnology*, 21(10) :1161–1165, 2003.
- [27] An Hui Lu, E. L. Salabas, and Ferdi Sch ?th. Magnetic nanoparticles : Synthesis, protection, functionalization, and application. *Angewandte Chemie - International Edition*, 46(8) :1222–1244, 2007.
- [28] Aitziber L. Cortajarena, Daniel Ortega, Sandra M. Ocampo, Alberto Gonzalez-García, Pierre Couleaud, Rodolfo Miranda, Cristobal Belda-Iniesta, and Angel Ayuso-Sacido. Engineering Iron Oxide Nanoparticles for Clinical Settings. *Nanobiomedicine*, 1(2) :doi : 10.5772/58841, 2014.

- [29] Bernhard Gleich and Jürgen Weizenecker. Tomographic imaging using the nonlinear response of magnetic particles. *Nature*, 435(7046) :1214–1217, 2005.
- [30] Kim E. Sapsford, W. Russ Algar, Lorenzo Berti, Kelly Boeneman Gemmill, Brendan J. Casey, Eunkeu Oh, Michael H. Stewart, and Igor L. Medintz. Functionalizing nanoparticles with biological molecules : Developing chemistries that facilitate nanotechnology. *Chemical Reviews*, 113(3) :1904–2074, 2013.
- [31] Riccardo Di Corato, Ana Espinosa, Lenaic Lartigue, Mickael Tharaud, Sophie Chat, Teresa Pellegrino, Christine Ménager, Florence Gazeau, and Claire Wilhelm. Magnetic hyperthermia efficiency in the cellular environment for different nanoparticle designs. *Biomaterials*, 35(24) :6400–6411, 2014.
- [32] MagForce. NanoTherm®.
- [33] Ritchie Chen, Gabriela Romero, Michael G Christiansen, Alan Mohr, and Polina Anikeeva. Wireless magnetothermal deep brain stimulation. *Science (New York, N.Y.)*, 347(6229) :1477–80, 2015.
- [34] Scott Campbell, Danielle Maitland, and Todd Hoare. Enhanced Pulsatile Drug Release from Injectable Magnetic Hydrogels with Embedded Thermosensitive Microgels. *ACS Macro Letters*, 4(3) :312–316, 2015.
- [35] Michael H Schwenk. Ferumoxytol : a new intravenous iron preparation for the treatment of iron deficiency anemia in patients with chronic kidney disease. *Pharmacotherapy*, 30(1) :70–79, 2010.
- [36] D Fayol, G Frasca, C Le Visage, F Gazeau, N Luciani, and C Wilhelm. Use of magnetic forces to promote stem cell aggregation during differentiation, and cartilage tissue modeling. *Advanced materials*, 25(18) :2611–6, may 2013.
- [37] Eunjee A. Lee, Hyungu Yim, Jiseung Heo, Hwan Kim, Giyoung Jung, and Nathaniel S. Hwang. Application of magnetic nanoparticle for controlled tissue assembly and tissue engineering, 2014.
- [38] René Massart. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media. *IEEE Transactions on Magnetism*, 17(2) :1247–1248, 1981.
- [39] C Wilhelm, F Gazeau, J Roger, J N Pons, and J Bacri. Interaction of Anionic Superparamagnetic Nanoparticles with Cells : Kinetic Analyses of Membrane Adsorption and Subsequent Internalization. *Langmuir*, 18(21) :8148–8155, 2002.
- [40] Andre Nel, Tian Xia, Lutz Mädler, and Ning Li. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science (New York, N.Y.)*, 311(February 2006) :622–627, 2006.
- [41] H L Karlsson, P Cronholm, J Gustafsson, and L Moller. Copper oxide nanoparticles are highly toxic : A comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem. Res. Toxicol.*, 21 :1726–1732, 2008.
- [42] OECD. Nanomaterials in Waste Streams : Current Knowledge on Risks and Impacts. *OECD*, 2016.
- [43] Nastassja Lewinski, Vicki Colvin, and Rebekah Drezek. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small*, 4(1) :26–49, 2008.
- [44] Neenu Singh, Gareth J.S. S Jenkins, Romisa Asadi, and Shareen H. Doak. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). *Nano Reviews*, 1(0) :1–15, 2010.
- [45] Arun Balakumaran, Edyta Pawelczyk, Jiaqiang Ren, Brian Sworder, Aneeka Chaudhry, Marianna Sabatino, David Stroncek, Joseph A Frank, and Pamela G Robey. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles labeling of bone marrow stromal (mesenchymal) cells does not affect their "stemness". *PloS one*, 5(7) :e11462, 2010.

- [46] Vanessa Valdiglesias, Natalia Fernández-Bertólez, Gözde Kiliç, Carla Costa, Solange Costa, Sonia Fraga, Maria Joao Bessa, Eduardo Pásaro, João Paulo Teixeira, and Blanca Laffon. Are iron oxide nanoparticles safe? Current knowledge and future perspectives. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2016.
- [47] Jelena Kolosnjaj-Tabi, Lénaïc Lartigue, Yasir Javed, Nathalie Luciani, Teresa Pellegrino, Claire Wilhelm, Damien Alloeyau, and Florence Gazeau. Biotransformations of magnetic nanoparticles in the body. *Nano Today*, 2016.
- [48] N Wang and D Stamenović. Contribution of intermediate filaments to cell stiffness, stiffening, and growth. *American journal of physiology. Cell physiology*, 279(1) :C188–C194, 2000.
- [49] BO. Palsson and S.N Bhatia. *Tissue Engineering*. Pearson Prentice Hall, 2004.
- [50] Richard O Hynes. The Extracellular Matrix : Not Just Pretty Fibrils. *Science*, 326(2009) :1216–1219, 2009.
- [51] D. E. Discher, D. J. Mooney, and P. W. Zandstra. Growth Factors, Matrices, and Forces Combine and Control Stem Cells. *Science*, 324(5935) :1673–1677, 2009.
- [52] Karen E Kasza, Amy C Rowat, Jiayu Liu, Thomas E Angelini, Clifford P Brangwynne, Gijssje H Koenderink, and David A Weitz. The cell as a material. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(1) :101–107, 2007.
- [53] M L Gardel, F Nakamura, J H Hartwig, J C Crocker, T P Stossel, and D a Weitz. Prestressed F-actin networks cross-linked by hinged filamins replicate mechanical properties of cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(6) :1762–1767, 2006.
- [54] Pramod a. Pullarkat, Pablo a. Fernández, and Albrecht Ott. Rheological properties of the Eukaryotic cell cytoskeleton. *Physics Reports*, 449(1-3) :29–53, 2007.
- [55] Ulrich S. Schwarz and Samuel a. Safran. Physics of adherent cells. *Reviews of Modern Physics*, 85(3) :1327–1381, aug 2013.
- [56] Philip Kollmannsberger and Ben Fabry. Linear and Nonlinear Rheology of Living Cells. *Annual Review of Materials Research*, 41(1) :75–97, 2011.
- [57] Ryosuke Takahashi and Takaharu Okajima. Mapping power-law rheology of living cells using multi-frequency force modulation atomic force microscopy. *Applied Physics Letters*, 107(17) :173702, 2015.
- [58] PingGen Cai, Yusuke Mizutani, Masahiro Tsuchiya, JohnM. Maloney, Ben Fabry, KrystynJ. VanVliet, and Takaharu Okajima. Quantifying Cell-to-Cell Variation in Power-Law Rheology. *Biophysical Journal*, 105(5) :1093–1102, 2013.
- [59] Brenton D Hoffman, Gladys Massiera, Kathleen M Van Citters, and John C Crocker. The consensus mechanics of cultured mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 :10259–10264, 2006.
- [60] Martial Baland, Nicolas Desprat, Delphine Icard, Sophie Féréol, Atef Asnacios, Julien Browaeys, Sylvie Hénon, and François Gallet. Power laws in microrheology experiments on living cells : Comparative analysis and modeling. *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, 74 :1–17, 2006.
- [61] P. Patrício, C. R. Leal, J. Duarte, and C. Januário. Rheology of the cytoskeleton as a fractal network. *Physical Review E*, 92(4) :040702, 2015.
- [62] Dimitrije Stamenovic. Cell Mechanics : Two regimes, maybe three? *Nature Materials*, 5 :597–598, 2006.

- [63] Nicolas Desprat, Alain Richert, Jacqueline Simeon, and Atef Asnacios. Creep function of a single living cell. *Biophysical journal*, 88(3) :2224–2233, 2005.
- [64] Peter Sollich, Francois Lequeux, Pascal Hebraud, and Michael E Cates. Rheology of Soft Glassy Materials. *Physical Review Letters*, 78(10) :2020(4), 1997.
- [65] Peter Sollich. Rheological constitutive equation for model of soft glassy materials. *Physical Review E*, 58(1) :738, 1998.
- [66] Ben Fabry, Geoffrey Maksym, James Butler, Michael Glogauer, Daniel Navajas, and Jeffrey Fredberg. Scaling the Microrheology of Living Cells. *Physical Review Letters*, 87(14) :148102, sep 2001.
- [67] Ben Fabry, Geoffrey N. Maksym, James P. Butler, Michael Glogauer, Daniel Navajas, Nathan A. Taback, Emil J. Millet, and Jeffrey J. Fredberg. Time scale and other invariants of integrative mechanical behavior in living cells. *Physical Review E*, 68(4) :041914, 2003.
- [68] Rachel E Laudadio, Emil J Millet, Ben Fabry, Steven S An, James P Butler, and Jeffrey J Fredberg. Rat airway smooth muscle cell during actin modulation : rheology and glassy dynamics. *American journal of physiology. Cell physiology*, 289(6) :C1388–95, 2005.
- [69] Martial Balland, Alain Richert, and François Gallet. The dissipative contribution of myosin II in the cytoskeleton dynamics of myoblasts. *European Biophysics Journal*, 34(3) :255–261, 2005.
- [70] N Wang, K Naruse, D Stamenović, J J Fredberg, S M Mijailovich, I M Tolić-Nørrelykke, T Polte, R Mannix, and D E Ingber. Mechanical behavior in living cells consistent with the tensegrity model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(14) :7765–7770, 2001.
- [71] Dimitrije Stamenovic, Béla Suki, Ben Fabry, Ning Wang, and Jeffrey J Fredberg. Rheology of airway smooth muscle cells is associated with cytoskeletal contractile stress. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 96(5) :1600–1605, 2004.
- [72] Philip Kollmannsberger and Ben Fabry. Active soft glassy rheology of adherent cells. *Soft Matter*, 5(9) :1771, 2009.
- [73] Xavier Trepast, Linhong Deng, Steven S. An, Daniel Navajas, Daniel J. Tschumperlin, William T. Gerthoffer, James P. Butler, and Jeffrey J. Fredberg. Universal physical responses to stretch in the living cell. *Nature*, 447(7144) :592–595, 2007.
- [74] Pablo Fernández, Pramod a Pullarkat, and Albrecht Ott. A master relation defines the nonlinear viscoelasticity of single fibroblasts. *Biophysical journal*, 90(10) :3796–3805, 2006.
- [75] Philip Kollmannsberger, Claudia Tanja Mierke, and Ben Fabry. Nonlinear viscoelasticity of adherent cells is controlled by cytoskeletal tension. *Soft Matter*, 7(7) :3127, 2011.
- [76] Malcom S Steinberg. Reconstruction of tissues by dissociated cells. *Science*, 141 :401, 1963.
- [77] Philip L Townes and Johannes Holtfreter. Directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells. *The Journal of Experimental Zoology*, 128(1) :53–120, 1955.
- [78] Ramsey a Foty and Malcolm S Steinberg. The differential adhesion hypothesis : a direct evaluation. *Developmental biology*, 278(1) :255–63, feb 2005.
- [79] Nicolas Borghi and W James Nelson. Intercellular adhesion in morphogenesis : molecular and biophysical considerations. *Current topics in developmental biology*, 89(09) :1–32, jan 2009.
- [80] Albert K Harris. Is cell sorting caused by differences in the work of intercellular adhesion ? A critique of the steinberg hypothesis. *Journal of Theoretical Biology*, 61(2) :267–285, sep 1976.

- [81] Jeremy B a Green. Sophistications of cell sorting. *Nature cell biology*, 10(4) :375–377, 2008.
- [82] G W Brodland. The Differential Interfacial Tension Hypothesis (DITH) : A Comprehensive Theory for the Self-Rearrangement of Embryonic Cells and Tissues. *Journal of Biomechanical Engineering*, 124(2) :188, 2002.
- [83] Jean-Léon Maître, Hélène Berthoumieux, Simon Frederik Gabriel Krens, Guillaume Salbreux, Frank Jülicher, Ewa Paluch, and Carl-Philipp Heisenberg. Adhesion functions in cell sorting by mechanically coupling the cortices of adhering cells. *Science (New York, N.Y.)*, 338(6104) :253–6, oct 2012.
- [84] M Lisa Manning, Ramsey a Foty, Malcolm S Steinberg, and Eva-Maria Schoetz. Coaction of intercellular adhesion and cortical tension specifies tissue surface tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(28) :12517–22, jul 2010.
- [85] Tomita Vasilica Stirbat, Abbas Mgharbel, Selena Bodennec, Karine Ferri, Hichem C Mertani, Jean-Paul Rieu, and Hélène Delanoë-Ayari. Fine tuning of tissues' viscosity and surface tension through contractility suggests a new role for α -catenin. *PloS one*, 8(2) :e52554, jan 2013.
- [86] Stéphane Douezan, Karine Guevorkian, Randa Naouar, Sylvie Dufour, Damien Cuvelier, and Françoise Brochard-Wyart. Spreading dynamics and wetting transition of cellular aggregates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(18) :7315–7320, may 2011.
- [87] Philippe Marmottant, Abbas Mgharbel, Jos Käfer, Benjamin Audren, Jean-Paul Rieu, Jean-Claude Vial, Boudewijn van der Sanden, Athanasius F M Marée, François Graner, and Hélène Delanoë-Ayari. The role of fluctuations and stress on the effective viscosity of cell aggregates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(41) :17271–5, oct 2009.
- [88] Karine Guevorkian, Marie-Josée Colbert, Mélanie Durth, Sylvie Dufour, and Françoise Brochard-Wyart. Aspiration of Biological Viscoelastic Drops. *Physical Review Letters*, 104(21) :218101, may 2010.
- [89] H M Phillips and M S Steinberg. Embryonic tissues as elasticoviscous liquids I. Rapid and slow shape changes in centrifugated cell aggregates. *Journal Cell Science*, 30 :1–20, 1978.
- [90] G Forgacs, R a Foty, Y Shafir, and M S Steinberg. Viscoelastic properties of living embryonic tissues : a quantitative study. *Biophysical journal*, 74(5) :2227–34, may 1998.
- [91] H M Phillips, S Steinberg, and B H Lipton. Embryonic Tissues as Elasticoviscous Liquids. II. Direct Evidence for Celle Slippage in centrifuged Aggregates. *Developmental biology*, 59 :124–134, 1977.
- [92] Abbas Mgharbel. *Physique et rhéologie des agrégats cellulaires*. PhD thesis, Université de Lyon, 2009.
- [93] Sham Tlili. *Biorhéologie in vitro : de la cellule au tissu*. PhD thesis, Université Paris Diderot, 2015.
- [94] Davide Ambrosi and Luigi Preziosi. Cell adhesion mechanisms and stress relaxation in the mechanics of tumours. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology*, 8 :397–413, 2009.
- [95] L. Preziosi, D. Ambrosi, and C. Verdier. An elasto-visco-plastic model of cell aggregates. *Journal of Theoretical Biology*, 262(1) :35–47, 2010.
- [96] Karoly Jakab, Brook Damon, Françoise Marga, Octavian Doaga, Vladimir Mironov, Ioan Kosztin, Roger Markwald, and Gabor Forgacs. Relating cell and tissue mechanics : Implications and applications. *Developmental Dynamics*, 237(9) :2438–2449, 2008.

- [97] Jonas Ranft, Markus Basan, Jens Elgeti, Jean-François Joanny, Jacques Prost, and Frank Jülicher. Fluidization of tissues by cell division and apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(49) :20863–20868, 2010.
- [98] Karine Guevorkian, David Gonzalez-Rodriguez, Camille Carlier, Sylvie Dufour, and Françoise Brochard-Wyart. Mechanosensitive shivering of model tissues under controlled aspiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(33) :13387–92, aug 2011.
- [99] Morgan Delarue, Fabien Montel, Ouriel Caen, Jens Elgeti, Jean-Michel Siaugue, Danijela Vignjevic, Jacques Prost, Jean-François Joanny, and Giovanni Cappello. Mechanical Control of Cell flow in Multicellular Spheroids. *Physical Review Letters*, 110(13) :138103, mar 2013.
- [100] Sham Tlili, Cyprien Gay, Francois Graner, Philippe Marcq, François Molino, and Pierre Saramito. Mechanical formalism for tissue dynamics. *European Physical Journal E*, 6(1) :23, 2015.
- [101] Robyn H. Pritchard, Yan Yan Shery Huang, and Eugene M. Terentjev. Mechanics of biological networks : from the cell cytoskeleton to connective tissue. *Soft Matter*, 10(12) :1864, 2014.
- [102] C. Verdier. Rheological Properties of Living Materials. From Cells to Tissues. *Journal of Theoretical Medicine*, 5(2) :67–91, 2003.
- [103] J Hildebrandt. COMPARISON OF MATHEMATICAL MODELS FOR CAT LUNG AND VISCOELASTIC BALLOON DERIVED BY LAPLACE TRANSFORM METHODS FROM PRESSURE- VOLUME DATA. *Bulletin of Mathematical Biophysics*, 31 :651–667, 1969.
- [104] B Suki, a L Barabási, and K R Lutchen. Lung tissue viscoelasticity : a mathematical framework and its molecular basis. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 76(6) :2749–2759, 1994.
- [105] S. Nicolle, P. Vezin, and J. F. Palierne. A strain-hardening bi-power law for the nonlinear behaviour of biological soft tissues. *Journal of Biomechanics*, 43(5) :927–932, 2010.
- [106] Marion Geerligs, Gerrit W M Peters, Paul A J Ackermans, Cees W J Oomens, and Frank P T Baaijens. Linear viscoelastic behavior of subcutaneous adipose tissue. *Biorheology*, 45(6) :677–688, 2008.
- [107] H M Phillips and M S Steinberg. Equilibrium measurements of embryonic chick cell adhesiveness. I. Shape equilibrium in centrifugal fields. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 64(1) :121–7, sep 1969.
- [108] Ali Kalantarian, Hiromasa Ninomiya, Sameh M I Saad, Robert David, Rudolf Winklbauer, and a Wilhelm Neumann. Axisymmetric drop shape analysis for estimating the surface tension of cell aggregates by centrifugation. *Biophysical journal*, 96(4) :1606–16, feb 2009.
- [109] Ramsey A Foty, Gabor Forgacs, Cathie M Pflieger, and Malcom S Steinberg. Liquid properties of embryonic tissues : measurement of interfacial tensions. *Physical Review Letters*, 72(14), 1994.
- [110] Abbas Mgharbel, Hélène Delanoë-Ayari, and Jean-Paul Rieu. Measuring accurately liquid and tissue surface tension with a compression plate tensiometer. *HFSP journal*, 3(3) :213–21, jun 2009.
- [111] Kaoru Sugimura, François Graner, and Pierre-François Lenne. Measuring forces and stresses in situ in living tissues. *Development*, 143 :186–196, 2015.
- [112] Stella Alimperti, Pedro Lei, Yuan Wen, Jun Tian, Andrew M Campbell, and Stelios T Andreadis. Serum-free spheroid suspension culture maintains mesenchymal stem cell proliferation and differentiation potential. *Biotechnology progress*, pages 19–21, mar 2014.

- [113] Thomas J Bartosh, Joni H Ylöstalo, Arezoo Mohammadipoor, Nikolay Bazhanov, Katie Coble, Kent Claypool, Ryang Hwa Lee, Hosoon Choi, and Darwin J Prockop. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their anti-inflammatory properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(31) :13724–13729, 2010.
- [114] A Nagafuchi, Y Shirayoshi, K Okazaki, K Yasuda, and M Takeichi. Transformation of cell adhesion properties by exogenously introduced E-cadherin cDNA. *Nature*, 329(6137) :341–343, 1987.
- [115] Francois Mazuel, Myriam Reffay, Vicard Du, Jean-claude Bacri, Jean-paul Rieu, and Claire Wilhelm. Magnetic Flattening of Stem-Cell Spheroids Indicates a Size-Dependent Elastocapillary Transition. *Physical Review Letters*, 114(9) :098105(5), 2015.
- [116] Pascale Aussillous and David Quéré. Properties of liquid marbles. *Proceedings of the Royal Society A : Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 462(2067) :973–999, mar 2006.
- [117] L Landau and E Lifchitz. *Théorie de l'élasticité*. Mir edition, 1967.
- [118] Samuel C W Tan, Wen X Pan, Gang Ma, Ning Cai, Kam W Leong, and Kin Liao. Viscoelastic behaviour of human mesenchymal stem cells. *BMC cell biology*, 9 :40, jan 2008.
- [119] Kelly Aubertin, Stéphanie Bonneau, Amanda K a Silva, Jean-Claude Bacri, François Gallet, and Claire Wilhelm. Impact of photosensitizers activation on intracellular trafficking and viscosity. *PLoS one*, 8(12) :e84850, jan 2013.
- [120] Philip Kollmannsberger. *Nonlinear microrheology of living cells*. PhD thesis, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, 2009.
- [121] W H Goldmann and R M Ezzell. Viscoelasticity in wild-type and vinculin-deficient (5.51) mouse F9 embryonic carcinoma cells examined by atomic force microscopy and rheology. *Experimental cell research*, 226(1) :234–237, 1996.
- [122] Claudia Tanja Mierke, Philip Kollmannsberger, Daniel Paranhos Zitterbart, James Smith, Ben Fabry, and Wolfgang Heinrich Goldmann. Mechano-coupling and regulation of contractility by the vinculin tail domain. *Biophysical journal*, 94(2) :661–670, 2008.
- [123] Tore Skotland, Per Christian Sontum, and Inger Oulie. In vitro stability analyses as a model for metabolism of ferromagnetic particles (Clariscan), a contrast agent for magnetic resonance imaging. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28(2) :323–329, 2002.
- [124] Ali S. Arbab, Lindsey B. Wilson, Parwana Ashari, Elaine K. Jordan, Bobbi K. Lewis, and Joseph A. Frank. A model of lysosomal metabolism of dextran coated superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles : Implications for cellular magnetic resonance imaging. *NMR in Biomedicine*, 18(6) :383–389, 2005.
- [125] Michael Lévy, Florence Lagarde, Valentin-Adrian Maraloiu, Marie-Geneviève Blanchin, François Gendron, Claire Wilhelm, and Florence Gazeau. Degradability of superparamagnetic nanoparticles in a model of intracellular environment : follow-up of magnetic, structural and chemical properties. *Nanotechnology*, 21(39) :395103, oct 2010.
- [126] Michael Levy, Nathalie Luciani, Damien Alloyeau, Dan Elgrabli, Vanessa Deveaux, Christine Pechoux, Sophie Chat, Guillaume Wang, Nidhi Vats, François Gendron, Cécile Factor, Sophie Lotersztajn, Alain Luciani, Claire Wilhelm, and Florence Gazeau. Long term in vivo biotransformation of iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*, 32(16) :3988–99, jun 2011.
- [127] Jelena Kolosnjaj-tabi, Yasir Javed, Jeanne Volatron, Dan Elgrabli, Iris Marangon, Giammarino Pugliese, Benoit Caron, Albert Figuerola, Nathalie Luciani, Teresa Pellegrino, Damien Alloyeau, and Florence Gazeau. The One Year Fate of Iron Oxide Coated Gold Nanoparticles in Mice. *ACS nano*, 2015.

- [128] L naic Lartigue, Damien Alloyeau, Jelena Kolosnjaj-Tabi, Yasir Javed, Pablo Guardia, Andreas Riedinger, Christine P choux, Teresa Pellegrino, Claire Wilhelm, and Florence Gazeau. Biodegradation of iron oxide nanocubes : high-resolution in situ monitoring. *ACS nano*, 7(5) :3939–52, may 2013.
- [129] Yasir Javed, L naic Lartigue, Pierre Hugounenq, Quoc Lam Vuong, Yves Gossuin, Rana Bazzi, Claire Wilhelm, Christian Ricolleau, Florence Gazeau, and Damien Alloyeau. Biodegradation Mechanisms of Iron Oxide Monocrystalline Nanoflowers and Tunable Shield Effect of Gold Coating. *Small*, pages 1–13, may 2014.
- [130] Luc a Guti rrez, Sonia Romero, Gustavo B. da Silva, Roc o Costo, Maria D. Vargas, C lia M. Ronconi, Carlos J. Serna, Sabino Veintemillas-Verdaguer, and Mar a del Puerto Morales. Degradation of magnetic nanoparticles mimicking lysosomal conditions followed by AC susceptibility. *Biomedical Engineering / Biomedizinische Technik*, 60(JUNE), 2015.
- [131] R. Weissleder, D. D. Stark, B. L. Engelstad, B. R. Bacon, C. C. Compton, D. L. White, P. Jacobs, and J. Lewis. Superparamagnetic iron oxide : Pharmacokinetics and toxicity. *American Journal of Roentgenology*, 152(1) :167–173, 1989.
- [132] D. Pouliquen, J. J. Le Jeune, R. Perdrisot, A. Ermias, and P. Jallet. Iron oxide nanoparticles for use as an MRI contrast agent : Pharmacokinetics and metabolism. *Magnetic Resonance Imaging*, 9(3) :275–283, 1991.
- [133] Stefaan J. Soenen, Wolfgang J. Parak, Joanna Rejman, and Bella Manshian. (Intra)Cellular Stability of Inorganic Nanoparticles : Effects on Cytotoxicity, Particle Functionality, and Biomedical Applications. *Chemical Reviews*, page 150202072049004, 2015.
- [134] Vanessa Valdiglesias, G zde Kilic, Carla Costa, Natalia Fernandez-Bertolez, Eduardo Pasaro, Joa Teixeira, O Paulo, and Blanca Laffon. Effects of iron oxide nanoparticles : Cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 56(2) :125–148, 2015.
- [135] Stefaan J H Soenen and Marcel De Cuyper. Assessing iron oxide nanoparticle toxicity in vitro : current status and future prospects. *Nanomedicine (London, England)*, 5(8) :1261–1275, 2010.
- [136] S Wagner, J Schnorr, H Pilgrimm, B Hamm, and M Taupitz. Monomer-coated very small superparamagnetic iron oxide particles as contrast medium for magnetic resonance imaging - Preclinical in vivo characterization. *Investigative Radiology*, 37(4) :167–177, 2002.
- [137] B Ankamwar, T C Lai, J H Huang, R S Liu, M Hsiao, C H Chen, and Y K Hwu. Biocompatibility of Fe(3)O(4) nanoparticles evaluated by in vitro cytotoxicity assays using normal, glia and breast cancer cells. *Nanotechnology*, 21(7) :75102, 2010.
- [138] Kivilcim Buyukhatipoglu and Alisa Morss Clyne. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles change endothelial cell morphology and mechanics via reactive oxygen species formation. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 96 A(1) :186–195, 2011.
- [139] Hoe Suk Kim, YoonSeok Choi, In Chan Song, and Woo Kyung Moon. Magnetic resonance imaging and biological properties of pancreatic islets labeled with iron oxide nanoparticles. *NMR in Biomedicine*, 22(8) :852–856, 2009.
- [140] Stefaan J H Soenen, Nele Nuytten, Simon F. De Meyer, Stefaan C. De Smedt, and Marcel De Cuyper. High intracellular iron oxide nanoparticle concentrations affect cellular cytoskeleton and focal adhesion kinase-mediated signaling. *Small*, 6(7) :832–842, 2010.
- [141] Jungwoo Lee, Daniel Lilly, Christopher Doty, Paul Podsiadlo, and Nicholas Kotov. In vitro toxicity testing of nanoparticles in 3D cell culture. *Small*, 5(10) :1213–1221, 2009.

- [142] Neus Feliu, Dominic Docter, Markus Heine, Pablo del Pino, Sumaira Ashraf, Jelena Kolosnjaj-Tabi, Paolo Macchiaroni, Peter Nielsen, Damien Alloyeau, Florence Gazeau, Roland H. Stauber, and Wolfgang J. Parak. In vivo degeneration and the fate of inorganic nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.*, 5 :33–37, 2016.
- [143] Lin Yang, Huijuan Kuang, Wanyi Zhang, Zoraida P. Aguilar, Yonghua Xiong, Weihua Lai, Hengyi Xu, and Hua Wei. Size dependent biodistribution and toxicokinetics of iron oxide magnetic nanoparticles in mice. *Nanoscale*, 7(2) :625–636, 2015.
- [144] Stefaan J H Soenen, Uwe Himmelreich, Nele Nuytten, and Marcel De Cuyper. Cytotoxic effects of iron oxide nanoparticles and implications for safety in cell labelling. *Biomaterials*, 32(1) :195–205, 2011.
- [145] Zuzana Magdolenova, Martina Drlickova, Kristi Henjum, Elise Rundén-Pran, Jana Tulinska, Dagmar Bilanicova, Giulio Pojana, Alena Kazimirova, Magdalena Barancokova, Miroslava Kuricova, Aurelia Liskova, Marta Staruchova, Fedor Ciampor, Ivo Vavra, Yolanda Lorenzo, Andrew Collins, Alessandra Rinna, Lise Fjellsbø, Katarina Volkovova, Antonio Marcomini, Mahmood Amiry-Moghaddam, and Maria Dusinska. Coating-dependent induction of cytotoxicity and genotoxicity of iron oxide nanoparticles. *Nanotoxicology*, 5390(May 2016) :1–13, 2013.
- [146] a. Ruiz, L. Gutiérrez, P. R. Cáceres-Vélez, D. Santos, S. B. Chaves, M. L. Fascineli, M. P. Garcia, R. B. Azevedo, and M. P. Morales. Biotransformation of magnetic nanoparticles as a function of coating in a rat model. *Nanoscale*, 7(39) :16321–16329, 2015.
- [147] V. Escamilla-Rivera, M. Uribe-Ramírez, S. González-Pozos, O. Lozano, S. Lucas, and A. De Vizcaya-Ruiz. Protein corona acts as a protective shield against Fe₃O₄-PEG inflammation and ROS-induced toxicity in human macrophages. *Toxicology Letters*, 240(1) :172–184, 2016.
- [148] Hanna L. Karlsson, Johanna Gustafsson, Pontus Cronholm, and Lennart Möller. Size-dependent toxicity of metal oxide particles-A comparison between nano- and micrometer size. *Toxicology Letters*, 188(2) :112–118, 2009.
- [149] Cole P. Anderson, Macy Shen, Richard S. Eisenstein, and Elizabeth A. Leibold. Mammalian iron metabolism and its control by iron regulatory proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1823(9) :1468–1483, 2012.
- [150] Paolo Arosio, Rosaria Ingrassia, and Patrizia Cavadini. Ferritins : A family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1790(7) :589–599, 2009.
- [151] Elizabeth C. Theil. Ferritin protein nanocages use ion channels, catalytic sites, and nucleation channels to manage iron/oxygen chemistry. *Current Opinion in Chemical Biology*, 15(2) :304–311, 2011.
- [152] Kouros Honarmand Ebrahimi, Peter Leon Hagedoorn, and Wilfred R. Hagen. Unity in the biochemistry of the iron-storage proteins ferritin and bacterioferritin. *Chemical Reviews*, 115(1) :295–326, 2015.
- [153] Natividad Ga, Marcelo Ceoli, Miguel Clemente-leo, Miguel Lo, Jose J Calvino, Odile Ste, and M Domi. Comparative Structural and Chemical Studies of Ferritin. *Journal of the American Chemical Society*, 130 :8062–8068, 2008.
- [154] Edyta Pawelczyk, Ali S. Arbab, Sunil Pandit, Elbert Hu, and Joseph A. Frank. Expression of transferrin receptor and ferritin following ferumoxides-protamine sulfate labeling of cells : Implications for cellular magnetic resonance imaging. *NMR in Biomedicine*, 19(5) :581–592, 2006.

- [155] Dorota A Kedziorek, Naser Muja, Piotr Walczak, Jesus Ruiz-cabello, Assaf A Gilad, Chunfa C Jie, and Jeff W M Bulte. Gene Expression profiling reveals early cellular responses to intracellular magnetic labelling with superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Magn Reson Med*, 63(4) :1031–1043, 2010.
- [156] Jing Li Gu, Hai Fei Xu, Ye Hua Han, Wei Dai, Wei Hao, Chun Yu Wang, Ning Gu, Hai Yan Xu, and Ji Min Cao. The internalization pathway, metabolic fate and biological effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in the macrophage-like RAW264.7 cell. *Science China Life Sciences*, 54(9) :793–805, 2011.
- [157] Michaela C. Hohnholt, Mark Geppert, and Ralf Dringen. Treatment with iron oxide nanoparticles induces ferritin synthesis but not oxidative stress in oligodendroglial cells. *Acta Biomaterialia*, 7(11) :3946–3954, 2011.
- [158] Mark Geppert, Michaela C. Hohnholt, Sylvia Nürnberger, and Ralf Dringen. Ferritin up-regulation and transient ROS production in cultured brain astrocytes after loading with iron oxide nanoparticles. *Acta Biomaterialia*, 8(10) :3832–3839, 2012.
- [159] Diane M. Ward and Jerry Kaplan. Ferroportin-mediated iron transport : Expression and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1823(9) :1426–1433, 2012.
- [160] Mimi C. Sammarco, Scott Ditch, Ayan Banerjee, and Ed Grabczyk. Ferritin L and H subunits are differentially regulated on a post-transcriptional level. *Journal of Biological Chemistry*, 283(8) :4578–4587, 2008.
- [161] G Ahmadi. Drag Force and Drag Coefficient. In *ME Clarkson University*, number 2, pages 1–11.
- [162] Sylvain Loubéry, Claire Wilhelm, Ilse Hurbain, Sophie Neveu, Daniel Louvard, and Evelyne Coudrier. Different microtubule motors move early and late endocytic compartments. *Traffic*, 9(4) :492–509, 2008.
- [163] Amanda K Andriola Silva, Riccardo Di Corato, Florence Gazeau, Teresa Pellegrino, and Claire Wilhelm. Magnetophoresis at the nanoscale : tracking the magnetic targeting efficiency of nanovectors. *Nanomedicine*, pages 1–15, 2012.
- [164] François Mazuel, Ana Espinosa, Nathalie Luciani, Myriam Reffay, Rémi Le Borgne, Laurence Motte, Karine Desboeufs, Aude Michel, Teresa Pellegrino, Yoann Lalatonne, and Claire Wilhelm. Massive Intracellular Biodegradation of Iron Oxide Nanoparticles Evidenced Magnetically at Single Endosome and Tissue Levels. *ACS Nano*, page acsnano.6b02876, 2016.
- [165] Amanda K Andriola Silva, Riccardo Di Corato, Teresa Pellegrino, Sophie Chat, Giammarino Pugliese, Nathalie Luciani, Florence Gazeau, and Claire Wilhelm. Cell-derived vesicles as a bioplat-form for the encapsulation of theranostic nanomaterials. *Nanoscale*, 5(23) :11374–84, 2013.
- [166] Pablo Guardia, Andreas Riedinger, Simone Nitti, Giammarino Pugliese, Sergio Marras, Alessandro Genovese, Maria Elena Materia, Christophe Lefevre, Liberato Manna, and Teresa Pellegrino. One pot synthesis of monodisperse water soluble iron oxide nanocrystals with high values of the specific absorption rate. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(28) :4426, 2014.
- [167] Heng Yu, Min Chen, Philip M Rice, Shan X Wang, and R L White. Dumbbell-like Bifunctional Au Fe₃O₄ Nanoparticles. *Nano letters*, 5(2) :379–382, 2005.
- [168] Teresa Pellegrino, Liberato Manna, Stefan Kudera, Tim Liedl, Dmitry Koktysh, Andrey L. Rogach, Simon Keller, Joachim Rädler, Giovanni Natile, and Wolfgang J. Parak. Hydrophobic nanocrystals coated with an amphiphilic polymer shell : A general route to water soluble nanocrystals. *Nano Letters*, 4(4) :703–707, 2004.

- [169] Ana Espinosa, M Bugnet, Guillaume Radke, Sophie Neveu, Gianluigi Botton, Claire Wilhelm, and Ali Abou-Hassan. Can magneto-plasmonic nanohybrids efficiently combine photothermia with magnetic hyperthermia ? *Nanoscale*, 7(45) :18872–18877, 2015.
- [170] Pedro Quaresma, Inês Osório, Gonçalo Dória, Patrícia a. Carvalho, André Pereira, Judith Langer, João Pedro Araújo, Isabel Pastoriza-Santos, Luis M. Liz-Marzán, Ricardo Franco, Pedro V. Baptista, and Eulália Pereira. Star-shaped magnetite@gold nanoparticles for protein magnetic separation and SERS detection. *RSC Advances*, 4(8) :3659, 2014.
- [171] Pierre Hugounenq, Michael Levy, Damien Alloyeau, Emmanuelle Dubois, Christian Ricolleau, Claire Wilhelm, Florence Gazeau, and Rana Bazzi. Iron Oxide Monocrystalline Nano flowers for Highly Efficient Magnetic Hyperthermia. *the journal of physical chemistry C*, 116 :15702–15712, 2012.

Sujet : Agrégats multicellulaires magnétiques: mécanique des tissus et biodégradation des nanomatériaux

Résumé : Les nanoparticules d'oxyde de fer ont récemment été envisagées comme outils pour l'ingénierie tissulaire. Elles sont internalisées par les cellules qui deviennent alors magnétiques. Des forces magnétiques peuvent ainsi être appliquées à distance sur ces cellules pour contrôler leur organisation spatiale et temporelle, et former un tissu. Ces applications posent la question du devenir des nanoparticules, qui conditionne in fine leur utilisation clinique. Ce travail s'inscrit dans ce cadre et comporte deux axes.

La première partie traite de l'étude des propriétés mécaniques et rhéologiques de tissus biologiques modèles, les agrégats multicellulaires. Une combinaison de méthodes magnétiques est proposée pour fabriquer et stimuler des tissus magnétiques de taille et de forme contrôlées. Ces agrégats magnétiques sont soumis à distance à des contraintes magnétiques d'écrasement. L'étude de leur déformation permet d'explorer des caractéristiques statiques et dynamiques rarement étudiées à l'échelle tissulaire (tension de surface, loi puissance, non linéarité).

La deuxième partie se concentre sur l'évolution à moyen terme des nanoparticules dans leur environnement tissulaire, au cœur des agrégats. En combinant ce tissu modèle avec des méthodes de quantification magnétique, nous avons pu mettre en évidence une dégradation massive d'origine endosomale, sans pour autant impacter de manière importante l'homéostasie du fer. De plus, le modèle tissulaire mis en place permet d'étudier la biodégradation intracellulaire de n'importe quel type de nanoparticules. Nous l'avons testé avec des nano-architectures plus complexes: nanocubes, nanodimers, ou nanoparticules magnéto-plasmoniques.

Mots clés : Nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer, agrégats multicellulaires, tension de surface des tissus, rhéologie des tissus, loi puissance, biodégradation, endosome, homéostasie du fer

Subject : Magnetic multicellular aggregates: tissues mechanics and nanomaterials biodegradation

Abstract : Iron oxide nanoparticles are promising candidates for applications in nanomedicine (contrast agents, vectors). They were also recently considered as a powerful tool for tissue engineering. Cells, magnetized through nanoparticles internalization, can be organized in space and time thanks to remote magnetic forces. For all those applications the nanoparticles fate inside the cells remains a key issue concerning the final clinical use.

The first part of this work focuses on the study of the mechanical and rheological properties of biological tissue models, the multicellular aggregates. An original magnetic molding method and two different experimental setups were developed to produce aggregates with controlled shapes and sizes, to measure their surface tension and to evidence their power law and non linear behavior.

In the second part, we investigate the medium term fate of iron oxide nanoparticles in stem cells forming a spheroid as a model tissue. We reveal a massive endosomal degradation. The set of methods and spheroid model we propose allow a comprehensive and quantitative follow up of the biodegradation of any nanomaterials. This was illustrated by investigating the degradation of nanomaterials with more complex nano-architectures (nanocubes, nanodimers) and assessing the efficiency of a protection strategy to modulate the biodegradation.

Keywords : Iron oxide magnetic nanoparticles, multicellular aggregate, tissue surface tension, tissue rheology, power law, biodegradation, endosome, iron homeostasis