



**HAL**  
open science

# Impact d'une perturbation mécanique ou photo-chimique sur le trafic intracellulaire

Kelly Aubertin

► **To cite this version:**

| Kelly Aubertin. Impact d'une perturbation mécanique ou photo-chimique sur le trafic intracellulaire.  
| Biophysique [physics.bio-ph]. Université paris Diderot, 2014. Français. NNT: . tel-01611470

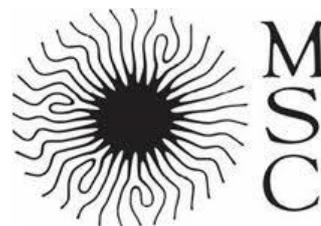
**HAL Id: tel-01611470**

**<https://theses.hal.science/tel-01611470v1>**

Submitted on 5 Oct 2017

**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.



**Thèse de doctorat**

Spécialité Physique

**Impact d'une perturbation mécanique ou photo-chimique  
sur le trafic intracellulaire**

présentée par

**Kelly AUBERTIN**

pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université Paris Diderot  
Paris VII - Sorbonne Paris Cité**

soutenue le 10 juin 2014 devant le jury composé de

Hervé	MOHRBACH	Président du jury
Gladys	MASSIERA	Rapporteur
Zoher	GUEROUI	Rapporteur
Lina	BEZDETNYAYA-BOLOTINE	Examineur
François	GALLET	Directeur de thèse
Claire	WILHELM	Co-directeur de thèse







# Remerciements

La thèse de doctorat est un passage obligatoire pour accéder au monde de la recherche. C'est un exercice difficile qui demande beaucoup d'énergie, de patience et de persévérance. Malgré tout, grâce à toutes les personnes que j'ai pu rencontrer, qui m'ont soutenues, encouragées, ce passage de ma vie s'est transformé en une aventure agréable et inoubliable.

Je souhaite remercier l'ensemble des membres de mon jury pour avoir accepté de juger mes travaux de thèse : Hervé Mohrbach qui m'a soutenue depuis notre rencontre lors de ma licence à Metz et sans qui je ne me serais jamais lancée dans cette aventure. Je suis très heureuse que tu ais accepté de présider le jury de thèse ; Gladys Massiera et Zoher Guéroui, qui ont accepté la dure tâche de rapporteurs ; Lina Bolotine, d'avoir apporté un œil d'expert en ce qui concerne la photothérapie. Ils ont tous posé des questions très pertinentes lors de la soutenance et leur intervention a donné lieu à une vraie discussion scientifique.

Je remercie Loïc Auvray, directeur du laboratoire de m'avoir accueillie au sein du laboratoire Matière et systèmes complexes, dont la pluridisciplinarité en fait un lieu propice à l'épanouissement de la culture scientifique.

Je remercie également Carole Philippe-Barache, Nadine Beyer, Lucie Bouchue, Sarah Semhoun et Ludovic Vezien qui ont toujours été disponibles pour les tâches administratives. Je remercie les techniciens en mécanique et informatique, et en particulier Laurent Réa et Jean Hubert qui ont toujours des idées pour résoudre les nombreux petits soucis du quotidien d'un doctorant.

Je voudrais également remercier l'école doctorale Matière condensée et interfaces (ED 518) et en particulier le directeur, Thomas Coudreau et la secrétaire, Joël Taieb, pour leur disponibilité.

Mes remerciements les plus sincères vont bien évidemment à mes deux directeurs de thèse : François Gallet et Claire Wilhelm. Vous avez su faire preuve de qualités scientifiques et humaines exceptionnelles tout au long de ma thèse.

François, je me souviendrai toujours de la première fois où nous avons fait des microtubules. C'était un plaisir de découvrir les protocoles de système *in vitro* avec toi. Par la suite, j'ai beaucoup apprécié ton soutien pendant les grosses journées de manipes, ainsi que nos discussions et tes encouragements qui ont fait ressortir ta rigueur et ta passion pour la physique.

Claire, ta gentillesse, ton enthousiasme, ton énergie et surtout ton efficacité ont fait de toi un modèle pour moi. Le temps passé avec toi en salle de manipes était un vrai bonheur, même lors des moments de doutes.

La porte de votre bureau était toujours ouverte lorsque j'avais besoin de vous. J'ai vraiment eu beaucoup de chance lorsque vous avez accepté d'encadrer ma thèse. Je suis très heureuse de vous avoir eu comme directeurs de thèse.

Je voudrais remercier les personnes internes au laboratoire qui ont participé directement à la réalisation de ces travaux : Julien Tailleux, pour ta participation aux nombreuses discussions sur la partie mécanique et pour ton soutien lors des moments de stress ; Nathalie Luciani pour ton regard de biologiste sur la partie vésiculation, ainsi que pour ton écoute et tes conseils ; Amanda Silva Brun Graeppi pour tes connaissances et tes idées pour les parties concernant la photothérapie et pour ta gentillesse sans limite.

Je remercie également Stéphanie Bonneau (Laboratoire Jean Perrin) pour sa participation aux travaux sur la photothérapie, Cécile Leduc (Institut Pasteur) pour son aide à déchiffrer et à améliorer les protocoles de systèmes *in vitro* et Christine Ménager (Laboratoire Phénix) pour nous avoir fourni les nanoparticules magnétiques.

J'ai eu la chance d'appartenir à deux équipes différentes au sein du laboratoire : l'équipe bio-fluidique et l'équipe physique du vivant.

Je voudrais en particulier remercier Florence Gazeau et Myriam Reffay, dont la gentillesse et les conseils (scientifiques, culinaires, ...) étaient toujours au rendez-vous.

Je remercie également la "team CellMech" avec qui les discussions ont toujours été très intéressantes et stimulantes : Alain Richert, Sylvie Hénon, Atef Asnacios, Pauline Durand, Elizabeth Charrier, Lorraine Montel, Fabien Montel, Cyprien Gay,...

Je remercie également mes collègues de paillasse qui sont, pour la plupart, devenus des amis : Ana Espinosa, Vicard Du, Iris Marangon, François Mazuel, Riccardo Di Corato, Jelena Kolosnjaj-Tabi, Delphine Fayol, Lénaïc Lartigue et Damien Robert.

Je voudrais également remercier mes collègues de bureau qui ont supporté près d'un million de clics nécessaires au traitement des images et avec qui c'était un plaisir de partager les petits-déjeuners du vendredi matin : Clément Vulin, Alexandre Solon, Timothée Jamin, Artémis Llamosi, Jean-Baptiste Lugagne, Adrien Hallou, Zoran Marinkovic, Hans Bodart sans oublier les anciens, Agnès Miremont, Pierre Bohec, Félix Lebois et Jimmy LeDigabel.

Un grand merci à mes amies Hawa Racine Thiam, Laura Picas, Coline Prévost et Lauriane Marchand. C'était un plaisir de pouvoir discuter de nos problèmes expérimentaux ou de se changer les idées au yoga, à la zumba ou pendant nos soirées "girls".

Claire Flausse et Cédric Kremer ont également leur place ici. J'espère qu'ils n'ont pas regretté de m'avoir demandé comment avançait ma thèse lorsque je m'aventurais à leur expliquer mes expériences. Ils ont écouté avec attention et ont tenté de comprendre sans montrer de signe de découragement.

Je remercie très chaleureusement toute ma famille : mes parents, Serge et Chantal et mes frères, Billy et Davy, qui se sont toujours souciés de mon sort (et de celui de mes "mini-tubulures"), qui m'ont toujours soutenue et qui ont montré un grand intérêt pour mes études et mes travaux de thèse. Mes parents m'ont donné tous les outils nécessaires à cette réussite et avec mes frères, ils ont fait preuve d'une grande patience et d'un grand intérêt lorsque je leur racontais mes travaux (ou lorsque je leur montrais mes présentations sur l'écran de la télévision).

Enfin, je remercie Alexandre Baksic. Nous nous sommes lancés ensemble dans cette aventure et nous avons réussi à surmonter toutes les épreuves qui en ont découlé. Merci pour ton indéfectible soutien.





# Table des matières

<b>Avant-propos</b>	<b>xiii</b>
<b>1 Introduction générale</b>	<b>1</b>
1.1 Présentation générale de la cellule . . . . .	2
1.2 Le trafic intracellulaire . . . . .	4
1.2.1 Les acteurs du trafic intracellulaire . . . . .	4
1.2.2 Mécanismes de fonctionnement des moteurs moléculaires . . . . .	7
1.2.3 Que connaît-on actuellement du trafic intracellulaire ? . . . . .	9
1.2.4 Pathologies dans lesquelles intervient un dysfonctionnement du trafic intracellulaire . . . . .	10
1.3 Caractérisations mécaniques du milieu cellulaire . . . . .	11
1.3.1 Rhéologie et microrhéologie . . . . .	11
1.3.2 Méthodes de mesure des propriétés mécaniques . . . . .	13
1.4 Notre approche . . . . .	15
<b>2 Matériel et méthodes</b>	<b>17</b>
2.1 L'endosome magnétique et la chaîne d'endosomes magnétiques . . . . .	19
2.1.1 Comment obtenir des endosomes magnétiques ? . . . . .	19
2.1.2 Caractéristiques physiques de l'endosome magnétique . . . . .	19
2.1.3 La chaîne d'endosomes magnétiques . . . . .	20
2.2 Dispositif de production de champ magnétique . . . . .	22
2.2.1 Présentation du dispositif . . . . .	22
2.2.2 Manipulations magnétiques . . . . .	22
2.2.3 Installation du dispositif sous microscope . . . . .	23
2.3 Préparation des échantillons . . . . .	24
2.3.1 Culture cellulaire . . . . .	24
2.3.2 Marquage magnétique . . . . .	25
2.3.3 Traitement par les agents thérapeutiques . . . . .	26
2.3.4 Traitement au nocodazole . . . . .	26
2.3.5 Test de viabilité cellulaire . . . . .	27
2.3.6 Marqueurs fluorescents . . . . .	27
2.4 Agents thérapeutiques . . . . .	27
2.4.1 Agents photothérapeutiques : m-THPC et TPCS <sub>2a</sub> . . . . .	27
2.4.2 Agent chimiothérapeutique : doxorubicine . . . . .	30

2.5	Mesures passives : suivi de particules . . . . .	30
2.5.1	Perturbation mécanique . . . . .	30
2.5.2	Perturbation photo-chimique . . . . .	31
2.5.3	Quantification du trafic intracellulaire . . . . .	32
2.6	Mesures actives : microrhéologie du cytoplasme . . . . .	34
2.6.1	Mesures de relaxation . . . . .	34
2.6.2	Mesures de viscosité effective . . . . .	34
2.6.3	Calibration du champ . . . . .	35
2.7	Système <i>in vitro</i> . . . . .	36
2.7.1	Polymérisation des microtubules . . . . .	36
2.7.2	Extraction des endosomes magnétiques . . . . .	38
2.7.3	Préparation des échantillons . . . . .	38
2.8	Caractérisation des vésicules émises après traitements anticancéreux . . . . .	41
2.8.1	Comptage des vésicules . . . . .	41
2.8.2	Analyses protéomiques et génomiques . . . . .	41
2.8.3	Origine des vésicules . . . . .	41
2.9	Imagerie . . . . .	42
2.9.1	Microscopie optique . . . . .	42
2.9.2	Microscopie confocale . . . . .	42
2.9.3	Microscopie électronique . . . . .	42
2.10	Statistiques . . . . .	43
<b>3</b>	<b>Perturbation mécanique</b> . . . . .	<b>47</b>
3.1	Introduction . . . . .	48
3.2	Impact d'une perturbation mécanique locale sur le trafic d'une chaîne d'endosomes . . . . .	50
3.2.1	Résultats des mesures passives . . . . .	50
3.2.2	Analyse des mesures passives avant et après la perturbation . . . . .	51
3.2.3	Suivi du mouvement des chaînes pendant la rotation (mesures passives) . . . . .	57
3.2.4	Discussion . . . . .	58
3.3	Impact d'une perturbation mécanique sur les propriétés viscoélastiques du cytoplasme . . . . .	61
3.3.1	Résultats des mesures actives . . . . .	61
3.3.2	Analyse des mesures actives avant et après la perturbation . . . . .	62
3.3.3	Discussion . . . . .	64
3.4	Impact d'une perturbation mécanique globale sur le trafic intracellulaire d'un endosome unique . . . . .	66
3.4.1	Résultats des mesures passives . . . . .	66
3.4.2	Analyse des mesures passives avant et après la perturbation . . . . .	67
3.4.3	Discussion . . . . .	67
3.5	Comparaison entre le mouvement d'un endosome unique et d'une chaîne à $N_e$ endosomes . . . . .	70
3.5.1	Résultats des mesures passives . . . . .	70
3.5.2	Analyse des mesures passives en fonction du nombre d'endosomes $N$ . . . . .	70
3.5.3	Discussion . . . . .	71
3.6	Discussion générale . . . . .	74
3.7	Conclusion et perspectives . . . . .	78

<b>4</b>	<b>Perturbation photochimique</b>	<b>79</b>
4.1	Introduction	80
4.2	Résultats et analyses publiés dans PlosOne : Impact of Photosensitizers Activation on Intracellular Trafficking and Viscosity	81
4.3	Discussion	95
4.4	Conclusion et perspectives	97
<b>5</b>	<b>Vésiculation induite par des traitements anti-cancéreux</b>	<b>99</b>
5.1	Introduction	100
5.2	Les traitements anticancéreux	101
5.2.1	La photothérapie	101
5.2.2	La chimiothérapie	102
5.3	La vésiculation : mise en évidence et quantification	102
5.3.1	Par photothérapie	102
5.3.2	Par chimiothérapie	105
5.4	Effet thérapeutique	108
5.4.1	Viabilité cellulaire	108
5.4.2	Annexine V (apoptose)	110
5.4.3	Analyse protéomique de l'apoptose	110
5.4.4	Analyse génique du stress oxydant	113
5.5	Origine des vésicules	117
5.6	Transfert des vésicules	119
5.6.1	Vésicules obtenues après photothérapie	119
5.6.2	Vésicules obtenues après chimiothérapie	120
5.7	Discussion	122
5.8	Conclusion et perspectives	124
<b>6</b>	<b>Système modèle de transport vésiculaire</b>	<b>125</b>
6.1	Introduction	126
6.2	Analyses des protocoles	126
6.2.1	Les microtubules	126
6.2.2	Les endosomes	127
6.2.3	L'énergie chimique	127
6.2.4	Préparation des lamelles	127
6.2.5	Remarques générales	127
6.3	Observations et conclusions	128
<b>7</b>	<b>Conclusion générale</b>	<b>131</b>
<b>8</b>	<b>Annexes</b>	<b>133</b>
8.1	Expression du couple magnétique	134
8.2	Protocoles détaillés : Système modèle <i>in vitro</i>	136
8.2.1	Préparation des tampons	136
8.2.2	Silanisation des lamelles	137
8.2.3	Extraction des endosomes	138
8.2.4	Polymérisation des microtubules	139
8.2.5	Préparation des échantillons pour étudier l'impact de la photothérapie sur les microtubules	140

---

8.2.6	Préparation des échantillons pour la reconstitution du transport vésiculaire <i>in vitro</i> . . . . .	141
8.3	Préparation d'échantillon pour la microscopie électronique (sur monocouche) . . . .	144
8.4	Proteome et Gene Array . . . . .	145
8.4.1	Proteome Profiler Human Apoptosis Array Kit . . . . .	145
8.4.2	Human Oxidative Stress Profiler PCR Array . . . . .	145

# Avant-propos

La cellule eucaryote est délimitée par une membrane appelée membrane plasmique. A l'intérieur de la cellule, c'est-à-dire dans le cytoplasme, on trouve de nombreux compartiments aussi délimités par une membrane comme par exemple le noyau, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, les mitochondries et une multitude de petits compartiments appelés vésicules. Les échanges entre ces différents compartiments sont nécessaires au bon fonctionnement de la cellule. Ils se font par l'intermédiaire des vésicules intracellulaires qui contiennent des biomolécules et permettent leur acheminement à différents endroits de la cellule. Il existe des vésicules d'endocytose qui circulent de la membrane plasmique vers le noyau, ce sont les endosomes. D'autres vésicules vont circuler en sens inverse (vésicule de sécrétion, exosomes, microvésicules). D'autres encore n'ont pas de direction préférentielle (péroxyosomes). Tous ces échanges dans le cytoplasme caractérisent le trafic intracellulaire. Il fait intervenir des protéines appelées moteurs moléculaires qui sont capable de convertir de l'énergie chimique (disponible dans la cellule sous forme d'ATP) en énergie mécanique afin d'évoluer le long des filaments du cytosquelette et d'offrir au contenu des vésicules un transport actif et ciblé.

Pour sonder le trafic intracellulaire, il est possible d'introduire dans le milieu intracellulaire des sondes artificielles, d'une taille équivalente à des vésicules de transport. Ces sondes ne sont pas pourvues de moteurs et une fois dans le milieu intracellulaire leurs mouvements sont liés à l'activité intracellulaire sans qu'elles participent de façon active au transport : ce sont des sondes inertes. A l'inverse il est possible d'utiliser des sondes biologiquement actives comme les vésicules intracellulaires. Nous avons choisi de nous focaliser sur le transport des endosomes. L'endosome est naturellement présent dans la cellule et correspond à une des principales vésicules de transport. De ce fait, il participe de façon très active au trafic intracellulaire.

Pour approfondir la compréhension du fonctionnement du transport des endosomes et pour répondre à des questions fondamentales sur le trafic intracellulaire, nous avons utilisé une approche qui consiste à perturber le trafic intracellulaire et à observer dans quelle mesure la perturbation a modifié le système. Pour cela, nous avons choisi deux différents types de perturbation : une perturbation mécanique, qui consiste à appliquer un cisaillement rotationnel au cytoplasme, et une perturbation photo-chimique, qui nécessite la photo-activation de molécules photosensibles localisées dans le milieu intracellulaire. Le trafic intracellulaire étant un phénomène essentiel pour la cellule, un dysfonctionnement de celui-ci pourrait entraîner des dommages cellulaires. L'étude d'une perturbation sur le trafic intracellulaire peut donc également conduire à des applications biomédicales comme par exemple des traitements anticancéreux.

Ce manuscrit est organisé selon six chapitres principaux. Une première partie intitulée "Introduction générale", a pour rôle de rappeler les éléments moteurs du trafic intracellulaire et ses mécanismes de fonctionnement, et présente également une bibliographie des différentes méthodes permettant d'effectuer des mesures rhéologiques sur des cellules vivantes. Le deuxième chapitre in-

titulé “Matériel et Méthodes” décrit le protocole d’obtention des endosomes, pouvant contenir des nanoparticules magnétiques, le dispositif à production de champ magnétique, les techniques d’analyses de microrhéologie passive et active, ainsi que les protocoles de biologie cellulaire, de traitement thérapeutique et ceux du système *in vitro* visant à reproduire le transport vésiculaire. Ensuite sont exposées les trois parties de résultats : “Perturbation mécanique”, “Perturbation photo-chimique” et “Vésiculation induite par des traitements anticancéreux”. Les résultats correspondant à chaque partie sont rapportés, analysés puis discutés. Une dernière partie, “Système modèle de transport vésiculaire” présente une analyse des protocoles de fabrication des microtubules et d’extraction d’endosomes utilisés afin de reproduire le transport vésiculaire à partir d’un système *in vitro*. Le manuscrit se finit par une Conclusion générale suivie d’annexes.

Chapitre **1**

# Introduction générale

## Sommaire

---

<b>1.1</b>	<b>Présentation générale de la cellule</b>	<b>2</b>
<b>1.2</b>	<b>Le trafic intracellulaire</b>	<b>4</b>
1.2.1	Les acteurs du trafic intracellulaire	4
1.2.2	Mécanismes de fonctionnement des moteurs moléculaires	7
1.2.3	Que connaît-on actuellement du trafic intracellulaire ?	9
1.2.4	Pathologies dans lesquelles intervient un dysfonctionnement du trafic intracellulaire	10
<b>1.3</b>	<b>Caractérisations mécaniques du milieu cellulaire</b>	<b>11</b>
1.3.1	Rhéologie et microrhéologie	11
1.3.2	Méthodes de mesure des propriétés mécaniques	13
<b>1.4</b>	<b>Notre approche</b>	<b>15</b>

---

## 1.1 Présentation générale de la cellule

La cellule eucaryote est un milieu très hétérogène du fait de la présence de différents types de constituants qu'on peut y trouver. La membrane plasmique délimite le cytoplasme dans lequel on trouve une grande quantité de compartiments cellulaires délimités par une membrane, comme par exemple le noyau, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, les mitochondries et de nombreuses petites vésicules (péroxyosomes, endosomes, lysosomes,...) (figure 1.1).

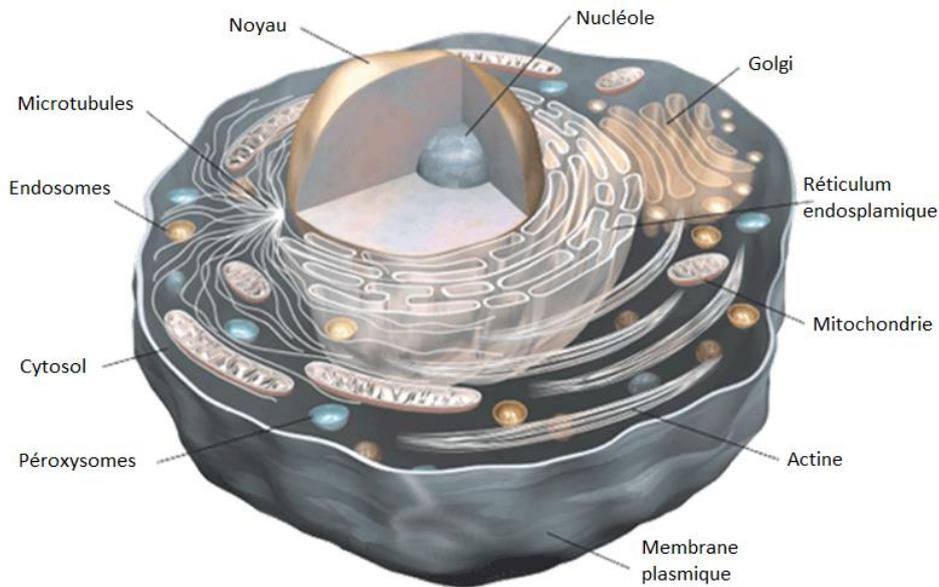


FIGURE 1.1 – Schéma montrant le degré de compartimentation de la cellule [1]

Le milieu dans lequel baignent ces compartiments est un milieu hétérogène, dans le sens où on y trouve du liquide (le cytosol, qui est une solution de protéines) et des éléments rigides, comme les filaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires, qui constituent le cytosquelette. Ces derniers éléments sont majoritairement constitués de protéines, qui sont synthétisées au sein même de la cellule.

Chaque cellule d'un être vivant est programmée pour en synthétiser. Le codage pour cette production est contenu dans le noyau, sous forme de macromolécules, l'acide désoxyribonucléique (ADN). Les étapes suivantes de la synthèse de protéines ont lieu à différents endroits de la cellule, l'étape finale étant effectuée au niveau du réticulum endoplasmique. Les protéines produites, vont alors être transférées à l'appareil de Golgi, dans des petits compartiments, appelés vésicules. Ces vésicules naissent par bourgeonnement de la membrane du réticulum et vont fusionner avec la membrane du Golgi. Un fois dans le Golgi, les protéines vont subir plusieurs étapes de maturation,

avant d'être à nouveau expulsées dans le cytosol sous forme de vésicules intracellulaires, en ayant pour destination les lysosomes, les endosomes ou la membrane plasmique. De nombreuses vésicules sont donc produites au cœur de la cellule pour transporter les protéines synthétisées par la cellule vers la membrane plasmique.

Circulant en sens inverse, les endosomes sont des vésicules qui sont issues de la membrane plasmique suite à l'endocytose de macromolécules, de neurotransmetteurs (dans le cas de cellules synaptiques), etc... Le premier stade de la vésicule d'endocytose est l'endosome primaire. Celui-ci va alors migrer et fusionner avec les endosomes précoces, dans lesquels le triage du contenu de la vésicule va commencer. Les endosomes précoces vont alors mûrir pour donner les endosomes tardifs qui deviennent à leur tour des lysosomes ou fusionnent avec un lysosome préexistant. Les endosomes naissent à la membrane plasmique et leur contenu ou une partie de celui-ci migre progressivement vers le centre de la cellule.

Il y a donc de nombreux échanges entre les différents compartiments cellulaires, offrant un transport efficace au contenu des vésicules et visant à garder un équilibre entre les constituants des différentes membranes avec lesquelles fusionne la membrane de l'intermédiaire de transport. Tous ces mouvements de vésicules caractérisent le trafic intracellulaire. Le transport vésiculaire est un phénomène actif, qui doit son efficacité à l'organisation du réseau des filaments du cytosquelette (en particulier les microtubules et l'actine), qui vont être les rails du transport et à l'action des moteurs moléculaires. Ceux-ci convertissent de l'énergie chimique, disponible dans la cellule sous forme d'adénosine tri-phosphate (ATP), en énergie mécanique pour évoluer le long des rails.

## 1.2 Le trafic intracellulaire

Le système cellulaire est le lieu d'échanges organisés de matériel moléculaire ou d'organelles, afin d'assurer les échanges avec le milieu extracellulaire ou l'équilibre protéique interne de la cellule. Les vésicules d'endocytose doivent être amenées à un centre de dégradation ou de recyclage. Les protéines doivent être véhiculées du réticulum endoplasmique vers le Golgi, puis vers d'autres compartiments cellulaires (organites, membrane plasmique). Les péroxysomes doivent circuler dans la cellule pour pouvoir jouer leur rôle de "détoxificateurs" de la cellule. Les phénomènes de diffusion spontanée au sein du cytoplasme sont lents, du fait de la viscosité élevée du cytosol et du caractère encombré que confèrent les nombreux obstacles présents dans le cytoplasme. Pour être efficaces, ces échanges nécessitent un transport actif, faisant intervenir des mécanismes biologiques spécifiques convertissant de l'énergie chimique en énergie mécanique.

### 1.2.1 Les acteurs du trafic intracellulaire

Le trafic intracellulaire de vésicules est un phénomène très complexe faisant intervenir de nombreux éléments de nature biochimique différente. Les principaux acteurs du trafic intracellulaire sont le cytosquelette, les moteurs moléculaires et la vésicule de transport (ou cargo).

#### Le cytosquelette

Les éléments du cytosquelette intervenant, dans le transport vésiculaire, sont les microfilaments d'actine (actine F) et les microtubules. Ce sont des biopolymères protéiques, qui forment des filaments polarisés ayant une morphologie différente et interagissant avec différents types de moteurs moléculaires. Ces deux éléments sont en perpétuelle reconstruction dans la cellule.

**Les filaments d'actine ou microfilaments** sont formés par polymérisation de plusieurs monomères d'actine globulaire (actine G).

**Structure :** Ils proviennent d'un arrangement hélicoïdale dextre qui forme un filament d'un diamètre de 7-8 nm et d'une longueur de persistance d'environ 17  $\mu\text{m}$ . Le tour d'hélice du filament d'actine mesure 37 nm (figure 1.3 A).

**Localisation / Organisation :** Ils sont présents en périphérie de la cellule (actine corticale) et sous formes de fibres de stress (figure 1.2).

**Dynamique :** dans les conditions intracellulaires, une dépolymérisation a lieu à l'extrémité (-) alors qu'un ajout de monomères a lieu à l'extrémité (+). Les cinétiques de polymérisation et dépolymérisation dépendent de la concentration en actine G et sont différentes aux extrémités (+) et (-) [2]. A l'extrémité (+), des monomères d'actine G combinés à une molécule d'ATP vont s'ajouter au brin préexistant. La croissance se fait de façon continue et au cours du temps l'ATP va avoir tendance à s'hydrolyser en ADP induisant ainsi une dépolymérisation à l'extrémité (-). Cette instabilité dynamique, appelée "treadmilling" ou tapis roulant, dépend des rapports de concentrations entre actine filamentueuse et actine globulaire et est régulée par des protéines appelées "actin-associated proteins" (AAP).

**Les microtubules** sont constitués de 13 protofilaments dont l'unité de base est le dimère de tubuline ( $\alpha$ - $\beta$ )

Structure : ce sont des filaments creux (tubes) ayant un diamètre externe de 25 nm et un diamètre interne de 14 nm. Leur longueur de persistance est de plusieurs  $\mu\text{m}$  (figure 1.3B). Ils sont donc plus gros et plus rigides que les filaments d'actine.

Localisation / Organisation : dans les cellules non-polarisées, ils sont organisés de façon radiale à partir du centrosome (extrémité (-)) à proximité du noyau (figure 1.2). Chez les cellules polarisées, la symétrie radiale étant brisée, l'extrémité (+) est orientée vers la membrane basale, tandis que l'extrémité (-) est orientée vers la membrane apicale [3].

Dynamique : tout comme les filaments d'actine, les microtubules se renouvellent constamment. La croissance se fait à partir du centrosome (extrémité (-)) par l'ajout de dimères de tubuline ( $\alpha-\beta$ ) combinés à des molécules de guanosine tri-phosphate (GTP) à l'extrémité (+). Les complexes  $\beta$ -tubuline-GTP peuvent s'hydrolyser en  $\beta$ -tubuline-GDP, ce qui fragilise la structure du microtubule et peut donner lieu à un phénomène de dépolymérisation rapide, appelé catastrophe. La dynamique structurale du microtubule est gouvernée par l'équilibre entre le taux de polymérisation et le nombre de catastrophes complètes ou partielles. Lorsqu'elles sont stoppées, on parle alors de sauvetage. Cette instabilité dynamique est régulée par des "microtubule-associated proteins" (MAPs) [4].

Les éléments du cytosquelette couvrent quasiment tout le volume cellulaire (figure 1.2), et leur polarisation présente un intérêt pour la directionnalité du transport vésiculaire. Ils représentent donc un bon réseau de transport.

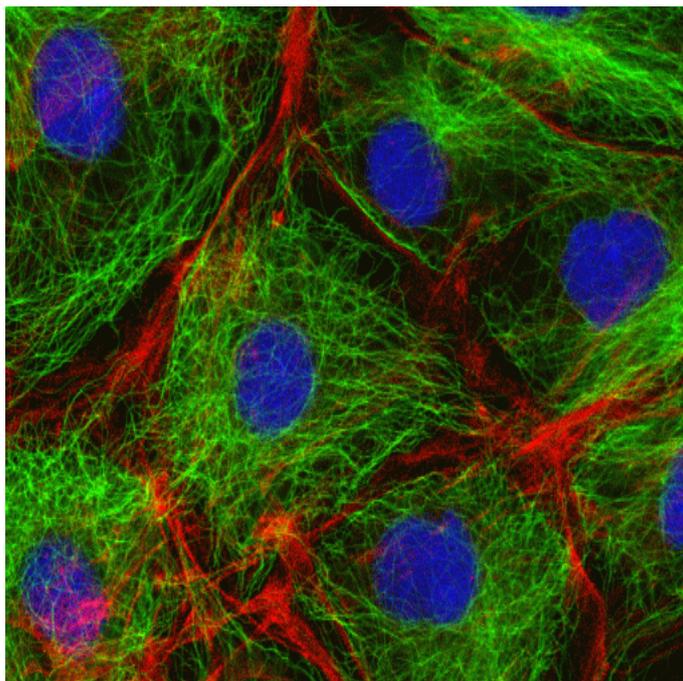


FIGURE 1.2 – Organisation des microtubules (vert) et de l'actine (rouge) dans une cellule animale. Au centre le noyau (bleu) [5])

### Les moteurs moléculaires

Les moteurs moléculaires sont des protéines capables de transformer de l'énergie chimique en énergie mécanique ce qui leur permet de se déplacer le long des filaments du cytosquelette par des

modifications conformationnelles (figure 1.3 et 1.4).

Dans le cadre du transport vésiculaire, la famille des **myosines** (40% du nombre total des moteurs présents dans une cellule) s'associe avec les filaments d'actine : myosine I et V (transport antérograde (-+)) et myosine VI (transport rétrograde (+-)) [6].

Les moteurs capables de s'associer avec les microtubules sont :

- les **dynéines** (15%) : dynéine cytoplasmique (transport rétrograde) [4]
- les **kinésines** (45%) : kinésine 1-2-3 (transport antérograde) et kinésine 14 (transport rétrograde) [7].

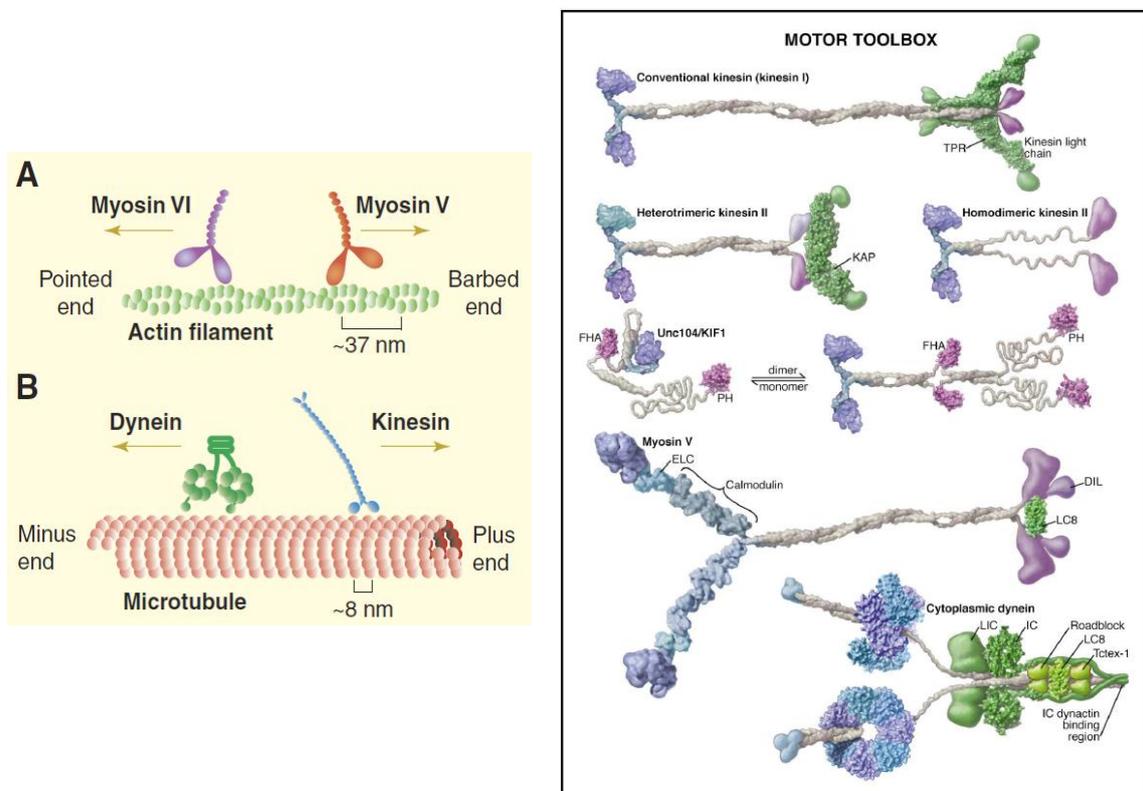


FIGURE 1.3 – Moteurs moléculaires impliqués dans le trafic intracellulaire. Gauche : (A) la famille des myosines capables de se déplacer le long des microfilaments d'actine et (B) les familles des dynéines et des kinésines capables de se déplacer le long des microtubules (issu de [8]). Droite : la partie gauche des moteurs (bleu) correspond au domaine moteur qui s'attache au cytosquelette (N terminal) et qui contient le site de fixation de l'ATP. La partie droite (C terminal) est prévue pour la fixation au cargo. (issu de [9])

La structure des moteurs moléculaires est très différente d'une famille de moteurs à l'autre. Cependant, il y a quelques similitudes structurales. Généralement, les moteurs sont quasiment tous constitués d'un domaine moteur qui s'attache au microtubule ou au microfilament d'actine et

qui contient le site de fixation de l'ATP (en bleu sur la figure 1.3, "Motor Toolbox"). A l'opposé (à droite), on trouve une queue (en violet sur la figure 1.3) et/ou des chaînes légères (en vert sur la figure 1.3), prévus pour se fixer au cargo. Les parties gauche et droite sont reliées par des chaînes lourdes bispiralées ("coiled-coil") ou non (en gris).

### Les vésicules ou cargos

Les moteurs sont capables de se connecter au cytosquelette tout en faisant partie du manteau membranaire des vésicules. Ils permettent le mouvement de ces vésicules le long des filaments du cytosquelette, offrant à leur contenu un transport ciblé et plus efficace que la diffusion brownienne. Les différents types de vésicules vont faire intervenir des moteurs différents suivant leur destination [3]. Par exemple :

- la myosine I participe aux dernières étapes du transport des endosomes tardifs vers les lysosomes,
- les kinésines cytoplasmiques interviennent lors du transport des vésicules d'endocytose, notamment des endosomes précoces vers les endosomes tardifs, - la kinésine I joue un rôle dans le transport des vésicules golgiennes,
- les dynéines transportent les endosomes tardifs vers l'appareil de Golgi.

### 1.2.2 Mécanismes de fonctionnement des moteurs moléculaires

Bien qu'il soit difficile de comprendre exactement le mécanisme de fonctionnement des différents types de moteurs moléculaires, il existe des modèles en accord avec les observations expérimentales [10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17] comme les modèles pas-à-pas ("hand-over-hand") ou "inchworm".

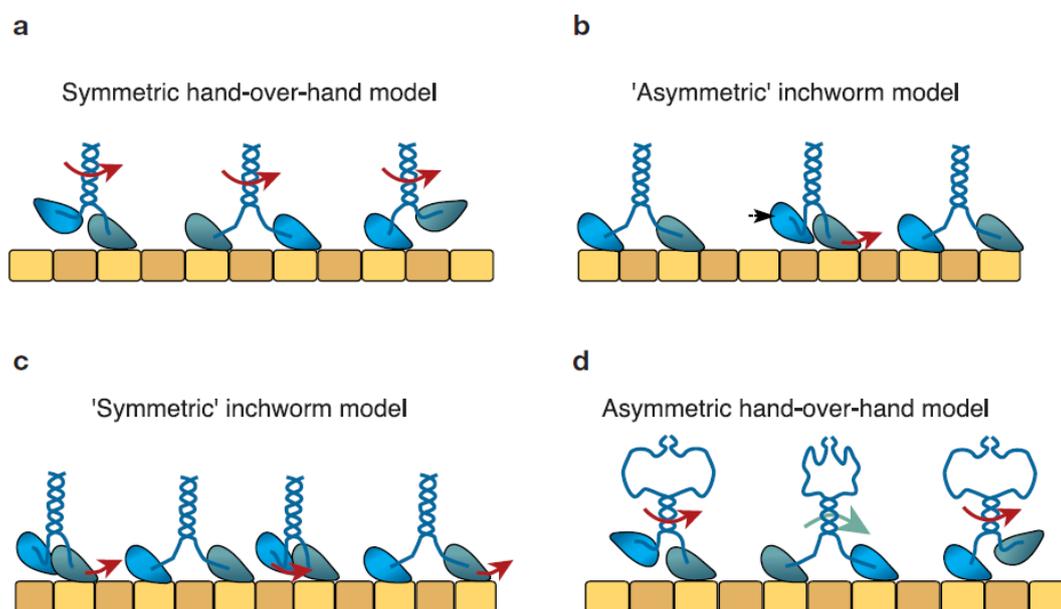


FIGURE 1.4 – Modèles de fonctionnement des moteurs moléculaires : modèle pas-à-pas symétrique (a) ou asymétrique (d), modèle inchworm asymétrique (b) ou symétrique (c) (issu de [13].)

### Modèle pas-à-pas

Le modèle pas-à-pas est le modèle le plus connu qui explique un mécanisme possible de fonctionnement des moteurs moléculaires. Des observations directes du mouvement pas-à-pas de la myosine V ont pu être réalisées [18] et il semble que ce soit le modèle le plus probable pour expliquer le fonctionnement de la kinésine-1 [14, 15]. Les mouvements pas-à-pas de la kinésine sont orchestrés par la dynamique des cycles d'hydrolyse des molécules d'ATP (figure 1.5).

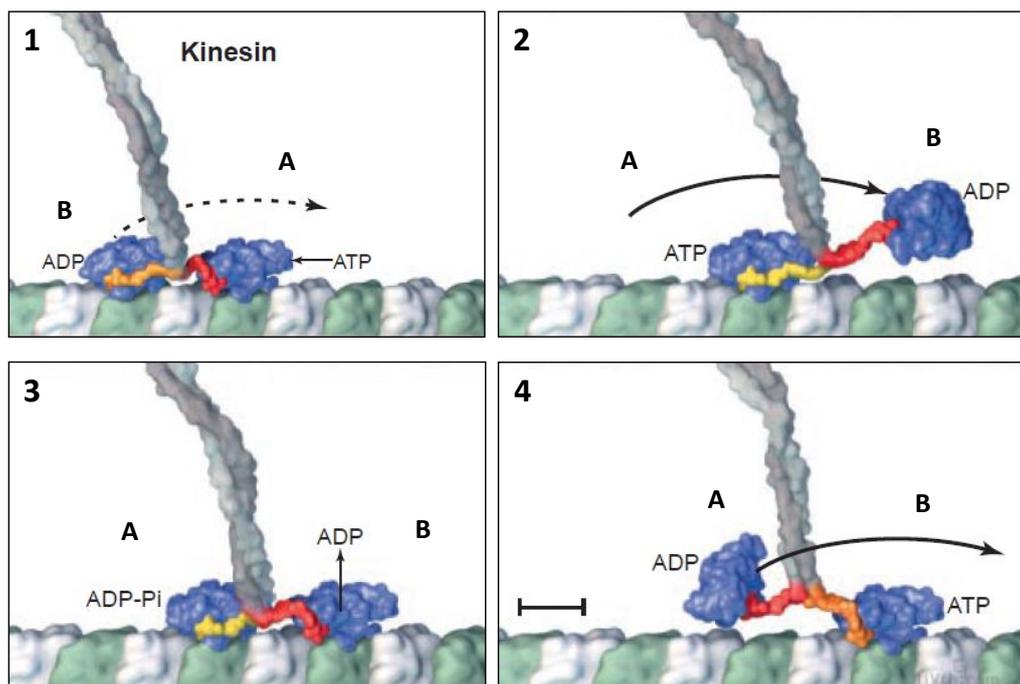


FIGURE 1.5 – Schéma du fonctionnement de la kinésine (issu de [17]). (1) La tête (A) à l'avant est combinée à une molécule d'ATP, elle est attachée au microtubule. La tête (B) à l'arrière est combinée à une molécule d'ADP, elle se détache et passe à l'avant (2). (3) La tête (A) est à l'arrière. Sa molécule d'ATP s'hydrolyse en ADP+Pi, ce qui libère de l'énergie. La tête (B), à l'avant, échange sa molécule d'ADP contre une molécule d'ATP. (4) La tête (A) est finalement combinée à une molécule d'ADP et elle va se détacher pour avancer et le cycle recommence.

Chacune des têtes de la kinésine contient un site de fixation pour une molécule d'ATP ou ADP. Suivant l'état d'hydrolyse de la molécule d'ATP, la tête a tendance soit à s'attacher aux microtubules (ATP), soit à se détacher (ADP). En même temps, l'articulation tête-queue subit un changement de conformation (rotation du cou de la protéine). Des molécules d'ADP sont fortement attachées aux têtes, lorsque la kinésine n'est pas en contact avec un microtubule. Une fois qu'une tête se fixe à un microtubule, la molécule d'ADP est remplacée par une molécule d'ATP. La deuxième tête s'attache également au microtubule par effet de proximité. L'hydrolyse de la molécule d'ATP en ADP+Pi libère de l'énergie et une fois que l'ion Pi (phosphate inorganique) est libéré, la tête se détache et effectue un mouvement de rotation pour se rattacher environ 8 nm plus loin vers l'extrémité (+) du microtubule. La deuxième tête suit le même scénario à son tour. Il a été montré, dans le cas de la kinésine-1, que le fonctionnement est de type asymétrique [15]

car la queue de la kinésine ne tourne pas pendant le mouvement. Ce qui signifie que la kinésine-1 "marche" en mettant une tête devant l'autre en alternant le sens de rotation.

Le modèle "inchworm" est différent du modèle "pas-à-pas" dans le sens où les deux têtes ne "marchent" pas le long du filament, les mouvements ne sont pas du type "une tête devant l'autre". Dans ce modèle, la tête à l'avant reste à l'avant et lorsqu'elle avance, la tête à l'arrière avance à son tour et rejoint la tête à l'avant mais sans jamais la dépasser.

### 1.2.3 Que connaît-on actuellement du trafic intracellulaire ?

Les études sur le trafic intracellulaire concernent soit le comportement individuel d'un moteur, soit le comportement collectif des moteurs à l'échelle d'une vésicule de transport. Le comportement individuel d'un moteur est caractérisé par sa capacité à effectuer des mouvements dont les caractéristiques physiques sont directement liées à sa structure, alors que les mouvements d'une vésicule sont dus au comportement collectif de plusieurs moteurs et à leur capacité à coopérer, induisant des mouvements dont la durée, la processivité et la vitesse sont différentes de celles d'un moteur individuel.

#### Motilité des moteurs moléculaires

Les chercheurs ont caractérisé la motilité des moteurs moléculaires en mesurant la longueur des pas, la vitesse de déplacement ainsi que la processivité, qui correspond à la distance parcourue par un moteur avant de se détacher du cytosquelette. La plupart des expériences de motilité des moteurs moléculaires sont réalisées *in vitro*. Il existe deux types d'expériences :

- "bead assay", les microtubules ou les microfilaments sont immobiles et des moteurs sont attachés à une bille fluorescence. On mesure les déplacements de la bille (qui peut être manipulée par un piège optique).
- "gliding assay", les moteurs sont immobiles. On mesure alors le déplacement des microtubules ou des microfilaments.

Un récapitulatif des mesures expérimentales de motilité des moteurs moléculaires est donné dans le tableau 1.1).

Famille	Moteur	longueur des pas (nm)	vitesse ( $\mu\text{m/s}$ )	processivité (nm)
Myosines	Myosine I	10	0.2	?
	Myosine V	36	0.3	16000
	Myosine VI	36	0.3	240
Dynéines		28	14	1000
Kinésines		8	1.8	1000

TABLE 1.1 – Caractéristiques moyennes de motilité des différents types de moteurs moléculaires [8, 6, 4, 19, 20, 21]

#### Mouvement vésiculaire

Les vésicules sont équipées de plusieurs moteurs moléculaires. Dans le cytoplasme, elles peuvent diffuser sur des courtes distances, afin d'aller se connecter à un microtubule ou un filament d'actine. Une fois à proximité du filament, les moteurs vont interagir avec celui-ci de façon discontinue

et progressive. Les différentes vésicules de transport ne possèdent pas forcément toutes la même population de moteurs moléculaires. Cependant il semblerait que chaque vésicule soit pourvue de différents types de moteurs, car ils sont capables de collaborer afin d'effectuer des mouvements bi-directionnels [8] ou de se relayer lors du passage d'un microtubule à un microfilament d'actine [22] pour augmenter l'efficacité du transport. Le transport vésiculaire peut être étudié dans les cellules [23, 24, 25, 26, 27] ou à partir de systèmes *in vitro* [28, 29, 30, 31, 32].

Pour étudier le transport vésiculaire, que ce soit à partir de systèmes *ex vivo* ou *in vitro*, les chercheurs ont suivi des vésicules de transport, afin d'enregistrer leur trajectoire généralement 2D. A partir des coordonnées des vésicules, ils ont étudié leur mouvement de diffusion spontanée, de même que Brown l'a fait au XVIIIème avec les particules de pollen [33], et ils ont calculé le déplacement quadratique moyen (ou mean square displacement, MSD), grandeur physique qui relie les déplacements quadratique avec le temps. L'analyse des trajectoires en termes de déplacement quadratique moyen donne des informations sur l'amplitude de déplacement des vésicules, ainsi que sur le type de mouvement. Théoriquement et expérimentalement, on peut distinguer deux types de mouvements : dirigé (quasi-balistique), lorsque les moteurs sont connectés au cytosquelette ou sous-diffusif, lorsqu'ils sont déconnectés [24]. Ce sont justement ces phases de mouvement dirigé qui sont intéressantes pour l'étude du trafic intracellulaire, car ce sont pendant ces phases que les moteurs sont actifs. Alors que le MSD donne un aperçu global de la trajectoire des vésicules de transport, il existe des techniques pour analyser plus en détail les mouvements des vésicules pour distinguer les phases dirigées des phases plus diffusives et accéder par exemple à des mesures de vitesse moyenne de déplacement, de processivité ou de durée des phases dirigées (en 2D : [25], en 3D : [23]). Les phases de mouvement diffusif ne présentent pas un grand intérêt pour l'étude de transport vésiculaire mais leur analyse peut donner des informations sur les propriétés mécaniques du milieu dans lequel se trouvent les vésicules.

#### 1.2.4 Pathologies dans lesquelles intervient un dysfonctionnement du trafic intracellulaire

Le trafic intracellulaire est un phénomène important qui joue un rôle dans l'organisation spatiale du milieu intracellulaire, par nature hors d'équilibre. Un dysfonctionnement de ce phénomène peut avoir des conséquences dramatiques. Par exemple, une inhibition du transport par les kinésines dans des cellules nerveuses induit une mauvaise répartition des mitochondries et du réticulum, et pourrait être liée à la maladie d'Alzheimer [34, 35]. Les dynéines jouent un rôle très important dans le transport axonal. Si le trafic des vésicules synaptiques est perturbé, cela peut engendrer des maladies neurodégénératives comme la maladie de Huntington [36, 37] ou encore dans la maladie de Charcot-Marie-Tooth [38]. Il semble donc essentiel de comprendre son fonctionnement.

## 1.3 Caractérisations mécaniques du milieu cellulaire

Pour bien comprendre ce phénomène actif qu'est le transport vésiculaire, il faut connaître les propriétés physiques du milieu dans lequel il a lieu. Lorsqu'une vésicule n'est pas connectée à un rail de transport, elle diffuse de façon passive dans le cytoplasme jusqu'à atteindre un filament du cytosquelette. Cette diffusion dépend essentiellement des propriétés mécaniques du cytoplasme. Une fois la vésicule attachée à un filament du cytosquelette, l'action des moteurs va mettre en mouvement le cargo. Des forces de friction, également dépendantes des propriétés mécaniques, vont alors être exercées sur le cargo par le milieu intracellulaire et moduler son déplacement. Dans toutes les étapes du transport vésiculaire, les propriétés mécaniques du cytoplasme sont donc importantes.

### 1.3.1 Rhéologie et microrhéologie

Depuis un certain nombre d'années, les physiciens se sont intéressés à caractériser les propriétés mécaniques de la cellule. En faisant appel à des notions physiques provenant de plusieurs domaines comme la physique des liquides, la physique non-linéaire et la mécanique des milieux continus dont la rhéologie, plusieurs techniques de mesures ont émergé faisant naître la microrhéologie cellulaire.

Il existe deux types d'approches : la microrhéologie active et la microrhéologie passive. Suivant le système étudié et le dispositif expérimental utilisé, l'une ou l'autre de ces approches est choisie. Certaines expériences permettent même de réaliser les deux types de mesure. Certains de ces dispositifs sont présentés dans la partie suivante (partie 1.3.2).

#### Microrhéologie active

La microrhéologie active consiste à appliquer globalement ou plus localement des contraintes mécaniques sur la cellule ou un élément cellulaire. L'idée est alors d'observer et de quantifier la réponse de la cellule à une force ou à un couple, le but étant d'établir la relation de contrainte-déformation ou contrainte-taux de déformation. Certains matériaux simples sont définis par une seule grandeur physique. Par exemple un solide purement élastique ou un liquide purement visqueux sont respectivement caractérisés par un module élastique ( $E$ ) ou une viscosité ( $\eta$ ).

Dans le cas d'un **solide purement élastique**, la relation contrainte-déformation est donnée par la loi de Hooke :

$$\sigma = E\epsilon \quad (1.1)$$

$\sigma$  est la contrainte,  $\epsilon$  la déformation, et  $E$  correspond au module élastique.

Dans le cas d'un **fluide purement visqueux**, l'expression reliant la contrainte ( $\sigma$ ) et le taux de déformation ( $\dot{\epsilon}$ ) est donnée par :

$$\sigma = \eta\dot{\epsilon} \quad (1.2)$$

où  $\eta$  correspond à la viscosité.

Dans le cas de la **cellule**, la relation de contrainte-déformation est plus complexe, car la cellule a à la fois un comportement visqueux et un comportement élastique, c'est un milieu viscoélastique. Cependant, les composantes élastiques et visqueuses ne peuvent pas être découplées en  $E$  et  $\eta$ . On parle alors de module viscoélastique  $G$  ou de fonction de fluage  $J$ . L'utilisation de l'une ou l'autre de ces grandeurs dépend du type d'expérience réalisé. En régime sinusoïdal, un déplacement oscillant

à la pulsation  $\omega$  est imposé à la sonde ou à la cellule, impliquant une déformation périodique du milieu. Ce type de mesure permet de déduire le module viscoélastique  $G(\omega)$  de la relation contrainte-déformation (équation 1.4). Les expériences de fluage consistent à appliquer une force constante sur la sonde ou la cellule. La contrainte appliquée au milieu est donc constante et la mesure de déformation en fonction du temps donne accès à la fonction de fluage  $J(t)$  (équation 1.5).

$$\sigma(t) = \int_{-\infty}^t G(t-t')\dot{\epsilon}(t')dt' \quad (1.3)$$

Lorsqu'on est en régime sinusoïdal, la déformation peut s'écrire  $\epsilon(t) = \Re(\epsilon_0 \exp(i\omega t))$  et la transformée de Fourier de l'équation 1.3 peut se mettre sous la forme :

$$\tilde{G}(\omega) = \frac{\tilde{\sigma}(\omega)}{\tilde{\epsilon}(\omega)} \quad (1.4)$$

$$\epsilon(t) = \int_{-\infty}^t J(t-t')\dot{\sigma}(t')dt' \quad (1.5)$$

Dans le cas du milieu intracellulaire, le module viscoélastique et la fonction de fluage se comportent en loi puissance, avec un même exposant ( $\gamma$ ) [39] :

$$|G(\omega)| = G_0 \left( \frac{\omega}{\omega_0} \right)^\gamma \quad (1.6)$$

et

$$J(t) = J_0 \left( \frac{t}{t_0} \right)^\gamma \quad (1.7)$$

et il est possible de passer de l'un à l'autre par la relation :

$$\tilde{G}(\omega) = \frac{1}{i\omega\tilde{J}(\omega)} \quad (1.8)$$

où  $\tilde{J}(\omega)$  est la transformée de Fourier de  $J(t)$ .

### Microrhéologie passive

La microrhéologie passive étudie les mouvements spontanés de sondes en l'absence de contrainte extérieure. La mesure consiste à quantifier les fluctuations de positions de la sonde, en s'inspirant des études qui ont été faites sur le mouvement brownien. On peut alors mesurer le déplacement quadratique moyen des sondes dont l'expression en fonction du temps, donne accès à la composante dissipative du système.

Dans le cas d'une sonde plongée dans un **liquide purement visqueux**, on peut exprimer le déplacement quadratique moyen en fonction du temps de la manière suivante :

$$\langle \Delta r^2(t) \rangle = 2\delta D * t \quad (1.9)$$

où  $\delta$  est la dimension de l'espace,  $D$  est le coefficient de diffusion, défini par la relation d'Einstein par  $D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r}$  avec  $k_B$  la constante de Boltzmann,  $T$  la température,  $\eta$  la viscosité et  $r$  le rayon de la sonde. Dans cet exemple, la mesure de  $D$  donne accès à la viscosité  $\eta$  et donc aux

propriétés mécaniques du milieu.

Dans le cas d'une sonde **intracellulaire** par exemple, il est possible d'exprimer le déplacement quadratique moyen sous forme d'une loi puissance en fonction du temps :

$$\langle \Delta r^2(t) \rangle = D^* * \left(\frac{t}{t_0}\right)^\alpha \quad (1.10)$$

Ici  $D^*$  ne dépend plus simplement de la viscosité mais des propriétés visco-élastiques du cytoplasme (notamment plus l'exposant du module élastique est grand  $\gamma \rightarrow 1$  plus  $D^*$  est grand et plus l'exposant est petit  $\gamma \rightarrow 0$  plus  $D^*$  est faible) et le déplacement quadratique moyen n'est pas forcément proportionnel au temps ( $0 < \alpha < 2$ ).

### 1.3.2 Méthodes de mesure des propriétés mécaniques

Une des premières méthode est apparue en 1922 avec Alfred Heilbronn [40]. En utilisant l'ancêtre des pinces magnétiques, Heilbronn étudie pour la première fois les propriétés microrhéologiques du cytoplasme de protoplastes et détermine, en particulier, une viscosité effective, en étudiant les mouvements de particules magnétiques à l'intérieur des protoplastes.

Depuis de nombreuses méthodes ont vu le jour et permettent de faire des mesures mécaniques à différentes échelles spatiales et temporelles. Certaines techniques permettent de mesurer les propriétés mécaniques d'une monocouche de cellules [41], d'un tissu [42] ou d'un agrégat de cellules [43], mais ici nous allons nous focaliser sur celles qui étudient ces propriétés à l'échelle de la cellule unique.

Il est possible de sonder la cellule entièrement ou d'effectuer une mesure plus locale. La réponse dépend également de l'échelle de temps caractéristique de l'expérience.

#### Mesures globales

Une partie des expériences sont réalisées à l'échelle globale de la cellule, avec des techniques extracellulaires. La taille des parties du dispositif en contact avec la cellule et qui servent à effectuer les mesures, sont du même ordre de grandeur que la taille de la cellule.

Il existe une technique, inspirée du rhéomètre à l'échelle macrométrique, qui applique un contrainte uniaxiale à travers des micro-plaques [44] (figure 1.6(a)). La cellule est placée entre deux plaques, l'une rigide et l'autre souple (rigidité variable). Ce dispositif permet plusieurs types de manipulations. La première est une mesure de fluage et consiste à appliquer une contrainte constante et de mesurer la déformation en fonction du temps ( $J(t)$ ). La deuxième, consiste à appliquer un déformation constante et de mesurer la relaxation de la contrainte en fonction du temps. La troisième technique consiste à imposer une contrainte sinusoïdale à une certaine fréquence et de mesurer la réponse de la cellule en quantifiant la déformation en fonction de la fréquence ( $G(\omega)$ ).

Une autre technique, appelée "cell stretcher" (figure 1.6(c)), consiste à placer une cellule dans un double faisceau laser. La cellule étant un matériau diélectrique, elle va se déformer sous l'application d'une contrainte uniaxiale, suivant l'axe du faisceau. Le but est de mesurer la déformation de la cellule [45] en fonction de la contrainte appliquée.

Enfin, il existe une méthode qui consiste à appliquer une contrainte mécanique globale à la cellule grâce à une micropipette (figure 1.6(b)). La contrainte imposée par l'aspiration de la cellule

par la micropipette est reliée à la déformation mesurée [46]. Cette même technique a été utilisée pour mesurer les propriétés viscoélastiques du noyau [47].

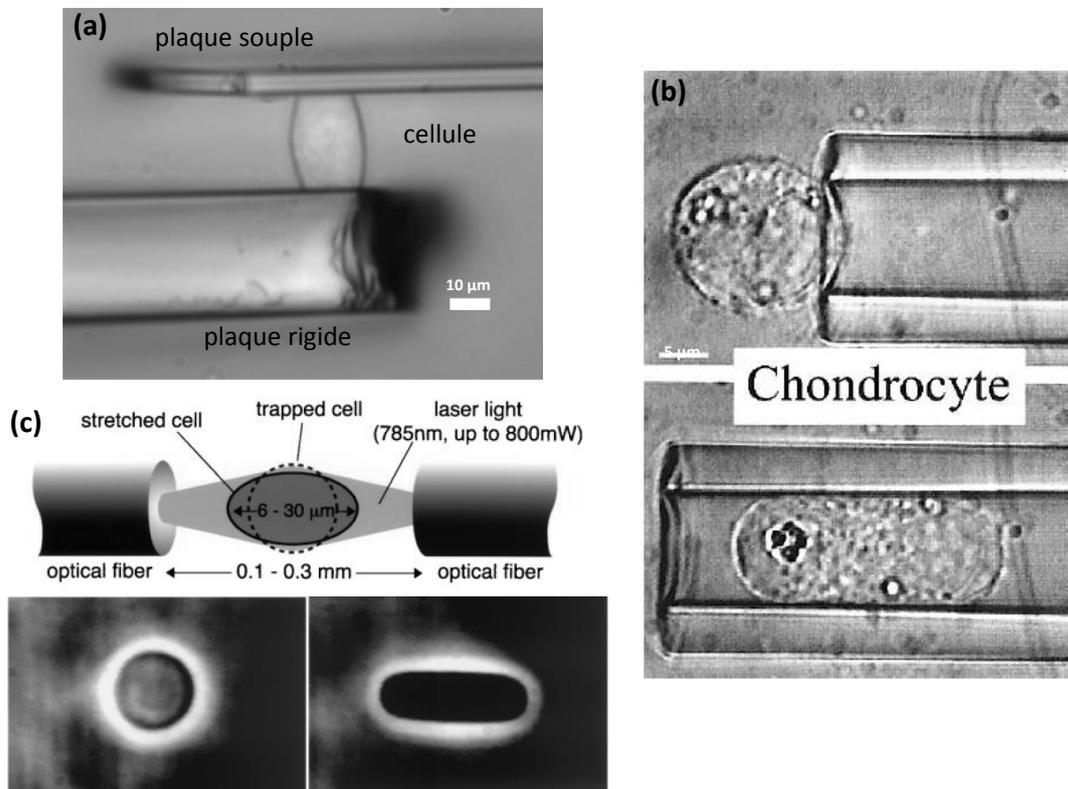


FIGURE 1.6 – Différents dispositifs permettant de mesurer les propriétés viscoélastiques à l'échelle globale de la cellule : (a) rhéomètre à microplaques [39], (b) aspiration par micropipette [46], (c) "cell stretcher" [45]

### Mesures locales

Pour une mesure plus locale, des sondes de tailles micrométriques, voire nanométriques, sont utilisées pour sonder différentes parties de la cellule. Pour ce type d'expérience, il est possible de faire des mesures actives ou passives à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule.

**Sondes extracellulaires** Il est possible de mesurer la rigidité de la membrane ou du cortex en attachant une bille à la membrane (face externe) et en la piégeant avec des pinces magnétiques [48] ou optiques (figure 1.7(b)) [49, 50, 26]. Les mesures passives consistent à mesurer les fluctuations de positions de la sonde. Des mesures actives peuvent être réalisées soit en régime sinusoïdal, soit en régime de fluage. Il est également possible de cartographier la rigidité d'une cellule en utilisant la microscope à force atomique (AFM) (figure 1.7(c)) [51, 52, 53].

**Sondes intracellulaires** Un autre type d'expérience permet de caractériser les propriétés mécaniques depuis l'intérieur de la cellule grâce à l'utilisation de sondes intracellulaires. Il est alors

possible de réaliser des expériences de microrhéologie intracellulaire passive et active. Les sondes peuvent être d'origine biologique, comme des granules (organelles endogènes) présentes naturellement dans la cellule [26, 27] ou des objets moins naturels mais néanmoins biologiques comme des phagosomes ou des endosomes magnétiques résultant respectivement de l'internalisation de billes ou de nanoparticules magnétiques. Ces objets isotropes peuvent servir de sondes pour des mesures passives et peuvent également être manipulés par des forces extérieures, afin de réaliser des mesures actives [54]. Il est également possible d'avoir des sondes anisotropes dans la cellule, telles que des chaînes d'endosomes ou de phagosomes magnétiques (figure 1.7(a)) [55, 56] ou encore des nanofils magnétiques [57]. Ces sondes peuvent être utilisées pour réaliser des mesures passives ainsi que des mesures actives en les soumettant à un couple magnétique et en faisant de mesure en régime sinusoïdale [24] ou des mesures de relaxation angulaire [58].

Il existe également un autre type de méthode faisant appel à des principes chimiques : des rotors moléculaires sont internalisées dans des cellules et sont excités par une source lumineuse. Les spectres d'absorption et d'émission de la molécules dépendent de la viscosité du cytoplasme [59].

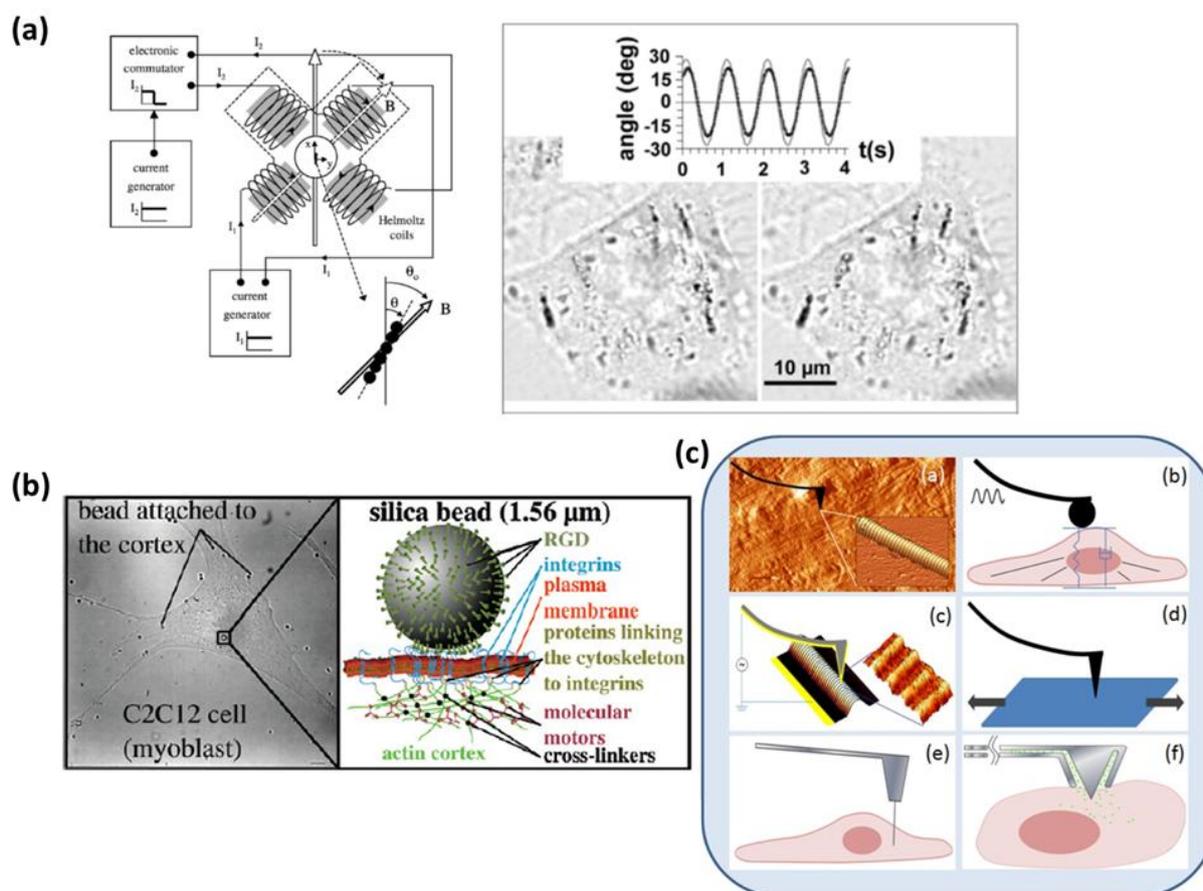


FIGURE 1.7 – Différents dispositifs permettant de mesurer les propriétés viscoélastiques locales de la cellule : (a) microrhéologie active avec des chaînes d'endosomes contrôlés par des électroaimants [58, 24], (b) pince optique pour contrôler une micro-bille de silice attachée à la membrane [50], (c) mesures par AFM [60]

## 1.4 Notre approche

Même si le trafic intracellulaire fait intervenir l'activité de moteurs moléculaires, l'efficacité du trafic intracellulaire dépend du milieu intracellulaire dans lequel il a lieu et de ses propriétés mécaniques. Pour répondre à des questions fondamentales sur le trafic intracellulaire, nous avons décidé de perturber le cytoplasme et de voir dans quelle mesure notre perturbation modifie le fonctionnement du trafic intracellulaire. Pour ce faire, nous avons choisi deux types de perturbations.

La première perturbation est d'origine mécanique et consiste à cisailer le cytoplasme en mettant en rotation des objets anisotropes et à regarder les effets sur le trafic intracellulaire. Dans cette optique, deux approches ont été mises-en œuvre :

- Dans la première approche, nous avons utilisé un seul et même objet (une chaîne d'endosomes magnétiques) pour sonder le trafic intracellulaire et pour réaliser la perturbation. Dans ce cas, nous agissons directement sur les acteurs du trafic intracellulaire. L'impact de cette perturbation est mesuré en comparant le comportement spontané des sondes avant et après la rotation (mesures passives). Sur ce même système et avec les mêmes sondes utilisées pour les mesures passives, nous avons réalisé des expériences de microrhéologie active, pour déterminer dans quelle mesure le cisaillement a modifié les propriétés viscoélastiques du cytoplasme.
- La deuxième approche consiste à dissocier les sondes pour le trafic intracellulaire et celles créant la perturbation mécanique. On mesure le trafic intracellulaire de vésicules de transport avant et après avoir fait tourner des objets anisotropes dans la zone d'intérêt.

La deuxième perturbation est d'origine photo-chimique et consiste à activer des molécules photosensibles. Nous avons étudié l'impact de cette photo-activation sur le trafic intracellulaire en comparant les mouvements spontanés de vésicules de transport avant et après la perturbation (mesures passives). Avec le même type de sonde, nous avons également effectué des mesures actives, visant à quantifier l'impact de la photo-activation sur la viscosité du cytoplasme.

Les molécules photosensibles utilisées pour créer la perturbation photo-chimique sont des agents thérapeutiques et peuvent être utilisées en thérapie anticancéreuse. Lorsque nous avons étudié l'impact de leur photo-activation sur le trafic intracellulaire, nous avons observé un phénomène très inattendu : systématiquement après photo-activation, de nombreuses vésicules sont expulsées par les cellules cancéreuses et ce de façon très rapide. Nous avons donc cherché à caractériser cette émission de vésicules en fonction de la dose en agent photosensible et nous l'avons comparé à celle induite par un autre traitement anticancéreux plus classique, par chimiothérapie.

# Matériel et méthodes

## Sommaire

<b>2.1</b>	<b>L'endosome magnétique et la chaîne d'endosomes magnétiques . . . .</b>	<b>19</b>
2.1.1	Comment obtenir des endosomes magnétiques ? . . . . .	19
2.1.2	Caractéristiques physiques de l'endosome magnétique . . . . .	19
2.1.3	La chaîne d'endosomes magnétiques . . . . .	20
<b>2.2</b>	<b>Dispositif de production de champ magnétique . . . . .</b>	<b>22</b>
2.2.1	Présentation du dispositif . . . . .	22
2.2.2	Manipulations magnétiques . . . . .	22
2.2.3	Installation du dispositif sous microscope . . . . .	23
<b>2.3</b>	<b>Préparation des échantillons . . . . .</b>	<b>24</b>
2.3.1	Culture cellulaire . . . . .	24
2.3.2	Marquage magnétique . . . . .	25
2.3.3	Traitement par les agents thérapeutiques . . . . .	26
2.3.4	Traitement au nocodazole . . . . .	26
2.3.5	Test de viabilité cellulaire . . . . .	27
2.3.6	Marqueurs fluorescents . . . . .	27
<b>2.4</b>	<b>Agents thérapeutiques . . . . .</b>	<b>27</b>
2.4.1	Agents photothérapeutiques : m-THPC et TPCS <sub>2a</sub> . . . . .	27
2.4.2	Agent chimiothérapeutique : doxorubicine . . . . .	30
<b>2.5</b>	<b>Mesures passives : suivi de particules . . . . .</b>	<b>30</b>
2.5.1	Perturbation mécanique . . . . .	30
2.5.2	Perturbation photo-chimique . . . . .	31
2.5.3	Quantification du trafic intracellulaire . . . . .	32
<b>2.6</b>	<b>Mesures actives : microrhéologie du cytoplasme . . . . .</b>	<b>34</b>
2.6.1	Mesures de relaxation . . . . .	34
2.6.2	Mesures de viscosité effective . . . . .	34
2.6.3	Calibration du champ . . . . .	35
<b>2.7</b>	<b>Système <i>in vitro</i> . . . . .</b>	<b>36</b>
2.7.1	Polymérisation des microtubules . . . . .	36
2.7.2	Extraction des endosomes magnétiques . . . . .	38
2.7.3	Préparation des échantillons . . . . .	38
<b>2.8</b>	<b>Caractérisation des vésicules émises après traitements anticancéreux . . . . .</b>	<b>41</b>
2.8.1	Comptage des vésicules . . . . .	41

---

2.8.2	Analyses protéomiques et génomiques . . . . .	41
2.8.3	Origine des vésicules . . . . .	41
<b>2.9</b>	<b>Imagerie . . . . .</b>	<b>42</b>
2.9.1	Microscopie optique . . . . .	42
2.9.2	Microscopie confocale . . . . .	42
2.9.3	Microscopie électronique . . . . .	42
<b>2.10</b>	<b>Statistiques . . . . .</b>	<b>43</b>

---

Dans cette partie vont être présentés le matériel expérimental ainsi que les techniques utilisés pour réaliser chacune des expériences présentées dans ce manuscrit.

## 2.1 L'endosome magnétique et la chaîne d'endosomes magnétiques

### 2.1.1 Comment obtenir des endosomes magnétiques ?

Dans toutes les expériences nous avons un outil commun : l'endosome magnétique. Il a un rôle dans les mesures passives de suivi du trafic intracellulaire, il joue un rôle principal dans l'application d'une perturbation mécanique, il a été utilisé pour réaliser des mesures actives de microrhéologie, pour les chapitres concernant les perturbations mécanique (chapitre 3) et photochimique (chapitre 4) et nous avons tiré avantage de son aimantation afin de l'utiliser comme indicateur de localisation, dans le cas de la vésiculation.

Son obtention est relativement simple, les protocoles de marquage magnétique étant bien connus par l'équipe NanoBioMag, formée de Claire Wilhelm, Florence Gazeau, Nathalie Luciani, Amanda Brun et Myriam Reffay. Il est obtenu après internalisation de nanoparticules magnétiques (figure 2.1). Les nanoparticules que nous utilisons, sont des particules superparamagnétiques de maghémite recouvertes de citrate. Elles ont un diamètre d'environ 8 nm et sont chargées négativement. Lors du marquage des cellules, les nanoparticules sont diluées dans du milieu de culture dépourvu de sérum pour éviter l'agrégation des nanoparticules. Après sédimentation, la charge des particules favorise l'adsorption des nanoparticules à la membrane des cellules (figure 2.1 (e)) [61]. Celles-ci effectuent des échanges perpétuels entre le milieu extérieur et le cytoplasme, ce qui induit une entrée des particules dans le cytoplasme par endocytose. Le matériel magnétique va alors se retrouver encapsulé dans des compartiments membranaires, qui sont par ordre chronologique : les endosomes primaires, les endosomes précoces, les endosomes tardifs et finalement les lysosomes (figure 2.1 (f) et (g)).

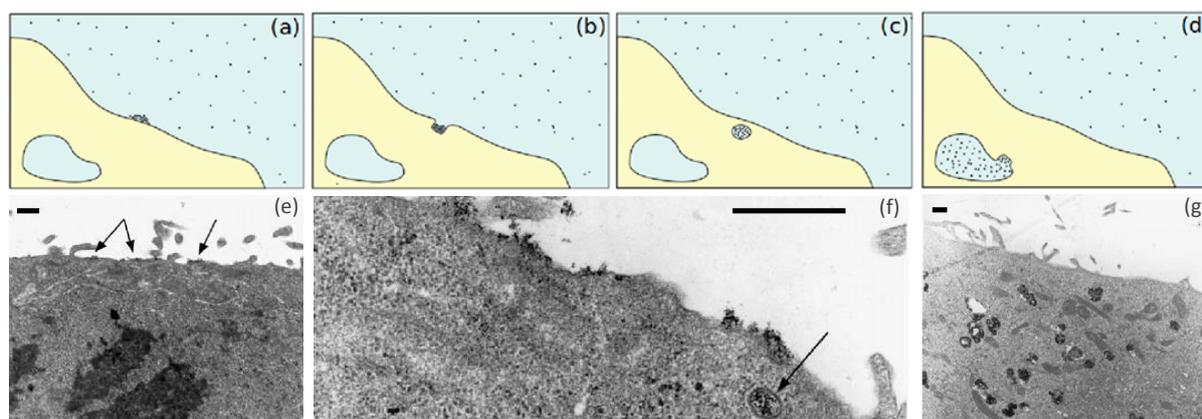


FIGURE 2.1 – Internalisation de nanoparticules magnétiques (a),(b), (c) et (d) : schématisation. (e),(f) et (g) : microscopie électronique (barre d'échelle 1  $\mu\text{m}$ ) [61]. (a),(e) : interactions électrostatiques avec la membrane, (b),(f) : invagination de la membrane, (c),(f) : endocytose des nanoparticules (les nanoparticules se retrouvent dans les endosomes précoces), (d),(g) : concentration des nanoparticules dans les endosomes tardifs et les lysosomes.

### 2.1.2 Caractéristiques physiques de l'endosome magnétique

Les particules utilisées sont des nanoparticules superparamagnétiques. Chaque nanoparticule magnétique contient plusieurs domaines aimantés, dont les moments magnétiques ne sont pas alignés en l'absence de champ magnétique. Par contre en présence d'un champ magnétique, les particules présentes dans les endosomes acquièrent un moment magnétique. La somme des moments magnétiques de toutes les particules présentes dans chaque endosome, donne alors son propre moment magnétique à l'endosome. L'aimantation induite de l'endosome nous permet alors de le manipuler spatialement via des champs magnétiques. Nous pouvons en particulier, utiliser cette propriété pour les extraire de la cellule et les concentrer (protocole décrit dans la partie 2.15).

#### Dimension des endosomes

Lorsque nous regardons la solution contenant des endosomes magnétiques, du fait de leur petite taille ( $< 1\mu m$ ), nous pouvons observer les fluctuations thermiques auxquels sont soumis les endosomes. Il est alors possible de mesurer leur mouvement Brownien et d'enregistrer leur trajectoire. La solution dans laquelle les endosomes sont plongés, étant une solution aqueuse majoritairement constituée d'eau, sa viscosité est de  $\eta = 10^{-3}$  Pa.s. Le mouvement des endosomes dans la solution, correspond à un mouvement diffusif dans un fluide Newtonien (purent visqueux). A partir de la trajectoire des endosomes, nous pouvons calculer leur déplacement quadratique moyen (MSD, pour Mean Square Displacement), à partir des coordonnées  $(x,y)$ . La relation entre le MSD (en 2D) et le temps est donnée par la relation :

$$\langle \Delta r^2(t) \rangle = 4Dt \quad (2.1)$$

avec  $D$  la constante de diffusion définie par la relation de Stokes-Einstein par :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \quad (2.2)$$

où  $k_B = 1,38 * 10^{-23} \text{m}^2 \text{kg s}^{-2} \text{K}^{-1}$  est la constante de Boltzmann,  $T$  la température,  $\eta$  la viscosité de la solution et  $r$  le rayon des endosomes. L'ordre de grandeur du rayon d'un endosome est de  $0.6 \mu m$ . Les résultats de ces mesures sont donnés dans chaque partie concernée.

#### Moment magnétique des endosomes

Après avoir isolé les endosomes magnétiques, il nous est également possible de mesurer leur moment magnétique. Pour cela, nous avons utilisé un dispositif appelé micromagnétophorèse (figure 2.2) [62]. L'idée est de plonger un micro-fil de nickel dans une solution contenant des endosomes magnétiques. En approchant un aimant permanent du fil de nickel, la solution est alors plongée dans un gradient de champ magnétique, dont le profil de champ est connu. Le dispositif est placé horizontalement de façon à s'affranchir de la force de pesanteur.

Lorsque les endosomes sont en mouvement dans la solution, du fait de la présence d'un champ magnétique, la force de frottements visqueux  $\vec{F}_v = -6\pi\eta r \vec{v}$  (où  $\eta$  est la viscosité du liquide,  $r$  le rayon de l'endosome et  $\vec{v}$  sa vitesse) va équilibrer la force magnétique  $\vec{F}_B = \overrightarrow{grad}(m_{endo} \cdot \vec{B})$  (où  $\vec{B}$  est le champ magnétique et  $m_{endo}$  le moment magnétique de l'endosome). Nous pouvons ainsi déduire leur aimantation en mesurant la vitesse de déplacement des endosomes :

$$m_{endo} = \frac{6\pi\eta r v}{\frac{dB}{dx}} \quad (2.3)$$

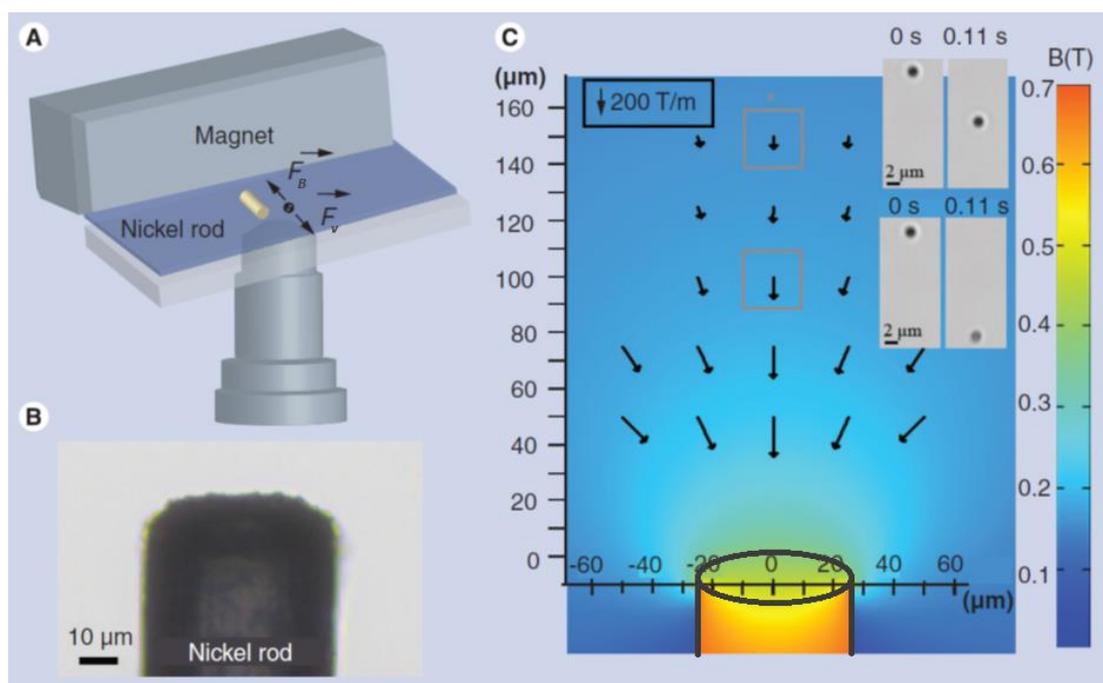


FIGURE 2.2 – Micromagnétophorèse [62]. (A) : présentation de la chambre contenant le micro-fil de nickel. (B) : image en microscopie du micro-fil. (C) : Profil de vitesse des endosomes magnétiques en présence d'un gradient de champ magnétique.

La valeur du moment magnétique dépend du champ magnétique, des nanoparticules mais aussi des conditions de marquage et du type cellulaire. L'ordre de grandeur du moment magnétique d'endosomes est de  $10^{-15} - 10^{-16}$  A.m<sup>2</sup>. Les valeurs exactes seront données ci-après, dans les parties correspondantes aux différentes expériences.

### 2.1.3 La chaîne d'endosomes magnétiques

Comme nous l'avons vu ci-dessus, la force magnétique dépend du gradient de champ magnétique. Pour mettre en mouvement un endosome unique à l'aide d'un champ magnétique, il faut donc un gradient de champ assez puissant, ce qui est souvent difficile à obtenir lorsqu'on veut un dispositif de petite taille. En revanche, une chaîne d'endosomes qui est un objet magnétique anisotrope peut être mis en rotation par un couple de champ magnétique ( $\Gamma_B = \vec{m} \wedge \vec{B}$ ), qui lui est proportionnel au champ. C'est donc la chaîne d'endosomes magnétiques qui a été choisie pour réaliser des mesures de microrhéologie intracellulaire (comme décrit dans cet article [58]). Grâce à la présence de nanoparticules magnétiques dans les endosomes, nous avons la possibilité de former des chaînes d'endosomes magnétiques en soumettant notre échantillon à un champ magnétique. En effet, le matériel magnétique présent dans les endosomes étant superparamagnétique, lorsqu'on met les endosomes en présence d'un champ magnétique, ils acquièrent un moment magnétique et se comportent alors comme des petits aimants. Lorsque plusieurs endosomes sont au voisinage les uns des autres, l'énergie d'attraction entre deux endosomes, donnée par l'énergie dipôle-dipôle (équation 2.4) est alors suffisante pour les aligner et des chaînes de 2 à 8 endosomes se forment spontanément (figure 2.3).

$$E_{\text{dipôle-dipôle}} = \frac{-2\mu_0 m^2}{a^3} \quad (2.4)$$

où  $\mu_0$  est la perméabilité magnétique du vide ( $4\pi 10^{-7}$  kg.m.A<sup>-2</sup>.s<sup>-2</sup>),  $m$  le moment magnétique d'un endosome, et  $a$  la distance entre deux endosomes.



FIGURE 2.3 – Image au microscope avec objectif à immersion 63X montrant la présence de chaînes d'endosomes magnétiques à l'intérieur des cellules.

La cohésion au sein d'une chaîne d'endosomes en présence de champ magnétique est alors suffisante pour avoir des objets anisotropes que l'on peut mettre en mouvement, en particulier via des champs magnétiques d'orientation variable. De plus cet objet présente un autre avantage, qui est que la chaîne d'endosomes magnétiques participe au trafic intracellulaire de la même façon qu'un endosome unique. La chaîne d'endosomes magnétiques peut donc servir de sonde pour le trafic intracellulaire (sondes passives) et peut être manipulée par des champs magnétiques (sondes actives, micromixeurs) (voir partie 3).

## 2.2 Dispositif de production de champ magnétique

### 2.2.1 Présentation du dispositif

Afin d'appliquer un champ magnétique sur les chaînes, nous avons développé, au sein même du laboratoire, un dispositif constitué de 4 électro-aimants (figure 2.4). Les 4 bobines entourent chacune une partie en fer doux, se terminant par une pointe, et sont couplées deux-à-deux (face à face). Le dispositif est équipé d'une diode électroluminescente afin d'éclairer l'échantillon par le dessus (microscope inversé). L'intensité et la direction du champ magnétique sont contrôlées par un

générateur de basses fréquences couplé avec un amplificateur qui alimente les bobines. Lors de la mise sous tension des deux couples de bobines, les courants  $I_1$  circulant dans le premier couple de bobines et  $I_2$  dans le deuxième couple de bobines, induisent un champ magnétique dans les parties ferriques et des lignes de champs sont guidées vers le centre du dispositif. Nous pouvons faire varier l'intensité du champ magnétique au centre en faisant varier l'intensité du courant qui parcourt les bobines. Avec ce dispositif nous avons la possibilité de créer un champ magnétique dont l'intensité est quasi-homogène au centre du dispositif (sur  $600\mu\text{m}$ ) et peut aller jusqu'à  $80\text{mT}$ .

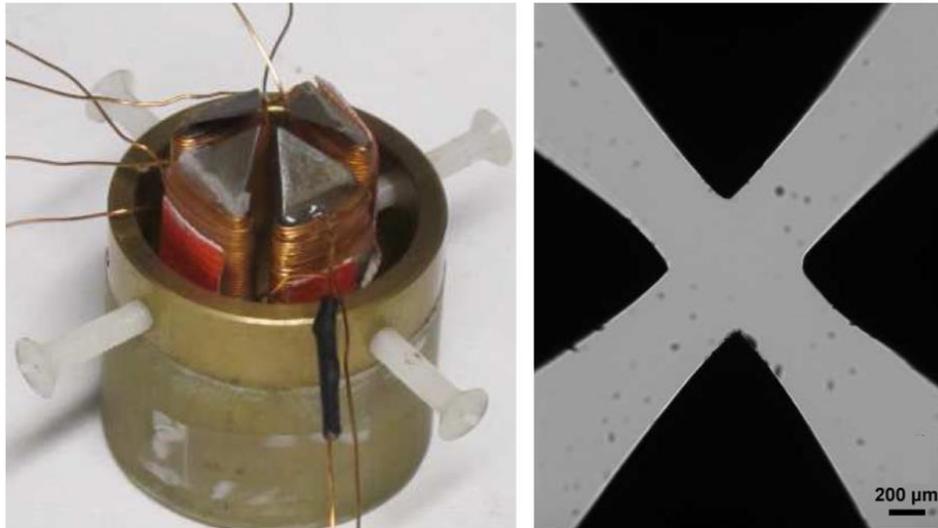


FIGURE 2.4 – Dispositif magnétique : (a) il est constitué de deux paires de bobines entourant quatre pièces de fer doux usinées (vue du dessous), (b) l'espace entre les pièces magnétiques est de  $0.6\ \mu\text{m}$ . Le champ magnétique au centre peut aller jusqu'à  $80\ \text{mT}$  (pour un courant de  $1\text{A}$ ) (vue au microscope X10).

### 2.2.2 Manipulations magnétiques

#### Champ magnétique constant

Nous avons la possibilité de former des chaînes sous microscope en appliquant un courant  $I_1 \neq 0$  et  $I_2 = 0$ . De cette façon, nous créons un champ magnétique constant, suivant lequel s'alignent les moments des endosomes magnétiques. Les endosomes magnétiques se comportent comme de petits aimants, qui vont s'attirer les uns aux autres en formant des chaînes de plusieurs endosomes. La position angulaire du champ dans cette configuration définit l'angle  $\beta_0$ .

#### Champ magnétique tournant

Notre dispositif nous permet également de créer des champs magnétiques tournants. Le premier couple de bobines, est soumis à un courant sinusoïdal ( $I_1$ ) en quadrature avec le courant circulant dans le deuxième couple de bobines ( $I_2$ ). Ainsi, si on a

$$\begin{cases} I_1(t) = I_0 \sin(\omega t) \\ I_2(t) = I_0 \cos(\omega t) \end{cases} \quad (2.5)$$

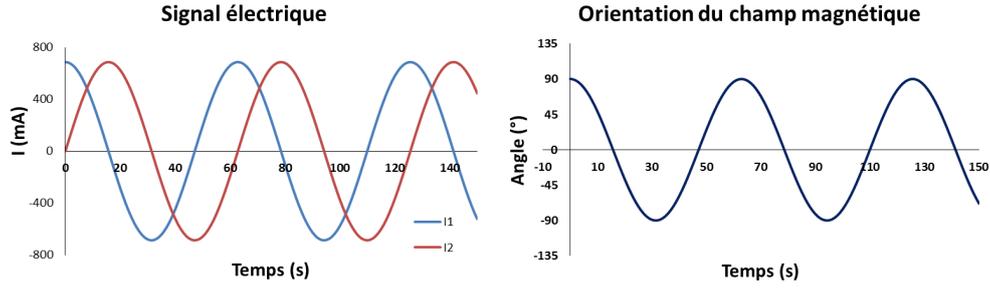


FIGURE 2.5 – Champ magnétique tournant. Gauche : courant des couples de bobines en fonction du temps, droite : champ magnétique résultant

des objets anisotropes et magnétiques sont alors soumis au couple magnétique rotationnel et suivent la rotation du champ. L'expression du couple magnétique est donné par la relation 2.6.

$$\Gamma_m = \Gamma_0 \frac{\sin(2\varphi)}{2} \quad (2.6)$$

où  $\varphi = \beta - \theta$  est le déphasage entre la position angulaire du champ magnétique ( $\beta$ ) et de la chaîne ( $\theta$ ) et  $\Gamma_0 = \frac{3\mu_0 m^2 N_e^2}{4\pi d^3}$  avec  $\mu_0 = 4\pi 10^{-7} \text{ kg m A}^{-2} \text{ s}^{-2}$  la permittivité magnétique du vide,  $m$  le moment magnétique d'un endosome,  $N_e$  le nombre d'endosomes formant la chaîne et  $d$  le diamètre d'un endosome [63, 64] (voir annexe 8.1 pour plus de détails).

### Champ magnétique à sauts angulaires

Nous avons élaboré un protocole nous permettant de faire des mesures de relaxation de la position angulaire d'une chaîne d'endosomes. Pour ce faire nous avons créé un signal de type "escaliers" nous permettant de changer instantanément la direction du champ de  $0$  à  $180^\circ$  par pas de  $45^\circ$ , soit 4 sauts d'environ  $45^\circ$ . Le profil de courant imposé dans les deux couples de bobines est indiqué figure 2.6.

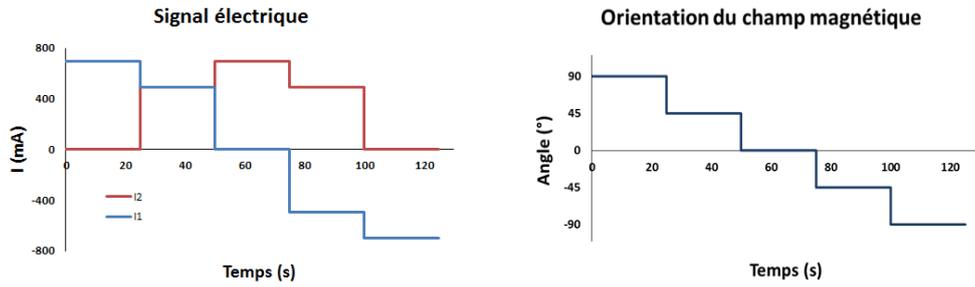


FIGURE 2.6 – Champ magnétique à sauts angulaires ( $4 \times 45^\circ$ ). Gauche : courant des couples de bobines en fonction du temps, droite : champ magnétique résultant.

Le couple magnétique dépend du déphasage entre la position angulaire du champ et de la chaîne ( $\varphi$ ). Après un saut de la direction du champ, on peut observer la relaxation de la direction de la chaîne en fonction du temps, ce qui nous donne des informations sur les propriétés mécaniques du milieu entourant la chaîne.

### 2.2.3 Installation du dispositif sous microscope

Le dispositif à production de champ magnétique est installé sur un microscope inversé (Leica DMIRB). Avant tout contact avec les échantillons, l'extrémité des 4 parties en fer doux est stérilisée avec de l'éthanol à 70% puis rincée avec de l'eau. Une fois l'échantillon installé sous le microscope, nous plongeons le dispositif dans le milieu de culture, grâce à un micromanipulateur développé au laboratoire. De cette façon, nous approchons le dispositif au plus près des cellules, afin de créer des champs magnétiques dont les lignes de champs sont quasiment dans le même plan que les cellules.

## 2.3 Préparation des échantillons

### 2.3.1 Culture cellulaire

#### MSC : mesenchymal stem cells

Dans les expériences de perturbation mécanique (chapitre 3), nous avons utilisé de cellules souches mésenchymateuses humaines (MSC). Les MSC sont cultivées dans du "Mesenchymal Stem Cell Growth Medium" (MSCBM) complété avec 10% (v/v) de sérum, 2% (v/v) de glutamine, 0.1% (v/v) d'antibiotiques (gentamycine et amphotéricine B) (selon les instructions du fabricant Lonza) à 37°C, sous atmosphère humide avec un taux contrôlé de CO<sub>2</sub> à 5%. Les cellules sont décollées avec de la trypsine et divisées au maximum au 1 :5 deux fois par semaine. Outre le fait que ce type de cellules ouvre des perspectives pour le suivi des propriétés mécaniques pendant la différenciation cellulaire (sujet non traité dans ce manuscrit), les cellules souches ont la particularité de contenir un grand nombre de vésicules intracellulaires et d'être très étalées sur le substrat, nous offrant ainsi un système quasi 2D, avantageux pour le suivi de particules intracellulaires. De plus, leur comportement ne semble pas être modifié par le marquage magnétique. Elles constituent donc un système idéal pour le suivi du trafic intracellulaire par microscopie.

Nous fabriquons des cuves à fond en verre, en collant des lamelles couvre-objet de 35 mm de diamètre à un cylindre de plexiglas du même diamètre et d'une hauteur de 5 mm, avec une colle à base de silicone. Ce type de cuves nous permet l'utilisation d'objectifs à immersion pour la microscopie et est idéal dans le cas de l'utilisation du dispositif magnétique (décrit ci-dessus) car des cuves trop hautes et trop étroites seraient en contact avec le dispositif nous privant d'une liberté de mouvement. La cuve est stérilisée dans un bain d'éthanol à 70% pendant 15 min puis rincée 2 fois avec de l'eau stérile (eau pour culture cellulaire). La surface des lamelles est ensuite traitée avec du sérum de veau fœtal pendant 15 min, afin de favoriser l'adhésion des cellules. Les cuves sont ensuite rincées avec du MSCBM complet. Les cellules sont alors ensemencées à 75% de confluence de sorte d'avoir environ 85% le lendemain (conditions idéales pour le marquage magnétique).

#### PC3 : prostate cancer cell line

Dans les parties concernant la perturbation photo-chimique et la vésiculation (chapitres 4 et 5), nous avons utilisé des cellules de cancer prostatique humain, issue de la lignée PC-3 (ATCC® CRL-1435™). Elles sont cultivées à 37°C et sous atmosphère humide avec un taux contrôlé de CO<sub>2</sub> à 5%, dans des T75 en milieu Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) complété avec 10% (v/v) de sérum de veau fœtal et 1% (v/v) de pénicilline-streptomycine. Les cellules sont décollées avec de la trypsine et divisées entre 1 : 4 et 1 : 10 deux à trois fois par semaine.

Pour la partie perturbation photo-chimique (chapitre 4), les cuves à fond en verre sont les mêmes que celles utilisées dans la partie "perturbation mécanique" (fond en verre, Ø35mm). Les

cellules sont stérilisées, traitées puis ensemencées à 60 % de confluence de sorte d'avoir environ 90 % le lendemain.

La seule différence pour la partie vésiculation (chapitre 5) est que nous avons fabriqué des cuves d'un diamètre de 10 mm, ce qui nous a permis de manipuler des plus petits volumes.

### 2.3.2 Marquage magnétique

Le lendemain de l'ensemencement des cellules, elles ont adhéré au substrat et nous pouvons effectuer les marquages magnétiques nécessaires aux différentes expériences.

Chaque système fait appelle à des protocoles de marquage différentes, mais les marquages ont toujours été effectués dans du "Roswell Park Memorial Institute medium" (RPMI) (milieu de culture cellulaire minimal sans sérum, sans antibiotique), contenant du citrate et des nanoparticules. Le temps entre la fin de l'incubation et les expériences est appelé *chasse*. Les paramètres variables sont :

- la concentration en nanoparticules : plus la concentration en nanoparticules est grande, plus il y aura de matériel magnétique dans les cellules. Seulement ceci est vrai que pour des concentrations inférieures à une concentration limite à partir de laquelle les nanoparticules ont tendance à s'agréger, rendant leur internalisation plus difficile.
- la concentration en citrate : le citrate de sodium ou acide citrique évite l'agrégation des nanoparticules, mais là aussi une trop grande concentration diminuerait l'efficacité du marquage, car la culture cellulaire en milieu acide n'est pas idéale (malgré le fait que le milieu de culture soit tamponné).
- le temps d'incubation : la quantité intracellulaire après marquage dépend également du temps de marquage. Cependant, il y a un temps d'incubation limite au-delà duquel la quantité intracellulaire en nanoparticules sature.
- la température : le marquage peut être effectué à 37°C auquel cas, les nanoparticules sont endocytées, ou à 4°C auquel cas les nanoparticules ont tendance à rester à la membrane plasmique. Cependant tous les marquages ont été réalisés à 37°C.
- la présence ou non d'un champ magnétique pendant l'incubation : en présence d'un champ magnétique et en particulier d'un gradient de champ pendant l'incubation, les nanoparticules vont être attirées vers les cellules de manière plus efficace que lors d'une sédimentation par gravitation. Il s'en suit une adsorption au niveau de la membrane d'un nombre plus important de nanoparticules et finalement une plus grande quantité de matériel magnétique intracellulaire après marquage.
- la présence ou non d'un champ magnétique pendant la chasse : la présence d'un aimant pendant la chasse peut être nécessaire si l'expérience nécessite la présence de chaînes d'endosomes magnétiques longues.
- la durée de la chasse : une fois l'incubation lancée, les nanoparticules vont suivre la voie d'endocytose et par conséquent vont se retrouver par ordre chronologique à la membrane, dans les endosomes précoces, dans les endosomes tardifs pour finir dans les lysosomes. Plus le temps entre la fin de l'incubation et le début de l'expérience est long plus les nanoparticules auront de chance de se trouver dans les endosomes tardifs et les lysosomes. Au contraire si la chasse est courte, les nanoparticules se trouveront plutôt à la membrane ou dans les endosomes précoces.

Les conditions de marquage pour les différents systèmes sont regroupées dans le tableau 2.1 :

**1 - Pour le suivi du trafic intracellulaire de chaînes d'endosomes dans le cas d'une perturbation mécanique (chapitre 3) :** l'idée est d'avoir des chaînes d'endosomes isolées les unes des autres, afin d'éviter les interactions entre chaînes et d'avoir un mouvement des chaînes qui ne serait pas dû à un phénomène intracellulaire naturel. Nous avons donc mis en place un protocole

de marquage, nous permettant de n'avoir qu'un petit nombre d'endosomes magnétiques et ainsi une petite quantité de chaînes d'endosomes.

**2 - Pour le suivi du trafic intracellulaire d'endosomes uniques non magnétiques dans le cas d'une perturbation mécanique (chapitre 3)** : dans cette partie, les endosomes magnétiques vont uniquement être utilisés comme acteurs de la perturbation mécanique. Dans le sens où nous voulons un cisaillement global d'une zone cellulaire, nous avons imaginé un protocole de marquage magnétique induisant la production d'un grand nombre d'endosomes magnétiques. Les nanoparticules magnétiques et la concentration d'incubation sont les mêmes que pour la condition (1), seulement afin d'optimiser l'entrée des nanoparticules dans les cellules, et ce pendant toute la durée du marquage, nous plaçons les cellules sur un aimant permanent.

**3 - Pour le suivi du trafic intracellulaire d'endosomes magnétiques et de mesure de viscosité effective dans le cas d'une perturbation photo-chimique (chapitre 4)** : le système utilisé pour les mesures passives et actives est le même. Afin de réaliser des mesures de viscosité effective, nous voulions un maximum de chaînes d'endosomes magnétiques pouvant tourner librement.

**4 - Pour l'étude de l'origine (intracellulaire ou membranaire) des vésicules (chapitre 5)** : nous voulions marquer magnétiquement d'une part, les endosomes tardifs et les lysosomes et d'autre part la membrane. Les mêmes conditions de marquage sont utilisées dans les deux cas, seule la durée de la chasse diffère : chasse de la nuit pour la condition intracellulaire et aucune chasse pour la condition membranaire.

	type cellulaire	[citrate] (mM)	[maghémite] (mM)	durée d'incubation
1	MSC (chaînes)	5	0.5	30min
2	MSC (endosomes)	5	0.5	30min
3	PC3 (trafic)	1	2	2h
4	PC3 (vésiculation)	1	2	30min

TABLE 2.1 – Conditions de marquage magnétique correspondant aux différents systèmes : 1 - perturbation mécanique du trafic intracellulaire d'une chaîne d'endosomes et mesure de viscoélasticité, 2 - perturbation mécanique du trafic intracellulaire d'un endosome unique, 3 - perturbation photo-chimique du trafic intracellulaire d'un endosome et mesure de viscosité effective, 4 - étude de l'origine (intracellulaire ou membranaire) des vésicules.

A la fin du marquage, les cellules sont rincées 3 fois avec du RPMI puis remises en culture dans du milieu complet frais.

Les cellules ont seulement été mises en présence d'un champ magnétique pendant l'incubation et la chasse dans le cas de la préparation des échantillons prévus pour l'étude du trafic intracellulaire d'endosomes uniques (perturbation mécanique, chapitre 3). Sauf pour l'étude de la vésiculation des PC3 (chapitre 5), nous laissons les cellules en chasse toute la nuit.

### 2.3.3 Traitement par les agents thérapeutiques

Deux types de molécules thérapeutiques ont été utilisées :

- agent photosensibles : m-THPC et TPCS<sub>2a</sub>,
- agent chimiothérapeutique : doxorubicine.

Ces molécules rentrent passivement dans les cellules. Le marquage consiste donc simplement à les diluer dans le milieu de culture.

### Incubation des photosensibilisateurs

Pour la préparation des échantillons prévus pour l'étude d'une perturbation photochimique (chapitre 4), les cellules sont traitées avec l'un ou l'autre des agents photosensibles (m-THPC ou TPCS<sub>2a</sub>). L'incubation avec la drogue se fait en même temps que l'incubation des nanoparticules à une concentration en photosensibilisateur de 5 µM (co-incubation d'une durée de 2h).

Pour la préparation des échantillons prévus pour la vésiculation (chapitre 5), les cellules sont incubées à différentes concentrations (0.02, 0.08, 0.2, 0.5, 2 et 10 µM) en m-THPC dans du RPMI pendant 2 heures à 37°C et à l'abri de la lumière. Les cellules sont ensuite rincées 3 fois avec du RPMI puis remises en culture dans 250 µl de DMEM complet jusqu'au lendemain.

### Traitement par doxorubicine

Les cellules sont incubées avec différentes concentrations (0.1, 0.5, 2, 5, 10 et 50 µM) de doxorubicine dans du DMEM complet pendant 2 heures à 37°C et à l'abri de la lumière. Les cellules sont ensuite rincées 3 fois avec du RPMI puis remises en culture dans 250 µl de DMEM complet.

#### 2.3.4 Traitement au nocodazole

Pour évaluer le rôle des microtubules dans le trafic intracellulaire et leur contribution dans la valeur de la viscosité, les microtubules ont été dépolymérisés avec un agent antiméiotique. Les cellules sont traitées avec du Nocodazole (Sigma Aldrich) à une concentration de 10 mM pendant 30 min à 37°C.

#### 2.3.5 Test de viabilité cellulaire

Afin de tester la viabilité des cellules et la validité des mesures effectuées dans les cellules après traitements, nous avons fait un test d'activité métabolique à l'alar blue (Sigma), 2h après traitement (chapitre 4). Nous avons également fait des tests 24h après traitement pour vérifier l'efficacité des traitements (chapitres 4 et 5).

#### 2.3.6 Marqueurs fluorescents

Dans les différentes études menées lors de ma thèse et en particulier dans le cadre de l'étude de la vésiculation (chapitre 5), nous avons fait des marquages en fluorescence de la membrane et du noyau. Nous avons également utilisé des marqueurs de l'apoptose, tel que l'annexine V.

### Marquage de la membrane

Pour marquer la membrane de cellules vivantes, nous avons utilisé du PKH-67 (Sigma Aldrich).

Les cellules sont rincées avec du tampon "diluent c" (fourni avec le produit de marquage), puis on ajoute la même quantité de "diluent c" + 1% (v/v) de "dye" et on laisse incubé pendant 15 min à 37°C à l'abri de la lumière. Ensuite on ajoute le même volume contenu dans la cuve de sérum de veau fœtal (pur) pour une incubation de 2 min. Puis à nouveau le double de volume en DMEM complet. Les cellules sont ensuite remises en culture dans du DMEM complet frais.

## Marquage du noyau

Pour marquer le noyau des cellules, nous avons utilisé du DAPI (Sigma Aldrich). Nous avons fait le marquage sur cellules fixées avec du paraformaldéhyde (PFA) à 4% pendant 15 min à température ambiante. Les cellules sont incubées avec du DAPI à une concentration de 1/1000 dans du PBS pendant 15 min à température ambiante puis rincées avec du PBS. Les cellules fixées sont conservées dans du PBS à 4°C et à l'abri de la lumière.

## Indicateur de l'apoptose

Dans le cadre de l'étude de la vésiculation (chapitre 5), les cellules ont été incubées, à différents stades après le traitement par photothérapie avec de l'annexine V, un marqueur de l'apoptose. Les cellules vivantes sont marquées avec 2% d'annexine V dans le tampon fourni avec le kit pendant 2 min à température ambiante. Même si les cellules sont destinées à être fixées, le marquage à l'annexine V est effectué avant la fixation pour éviter un marquage de la phosphatidylsérine sur la membrane interne (la membrane plasmique étant perméabilisée par l'étape de fixation au PFA). Après l'incubation les cellules sont rincées avec du PBS, puis remises en culture dans du DMEM complet.

## 2.4 Agents thérapeutiques

### 2.4.1 Agents photothérapeutiques : m-THPC et TPCS<sub>2a</sub>

La photo-activation de molécules photosensibles consiste à exciter une molécule photosensible, ce qui induit la production de radicaux libres nocifs pour les cellules. L'émission des radicaux libres, suite à l'exposition des agents photosensibles, engendre une cascade de réactions au niveau cellulaire, et notamment une déstabilisation de la membrane qui trouve des applications en thérapie anticancéreuse (cas du m-THPC) ou lors d'une médication ciblée (cas du TPCS<sub>2a</sub>).

Les deux photosensibilisateurs utilisés, le m-THPC et le TPCS<sub>2a</sub>, sont deux chlorines qui ont un rendement similaire en radicaux libres.

#### Le m-THPC (Foscan)

Le m-THPC ou méso-tétrahydroxyphenylchlorine, fourni par Frontier Scientific (Logan UT, USA) est un photosensibilisateur de seconde génération. C'est une molécule hydrophobe, qui a tendance à s'agréger dans un milieu polaire. Cependant lorsqu'il est en présence de protéines hydrophobes, notamment dans le cytoplasme, il se combine à celles-ci, induisant une localisation intracellulaire homogène dans le cytoplasme (en dehors du noyau) [65] (figure 2.7). Le m-THPC est utilisé en thérapie photodynamique (PDT, pour "photodynamic therapy) pour des cancers tels que les cancers du cerveau, des poumons, du pancréas, de la peau et de la prostate. Le principe consiste à injecter une dose de photosensibilisateur par voie intraveineuse et d'exposer à la lumière (laser) de façon sélective, la tumeur du patient [66].

#### Le TPCS<sub>2a</sub>

TPCS<sub>2a</sub> ou tétraphénylchlorine disulfonée, nous a été fourni par PCI Biotech AS, Oslo, Norway, avec une pureté minimum de 98%. C'est une molécule amphiphile chargée, son affinité aux lipoprotéines et aux phospholipides lui donne une localisation intracellulaire dans des vésicules

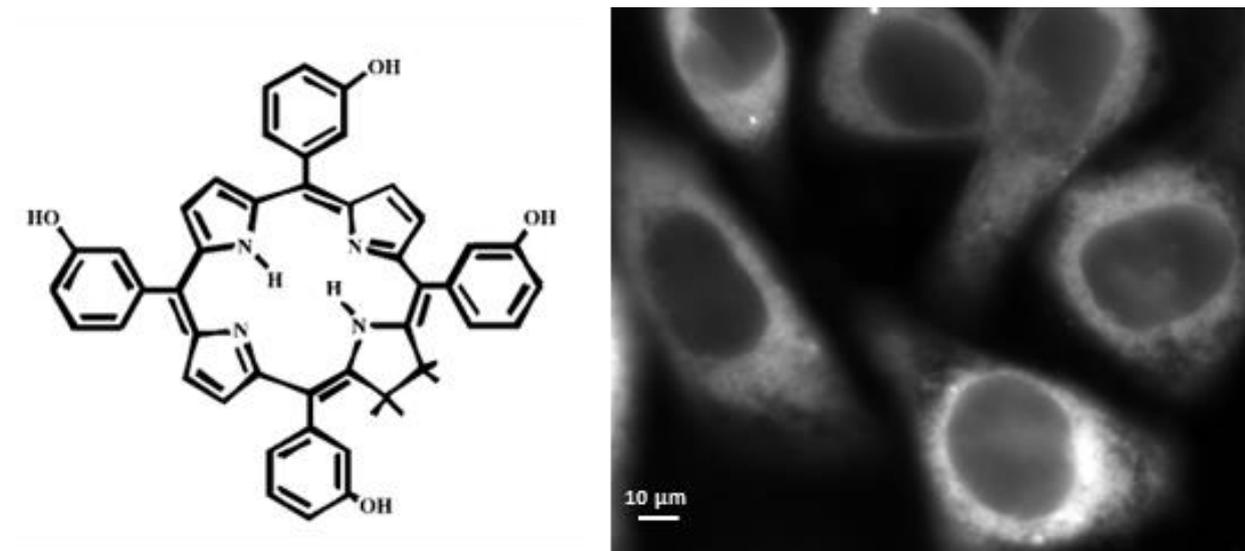


FIGURE 2.7 – Structure moléculaire du m-THPC (m-tétrahydroxyphénylchlorine) [67] et sa localisation intracellulaire homogène dans le cytoplasme.

d'endocytose (figure 2.8). Cette molécule est utilisée en médication ciblée (PCI pour "photochemical internalization"), car son exposition induit une déstabilisation de la membrane des endosomes et pouvant libérer une drogue internalisée au préalable.

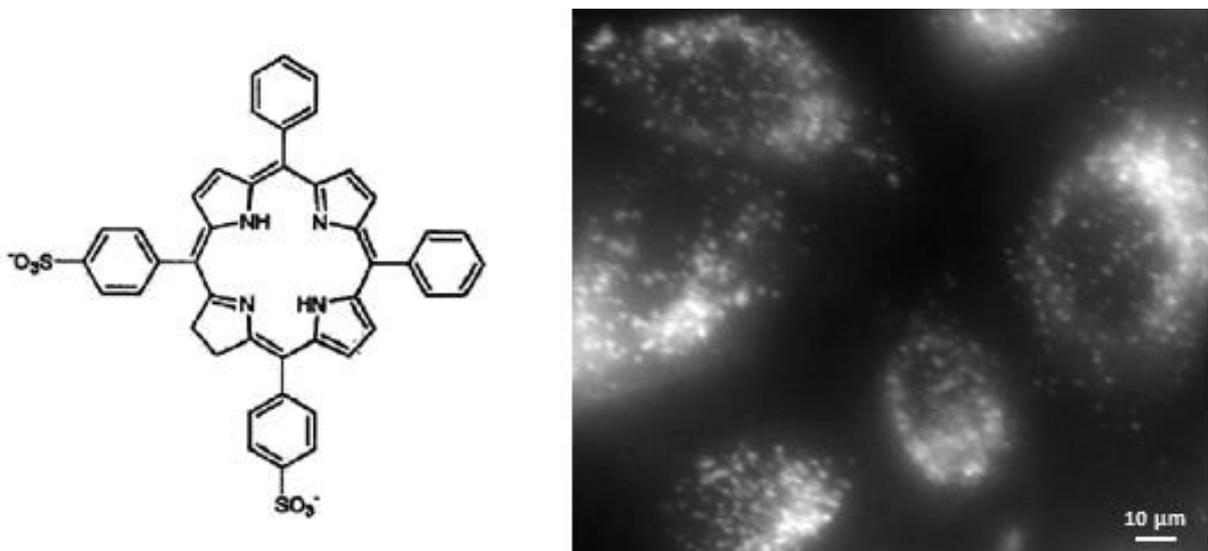


FIGURE 2.8 – Structure moléculaire du TPCS<sub>2a</sub> (di(monoethanolammonium) meso-tetraphénylchlorin disulphonate) [68] et sa localisation intracellulaire dans les endosomes/lysosomes.

## Photo-activation

Le principe de la photo-activation est d'exciter une molécule photosensible. Celle-ci va se désexciter selon de diagramme de Jablonski (figure 2.9) soit par émission de photons (fluorescence), soit en réalisant des réactions chimiques qui auront pour produits des espèces oxygénées hautement réactives (oxygènes singulets).

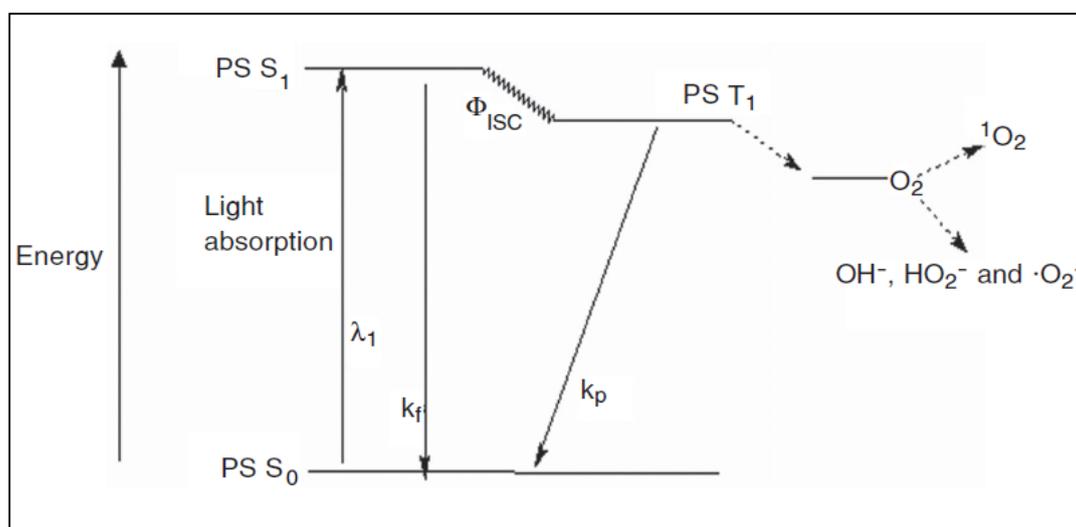


FIGURE 2.9 – Diagramme de Jablonski. Différents états du photosensibilisateur après excitation. PS  $S_0$  : état fondamental, PS  $S_1$  : état transitionnel excité (courte durée de vie), PS  $T_1$  : état triplet (longue durée de vie),  $k_f$  : émission de fluorescence,  $k_p$  : émission de phosphorescence,  $^1O_2$  : oxygène singulet. [69]

Le lendemain de l'incubation des cellules avec les photosensibilisateurs, les cellules ont internalisé les agents photosensibles. Le photosensibilisateur est localisé soit de manière diffuse dans le cytoplasme (cas du m-THPC), soit co-localisé avec les particules magnétiques dans les endosomes (cas du TPCS<sub>2a</sub>). Pour activer les molécules photosensibles, nous exposons les cellules sous microscope. Les deux photosensibilisateurs ont un profil d'excitation similaire, nous avons utilisé un filtre qui nous a permis d'exciter à 470 nm et de récupérer un signal à 650 nm. Les cellules sont exposées pendant une durée de 1s, 5s pour le m-THPC et 1s, 5s et 20s pour le TPCS<sub>2a</sub> à une puissance surfacique de 1,5 W/cm<sup>2</sup>. Lors de la photo-activation, une image en fluorescence est prise systématiquement.

### 2.4.2 Agent chimiothérapeutique : doxorubicine

La doxorubicine est utilisée en thérapie anticancéreuse depuis plus de 30 ans. Elle est un intercalant de l'ADN et ralentit la division cellulaire. Elle a donc majoritairement une localisation nucléaire dans la cellule (figure 2.10), mais ces propriétés chimiques en tant que base faible la localise également dans les lysosomes.

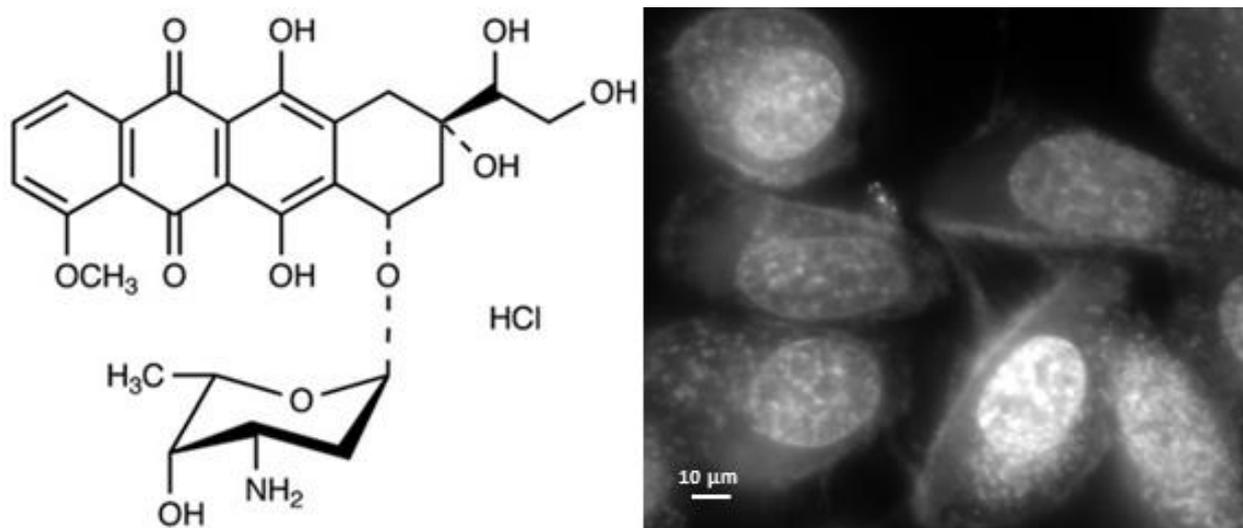


FIGURE 2.10 – Structure moléculaire de la doxorubicine [70] et sa localisation intracellulaire dans le noyau et les lysosomes.

## 2.5 Mesures passives : suivi de particules

Dans cette partie, nous décrivons les méthodes nécessaires au suivi du trafic intracellulaire avant et après deux perturbations de types différents : une perturbation mécanique et une perturbation photo-chimique.

### 2.5.1 Perturbation mécanique

Pour la perturbation mécanique, nous avons mis en place deux systèmes permettant de tester plusieurs hypothèses concernant l'impact d'une perturbation mécanique. Dans un premier temps, nous voulions tester l'impact de la rotation de chaînes d'endosomes magnétiques sur le trafic de ces mêmes objets. Ici, les chaînes d'endosomes magnétiques sont à la fois les sondes pour le trafic intracellulaire et les acteurs de la perturbation mécanique. La perturbation mécanique consiste à faire tourner les chaînes d'endosomes, via des champs magnétiques tournants. Dans un deuxième temps, nous voulions utiliser deux objets différents pour suivre le trafic et pour appliquer la perturbation. Nous avons donc mis en place un système nous permettant de suivre le mouvement d'endosomes ponctuels (non magnétiques) dans une zone contenant de nombreuses chaînes capables d'appliquer un cisaillement plus global. Ainsi nous avons pu observer l'impact d'un cisaillement mécanique global sur le trafic de sondes se trouvant dans cette même zone cisailée.

Le lendemain de l'incubation, les cellules ont internalisé complètement les nanoparticules magnétiques, qui se retrouvent alors encapsulées dans les endosomes tardifs, voire les lysosomes. Le moment magnétique de ces objets est de  $(3.7 \pm 0.2) \times 10^{-15}$  A.m<sup>2</sup>. En appliquant un champ magnétique aux cellules, les endosomes vont alors s'attirer les uns aux autres formant des chaînes de plusieurs endosomes. Ces objets vont servir de sondes pour le trafic intracellulaire (cas des chaînes) et/ou de perturbateurs (cas des chaînes et des endosomes uniques). Une fois les échantillons installés sous le microscope, le dispositif à production de champ magnétique est mis en place et un champ constant est imposé aux cellules pendant toute la durée de l'expérience (sauf pendant la rotation des chaînes), de sorte que les chaînes d'endosomes conservent leur cohésion.

### Suivi des chaînes d'endosomes magnétiques

Les chaînes utilisées dans le cas du suivi du trafic intracellulaire de chaînes d'endosomes, sont constitués de 2 à 4 endosomes, à raison de 2 à 6 chaînes par cellule. Nous enregistrons les trajectoires des chaînes d'endosomes pendant 200s à une fréquence d'échantillonnage de 10 images par seconde avant et après la perturbation mécanique, qui ici, consiste à mettre en rotation ces chaînes d'abord pendant 3 min à 0.01 Hz, puis 3 min à 0.1 Hz et enfin 3 min à 1 Hz. Les trajectoires des chaînes pendant la rotation sont également enregistrées. L'amplitude du champ pendant la rotation est de 60 mT. Nous choisissons des cellules avec le maximum de chaînes n'interagissant pas entre elles sous l'effet du champ magnétique, de sorte que les mouvements observés soient des mouvements spontanés de chaîne individuelle et non la conséquence de forces d'attraction entre les chaînes. Nous vérifions que les objets restent inchangés pendant toute la durée du suivi avant et du suivi après la perturbation et nous ne traitons que les chaînes qui ont bien été soumises à la rotation. Chaque chaîne est suivie avant la rotation, pendant les différentes rotations et après la rotation.

### Suivi des endosomes uniques

Les endosome utilisés dans le cas du suivi du trafic intracellulaire d'endosomes uniques ne sont pas magnétiques. On les distingue de ceux qui sont magnétiques car les endosomes magnétiques offrent un meilleur contraste du fait de la présence des nanoparticules magnétiques qui absorbent la lumière. Nous enregistrons les trajectoires des sondes pendant 200s à une fréquence d'échantillonnage de 10 images par seconde. Le suivi des sondes se fait avant et après la perturbation, qui est générée par la rotation de plusieurs chaînes d'endosomes pendant 6 min à une fréquence de 0.05 Hz. L'amplitude du champ pendant la rotation est de 60 mT. Nous sélectionnons les endosomes qui se trouvent dans une zone (d'une surface de plusieurs  $\mu\text{m}^2$ ) délimitée arbitrairement par la présence des chaînes prévues pour le cisaillement.

#### 2.5.2 Perturbation photo-chimique

Dans le cas de la perturbation photo-chimique, les sondes utilisées pour le suivi du trafic intracellulaire sont des endosomes magnétiques. Leur trajectoire est enregistrée pendant 100s à une fréquence de 10 images par seconde et ce avant et après la perturbation photo-chimique, qui correspond à la photo-activation des molécules photosensibles (m-THPC ou TPCS<sub>2a</sub>).

#### 2.5.3 Quantification du trafic intracellulaire

Nous avons donc mis en place 3 systèmes différents. Cependant, quelque soit le système, le protocole nous permettant de quantifier le trafic intracellulaire est le même. Nous observons les cellules avant et après la perturbation et nous enregistrons les trajectoires des sondes. Les trajectoires  $(x(t), y(t))$  des sondes sont extraites des images prises pendant l'expérience à l'aide du logiciel ImageJ (Analyse Particles module, manual tracking). Pour augmenter la précision de la position pendant le traitement d'image, nous appliquons un "scale 10X" à chaque film (1 pixel donne 10 pixels). Un exemple de trajectoire obtenue après traitement d'image est donné dans la figure 3.3.

A partir des trajectoires, nous calculons le déplacement quadratique moyen de chaque sonde ( $\langle \Delta r^2(t) \rangle$ ) selon la formule :

$$\langle \Delta r^2(t) \rangle = \langle [x(t+t') - x(t')]^2 + [y(t+t') - y(t')]^2 \rangle_{t'} = \langle x^2(t) \rangle + \langle y^2(t) \rangle \quad (2.7)$$

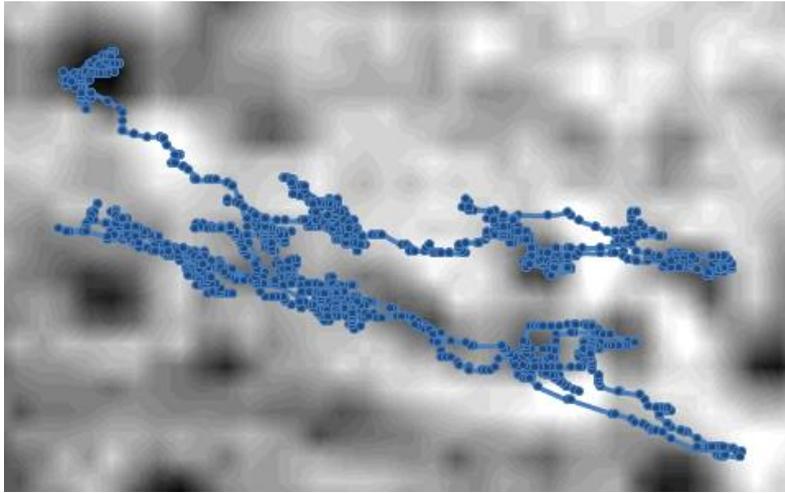


FIGURE 2.11 – Exemple de trajectoire d'un endosome.

De cette façon, nous faisons une première étape de moyenne glissante, ce qui permet de lisser la courbe de MSD en moyennant sur plusieurs évènements de même durée et aussi de s'affranchir du choix du moment où on démarre l'acquisition (figure 2.12). Ensuite nous faisons une deuxième étape de traitement, en calculant la moyenne d'ensemble des MSD des différentes sondes, pour avoir un comportement global du trafic intracellulaire. La moyenne géométrique a été choisie au détriment de l'arithmétique, car les MSD se comporte en loi puissance. En effet, la répartition de l'amplitude des MSD n'est pas normale mais log-normale [39]. Ensuite, nous ajustons les courbes par une fonction du type :

$$\langle \Delta r^2(t) \rangle = D_0 t^\alpha \quad (2.8)$$

L'amplitude du MSD ( $D_0$ ) dépend de la vitesse des sondes, de l'étendue des trajectoires et également des propriétés viscoélastiques du cytoplasme. L'exposant ( $\alpha$ ) rend compte du type de mouvement (voir figure 2.13). Il existe 4 différents types de mouvement :

- $\alpha < 1$  comportement sous-diffusif ou diffusion en milieu confiné,
- $\alpha = 1$  comportement diffusif en milieu purement visqueux,
- $\alpha > 1$  comportement super-diffusif,
- $\alpha = 1$  comportement balistique (vitesse constante).

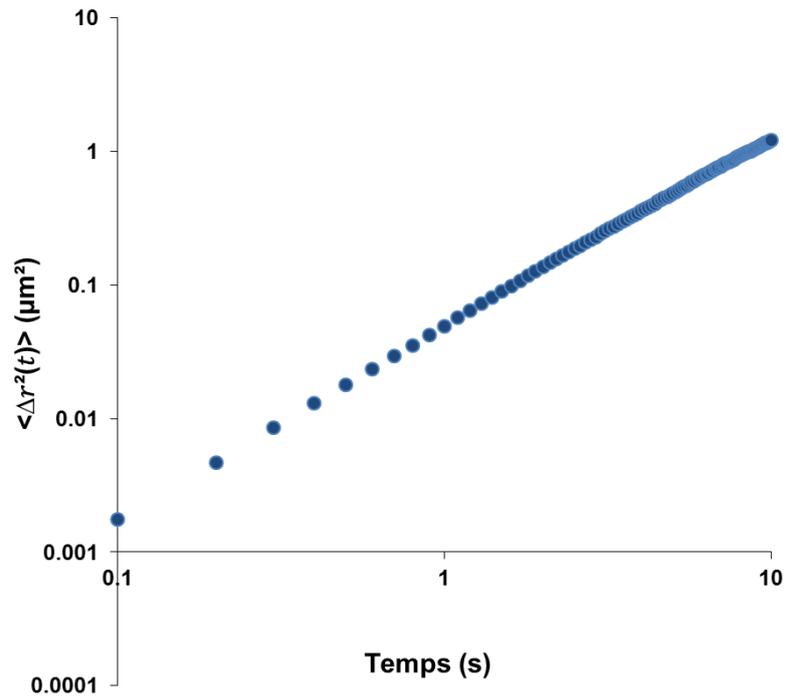


FIGURE 2.12 – Exemple de déplacement quadratique moyen (moyenne glissante) correspondant à la trajectoire de la figure 3.3 (échelle log). Ici  $D_0 = 0,049 \mu\text{m}^2$  et  $\alpha = 1,4$ .

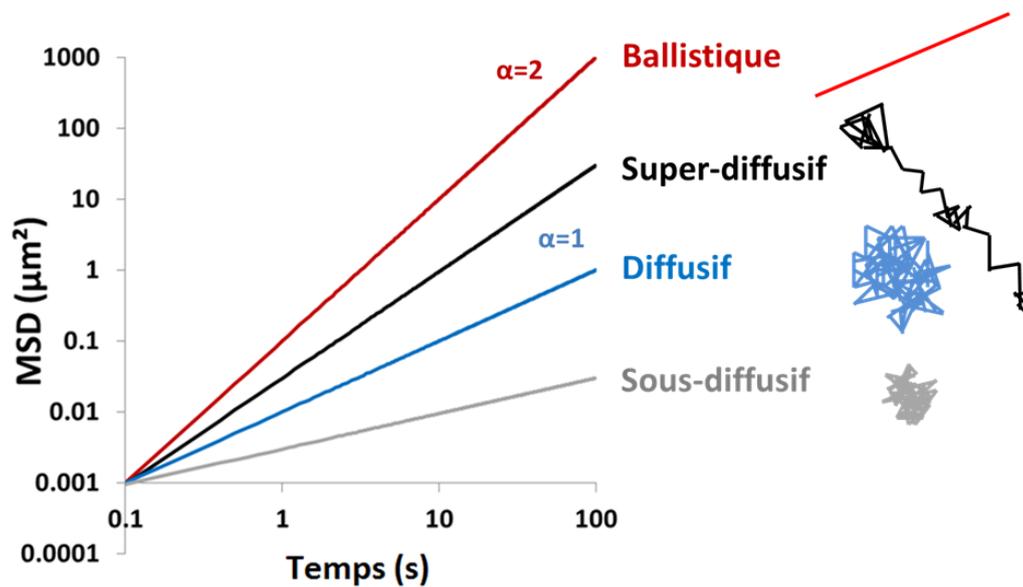


FIGURE 2.13 – Allures des MSD pour les différents types de mouvements (échelle log)

## 2.6 Mesures actives : microrhéologie du cytoplasme

Afin de mieux comprendre, l'environnement dans lequel a lieu le transport intracellulaire, et en tirant avantage des systèmes mis en place jusqu'ici, nous avons effectué des mesures de microrhéologie, visant à quantifier les coefficients viscoélastiques du cytoplasme et surtout nous permettant de comparer les valeurs mesurées avant et après perturbation. Notre dispositif magnétique nous permet de mettre en mouvement de façon contrôlée des objets intracellulaires anisotropes : les chaînes d'endosomes.

### 2.6.1 Mesures de relaxation

Dans le cadre de la perturbation mécanique (chapitre 3), nous avons choisi de faire des mesures de relaxation en mesurant la position angulaire des chaînes en fonction du temps lorsqu'on modifie brusquement la direction du champ d'un angle de  $45^\circ$  (figure 2.14). A l'aide du dispositif magnétique, nous faisons une série de quatre sauts d'environ  $45^\circ$  sur une même chaîne, avant et après un cisaillement par des chaînes, afin de savoir dans quelle mesure la rotation des chaînes a modifié les propriétés viscoélastiques locales du cytoplasme. Parfois, il arrive que des compartiments membranaires bloquent la relaxation des chaînes. Lorsque c'est le cas, les mesures ne sont pas exploitées. Le fait de pouvoir faire quatre mesures successivement, nous permet de faire des moyennes pour compenser ce problème. La durée totale des 4 sauts est de 100s, ie 25s par saut, pour permettre à la chaîne de relaxer complètement. Des images sont prises pendant l'expérience à raison de 100 images par seconde à l'aide de la caméra rapide (Phantom). Le traitement d'images se fait automatiquement à l'aide d'un plugin (Particle tracker), créé par Olivier Cardoso [71]. Ce plugin est conçu pour suivre des objets individuels en utilisant une méthode de corrélation croisée, à partir de la taille de la chaîne et de sa position initiale. Il a été modifié par Damien Robert afin de suivre la position angulaire de la chaîne en fonction du temps.

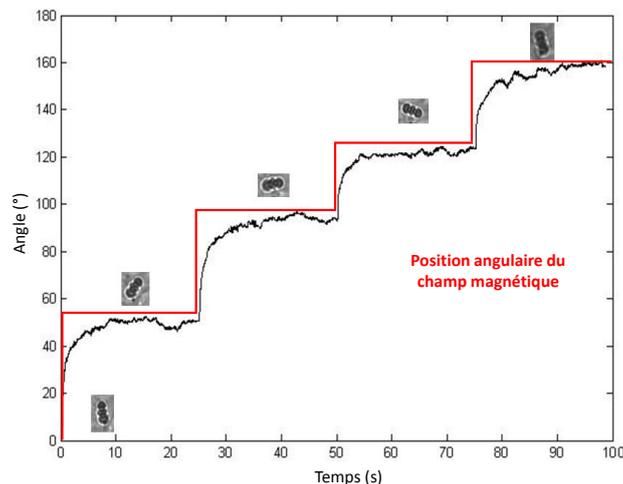


FIGURE 2.14 – Exemple de position angulaire d'une chaîne d'endosomes en fonction du temps lorsque le champ magnétique ( $\beta$ , en rouge) fait des sauts angulaires d'environ  $45^\circ$ .

Les courbes de relaxation ne reflètent pas un comportement viscoélastique simple. L'analyse en terme de fonction de fluage sera donnée dans le chapitre correspondant (chapitre 3).

### 2.6.2 Mesures de viscosité effective

Dans le cadre de la perturbation photo-chimique (chapitre 4), nous avons choisi de faire des mesures de viscosité effective en soumettant les chaînes d'endosomes à un champ magnétique tournant (rotation en régime permanent). De cette façon nous pouvons avoir accès à des valeurs de viscosité effective à l'échelle de temps correspondant à la période de rotation du champ. Bien que les propriétés viscoélastiques du cytoplasme ne peuvent pas être résumé à une simple viscosité, nous avons simplifié l'analyse des propriétés mécaniques afin d'avoir une comparaison directe entre les mesures effectuées avant et après la photo-activation. Nous avons choisi une fréquence de 0.2 Hz, car cette fréquence est assez faible pour que les chaînes suivent la rotation du champ magnétique et assez élevée pour que nous puissions mesurer un déphasage entre la position angulaire des chaînes et celle du champ.

Des chaînes d'endosomes magnétiques de 3 à 6 endosomes sont formées par application d'un champ magnétique constant. Lors de la rotation en régime permanent, le couple magnétique  $\Gamma_m$  appliqué aux chaînes d'endosomes va s'opposer au couple viscoélastique  $\Gamma_{ve}$ .

Expression du couple magnétique :

$$\Gamma_m = \Gamma_0 \frac{\sin(2\varphi)}{2} \quad (2.9)$$

où  $\varphi = \beta - \theta$  est le déphasage entre la position angulaire du champ magnétique ( $\beta$ ) et de la chaîne ( $\theta$ ) et  $\Gamma_0 = \frac{3\mu_0 m^2 N_e^2}{4\pi d^3}$ , avec  $m$  et  $d$  respectivement le moment magnétique et le diamètre d'un endosome et  $N_e$  le nombre d'endosomes constituant la chaîne.

Expression du couple viscoélastique :

$$\Gamma_{ve} = \kappa \eta_{\text{eff}} V \frac{d\theta}{dt} \quad (2.10)$$

où  $\eta_{\text{eff}}$  est la viscosité effective du cytoplasme mesurée à une fréquence donnée,  $\frac{d\theta}{dt}$  la vitesse angulaire de la chaîne,  $V = \frac{\pi d^3}{6}$  le volume de la chaîne et  $\kappa = \frac{2N_e^2}{\ln \frac{N_e}{2} + \frac{2.4}{N_e}}$  est un facteur géométrique (cf. [72, 63] pour plus de détails).

Des équations du mouvement, nous pouvons déduire une viscosité effective :

$$\eta_{\text{eff}} = \frac{\mu_0 M^2 N_e \sin(2\varphi)}{32\pi\kappa F} \quad (2.11)$$

avec  $M = \frac{m}{v}$  le moment magnétique volumique d'un endosome et  $F = \frac{1}{2\pi} \frac{d\theta}{dt}$  la fréquence de rotation.

### 2.6.3 Calibration du champ

Dans les deux types d'expériences décrites ci-dessous, nous avons eu besoin de mesurer avec précision certaines positions angulaires du champ. Pour ce faire, nous avons utilisé des échantillons des billes magnétiques de 1  $\mu\text{m}$  (MyOne) contenues dans du glycérol à 98%. A l'aide du dispositif de production de champ magnétique, nous formons des chaînes de billes en appliquant un champ constant. La position relative des quatre pièces de fer doux constituant le dispositif à production de champ magnétique n'étant pas figée, les différentes calibrations de positions angulaires sont mesurées systématiquement après chaque série d'expériences et à chaque fois nous faisons une moyenne sur au moins 10 chaînes.

### Détermination de $\beta_0$

L'origine de la position angulaire du champ  $\beta_0$  lorsque nous imposons un champ constant ( $I_1 \neq 0$  et  $I_2 = 0$ ), doit être déterminée à la fois pour l'étude des propriétés viscoélastiques par relaxation et par rotation continue. Ici, nous mesurons simplement la position angulaire des chaînes de billes lorsqu'on applique un champ constant ( $I_1 \neq 0$  et  $I_2 = 0$ ).

### Détermination de la valeur des sauts angulaires $\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4$

Nous avons également dû déterminer avec précision les valeurs de l'angle  $\beta$  du champ pour les quatre sauts. A l'aide du dispositif de production de champ magnétique, nous formons des chaînes de billes en appliquant un champ constant. Ensuite, nous imposons les quatre sauts angulaires aux chaînes de billes de sorte que nous puissions mesurer la position du champ magnétique (après relaxation) pour les 4 sauts angulaires.

### Position du champ tournant

Pour connaître la position du champ, à un instant  $t$ , nous avons relié le générateur de basses fréquences alimentant les bobines, au circuit de la LED présente à l'intérieur du dispositif, afin que la lumière s'éteigne pendant un bref instant (correspondant à la durée d'une image) à chaque rotation du champ. Cependant, la lumière ne s'éteint pas exactement lorsque la position angulaire du champ magnétique correspond à  $\beta_0$  mais un peu après. Pour déterminer le temps ( $\Delta t$ ) ou le nombre d'images entre le moment où la lumière s'éteint et le moment où le champ magnétique passe par la position d'origine, le circuit de la LED a été branché à un oscilloscope, de la même façon que le circuit alimentant les bobines. Cette phase dépend de la fréquence de rotation du champ ( $F$ ) selon la relation :  $\Delta t = \frac{0.08}{F}$ . Par exemple, pour une rotation à 0.2 Hz,  $\Delta(0.2) = 0.4s$ . A une fréquence de 10 images par seconde, cela correspond à 4 images. Il faut donc comparer la position des chaînes 4 images avant l'image noire avec la position d'origine  $\beta_0$ .

## 2.7 Système *in vitro*

Afin de reproduire certaines expériences réalisées dans les cellules, dans un environnement contrôlé, nous avons tenté de mettre en place des systèmes modèles *in vitro*.

L'idée était de reproduire le trafic vésiculaire dans un système minimal constitué d'un réseau de microtubules et des endosomes naturels extraits de cellules.

Ce système a également été utilisé dans l'étude concernant l'impact d'une perturbation photo-chimique sur le trafic intracellulaire, où nous avons voulu observer l'impact de la photo-activation des deux types de photosensibilisateurs sur les microtubules.

La plupart des protocoles sont détaillés dans les annexe (partie 8.2).

### 2.7.1 Polymérisation des microtubules

Il existe de nombreux protocoles de polymérisation de microtubules, nous en avons testé 3 (voir parties 2.7.1, 2.7.1 et 2.7.1).

#### Tubuline et conservation

Pour fabriquer des microtubules, nous avons utilisé de la tubuline synthétique (Cytoskelton Inc., Denver USA). La conservation de la tubuline, la polymérisation de microtubules et les expériences,

nécessitent l'utilisation d'un tampon BRB1X ou BRB80 : 80 mM de PIPES (pH ajusté à 6.8 avec KOH), 1 mM MgCl<sub>2</sub> et 1 mM EGTA.

La tubuline est conservée soit sous forme de poudre à 4°C, soit en solution au -80°C à 10 mg/mL dans du tampon BRB1X contenant 50% de glycérol et 1 mM de GTP.

### Microtubules stabilisés au taxol (protocole long)

#### Nucléation

Solution (a) :

Mélanger 1.6 µL de tubuline (10 mg/ml) avec 0.4 µL de tubuline rhodamine (10 mg/ml). Incuber 15 min à 37°C à l'abri de la lumière.

#### Polymérisation

Solution (b) :

Mélanger 2 µL de tubuline (10 mg/ml), 0.5 µL de tubuline rhodamine (10 mg/ml) et 22 µL de [BRB 1X + glycérol 10% + GTP 1mM]. Diluer (a) dans (b), remuer avec un cône sans pipeter. Incuber 15 min à 37°C.

#### Fixation

Solution (c) :

Préparer une solution de 0.3 µL de taxol (stock 10 mM) dans 30 µL de [BRB 1X + glycérol 10% + GTP 1mM]. Ajouter 2.5 µL de (c) dans (a+b). Incuber 15 min à 37°C.

#### Elongation

Laisser le tube à température ambiante pendant 1 ou 2 jour(s).

#### Centrifugation

Centrifuger la solution contenant les microtubules à 30 000g pendant 20 min à 25°C. Resuspendre le culot dans 30 µL de [BRB 1X + glycérol 10% + GTP 1mM + taxol 10 µM]. Les microtubules peuvent être utilisés pendant 2 semaines.

#### Précautions

Garder à l'abri de la lumière et à température ambiante. Après l'étape de polymérisation, on ne descend plus à basse température et on coupe les cônes.

### Microtubules stabilisés au taxol (protocole court)

Ce protocole est adapté de [73].

#### Solution (a) :

Mélanger 1.2 µL de DMSO à 100% (final 5%), 1 µL de MgCl<sub>2</sub> à 100 mM (final 25 mM), 1 µL de GTP à 25mM (final 1mM) et 1.8 µL de BRB 1X.

#### Solution (b) :

Mélanger 1 µL de tubuline rhodamine à 10 mg/ml avec 4 µL de tubuline à 10 mg/ml.

Mélanger les 5 µL de (b) avec 1.25 µL de (a).

Vortexer rapidement le mélange et incubé 30 min à 37°C à l'abri de la lumière.

Préparer une solution contenant du taxol à 10  $\mu\text{M}$  et du DTT à 1 mM dans du BRB 1X.

A la fin de la polymérisation, ajouter 200  $\mu\text{L}$  de [BRB 1X + taxol 10  $\mu\text{M}$  + DTT 1 mM] à la solution contenant les microtubules.

Les microtubules peuvent être conservés à température ambiante pendant 2 semaines.

**Remarques :**

- Pour une meilleure conduction de la température, l'éppendorf contenant la solution de polymérisation des microtubules peut être plongé dans un tube contenant de l'eau à 37°C, le tout placé dans un incubateur.
- Veiller à ne pas ajouter une solution trop froide lors de la dernière étape (ajout de taxol).

Ce protocole est détaillé dans la partie 8.2.4.

### Microtubules doublement stabilisés (GMPCPP et taxol)

Ce protocole est décrit dans la référence [74].

Mélanger 4  $\mu\text{L}$  de tubuline (stock 10 mg/ml), 1  $\mu\text{L}$  de tubuline rhodamine (stock 10 mg/mL), 10  $\mu\text{L}$  de GMPCPP (stock 10 mM), 1  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (stock 100 mM) et 84  $\mu\text{L}$  de BRB 1X.

Vortexer rapidement et incubé 2h à 37°C.

Centrifuger à 15000g pendant 15 min à 25°C.

Resuspendre dans 200  $\mu\text{L}$  de BRB 1X contenant 10  $\mu\text{M}$  de taxol.

### 2.7.2 Extraction des endosomes magnétiques

Ce protocole permet d'extraire les endosomes magnétiques des cellules. Afin de reproduire le transport vésiculaire, les cellules sont incubées avec 1 mM de maghémite et 2 mM de citrate pendant 30 min. Nous avons fait varier le type cellulaire utilisé ainsi que le temps de chasse. Concernant l'étude de l'impact de la photosensibilisation sur le trafic intracellulaire, nous avons co-incubé les cellules (PC3) avec du TPCS<sub>2a</sub> et des nanoparticules magnétiques comme décrit dans la partie "marquage magnétique".

Après la chasse, les cellules sont décollées avec de la trypsine (3 min à 37°C) et centrifugées pendant 5 min à 250g. Elles sont ensuite resuspendues dans un tampon HB (250mM Sucrose, 15 mM Imidazole), 1 mM de DTT et 1% de PIC ("protease inhibitor cocktail"), recentrifugées et resuspendues dans le même tampon. L'étape suivante consiste à lyser de façon mécanique les cellules en faisant des va-et-vient répétés de la suspension de cellules dans une aiguille 23G. Ensuite le lysat cellulaire obtenu est centrifugé à 4°C pendant 6 min à 700g, afin de séparer les noyaux des autres débris cellulaires. Le surnageant post-nucléaire (sans noyaux) est alors placé contre un aimant afin de séparer la phase magnétique de celle non-magnétique (figure 2.15). Finalement nous obtenons une suspension contenant uniquement les endosomes magnétiques concentrés.

Les endosomes peuvent être conservés directement dans l'azote liquide.

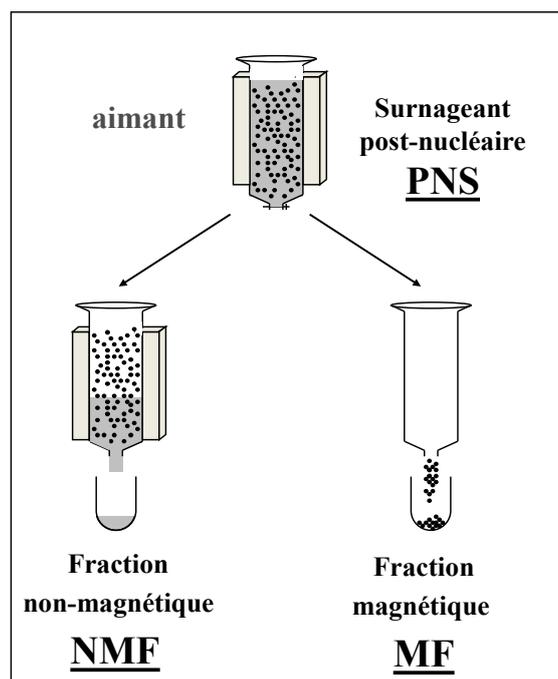


FIGURE 2.15 – Schématisation de l'extraction des endosomes magnétiques.

Ce protocole est détaillé dans la partie 8.2.3.

### 2.7.3 Préparation des échantillons

Après plusieurs essais, le protocole de fabrication des microtubules que nous avons choisi est celui des microtubules simplement stabilisés avec du taxol/DTT (partie 2.7.1). Il nous permet d'obtenir rapidement des microtubules très stables de 10-20  $\mu\text{m}$ .

#### Réseau de microtubules

Nous créons des chambres (3-5) en collant deux lamelles (22\*22 mm et 26\*50 mm) silanisées avec de fines bandes de parafilm, le tout chauffé à 100°C afin de sceller les chambres (figure 2.16). L'écart entre les deux lamelles étant de 0.5 mm, nous disposons de chambres à petit volume (10-15  $\mu\text{L}$ ), que nous remplissons par capillarité.

Nous rinçons la chambre avec du BRB1X entre chacune des étapes du protocole. Tout d'abord nous incubons la chambre pendant 5 min avec de l'anti- $\beta$ -tubuline (Sigma) pour permettre d'accrocher les microtubules à la surface. Ensuite, nous passivons la surface avec du pluronic (F127, Sigma Aldrich) pendant 10-15 min. Vient ensuite l'étape d'incubation des microtubules, qui dure 15 min. Nous rinçons ensuite les microtubules avec du BRB1X contenant du DTT (1 mM) et du taxol (10  $\mu\text{M}$ ).

Ensuite nous injectons soit les endosomes magnétiques, afin de reproduire des mouvements vésiculaires (protocole détaillé dans la partie 8.2.6), soit du photosensibilisateur (protocole détaillé dans la partie 8.2.5), afin d'observer l'impact de la photosensibilisation sur les microtubules.

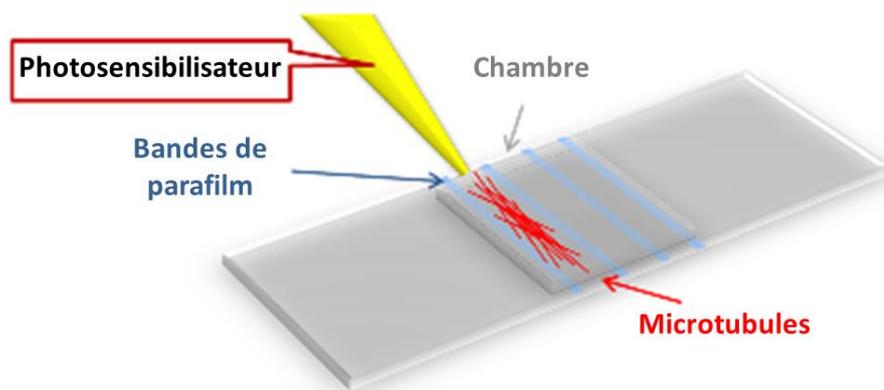


FIGURE 2.16 – Schématisation de la chambre utilisée pour les tests *in vitro*

### Incubation avec les endosomes magnétiques

#### *Solution (A1)*

Mélanger 100  $\mu\text{l}$  de tampon HB 5X, 5  $\mu\text{l}$  de caséine 100X, 1  $\mu\text{l}$  d'EGTA 0.5 M, 5  $\mu\text{l}$  de taxol 1 mM et 0.5  $\mu\text{l}$  de DTT 1 M. Compléter à 250  $\mu\text{l}$  avec de l'eau nanopure.

#### *Solution (A2)*

Mélanger 10  $\mu\text{l}$  de solution (A1) avec 10  $\mu\text{l}$  de la solution contenant les endosomes.

#### *Solution (B1)*

Mélanger 617  $\mu\text{l}$  d'eau nanopure, 200  $\mu\text{l}$  de tampon HB 5X, 10  $\mu\text{l}$  de caséine 100X et 2  $\mu\text{l}$  d'EGTA à 0.5 M.

#### *Solution Scavenger 10X (A préparer toute les heures!)*

Mélanger 16  $\mu\text{l}$  de pré-scavenger (glucose 31.25 mg/ml dans BME 0.125 M) avec 2  $\mu\text{l}$  de catalase 2 mg/ml, 2  $\mu\text{l}$  de glucose oxydase 10 mg/ml.

#### *Solution (B2) (A préparer toute les heures!)*

Mélanger 44  $\mu\text{l}$  de tampon (B1) avec 5  $\mu\text{l}$  de scavenger 10X et 1  $\mu\text{l}$  d'ATP (100 mM dans du  $\text{MgCl}_2$  à 1 M, pH=7).

Après l'incubation des microtubules, injecter la solution contenant les endosomes (A2) et incubé pendant 8 min. Injecter la solution (B2). Installer l'échantillon sous microscope. Inutile d'observer les lamelles pendant plus de 30 min, la durée de vie des moteurs dans un système *in vitro* étant limitée.

### Incubation avec le photosensibilisateur

Après l'incubation des microtubules, la dernière étape consiste à injecter le photosensibilisateur, qui se trouve soit en solution (m-THPC et TPCS2a) dans du BRB1X contenant du DTT (1 mM), du taxol (10  $\mu\text{M}$ ) et du triton X100 (0.3%) pour éviter l'agrégation du photosensibilisateur, soit

encapsulé dans des endosomes (TPCS2a) (extraits de cellules) en solution avec du BRB1X contenant du DTT (1 mM), du taxol (10  $\mu\text{M}$ ). Pour savoir à quelle concentration nous devons incubé les microtubules, nous avons mesuré la quantité de photosensibilisateur internalisé dans les cellules ainsi que celle contenue dans la solution d'endosomes purifiés, par spectroscopie fluorescente (SLM Aminco Bowman Series 2 spectrometer) à la longueur d'onde de 410 nm.

## 2.8 Caractérisation des vésicules émises après traitements anticancéreux

### 2.8.1 Comptage des vésicules

Après la chasse de la nuit, les cellules traitées au m-THPC sont rincées et placées dans 200  $\mu\text{l}$  de DMEM complet. Elles sont ensuite exposées sous microscope pendant 5s à une énergie surfacique de 7.5 J/cm<sup>2</sup> (voir partie 2.4.1 pour les détails). Une image en fluorescence est prise afin de voir la localisation intracellulaire du photosensibilisateur. La vésiculation est filmée pendant 1 heure avec une fréquence d'échantillonnage d'une image toutes les 10 s.

A la fin de l'incubation avec la doxorubicine, les cellules sont rincées et sont remises en culture dans 250  $\mu\text{l}$  de DMEM complet frais. Des images ont été prises à différentes étapes du traitement (avant incubation, à la fin de l'incubation, 24h après traitement).

1h après l'exposition, pour les vésicules traitées au m-THPC, et 24h après l'incubation, pour celles traitées à la doxorubicine, le milieu de culture est prélevé afin de quantifier le nombre de vésicules émises par les cellules. Nous avons imaginé une technique de comptage inspirée de celle utilisée pour compter les cellules : nous plaçons 5  $\mu\text{l}$  de la solution contenant les vésicules entre deux lamelles (22\*22 mm et 24\*60 mm). Nous prenons 4 images aléatoirement. Ensuite nous comptons les vésicules avec le logiciel ImageJ (Point picker), pour aboutir à un nombre de vésicules par ml.

Notre technique de quantification des vésicules a été validée par des comptages dans les mêmes conditions à l'aide d'un appareil commercial appelé Nanosight [75]. La quantification a donné les mêmes résultats avec les deux techniques.

### 2.8.2 Analyses protéomiques et génomiques

#### Proteom array

Afin d'évaluer le niveau relatif des protéines de l'apoptose après les différents traitements, nous avons utilisé un kit Proteome Profiler Array (R&D systems). Ce kit est composé de 4 membranes de nitrocellulose sur lesquelles ont été fixés 35 anticorps anti-apoptose différents (la liste est disponible dans la partie 8.4.1). En déposant la même quantité de protéines totales par membrane, nous avons pu comparer les effets obtenus sur le processus de mort cellulaire dans les différents traitements. 2 traitements ont été réalisés en parallèle sur les cellules PC3 : traitement au photosensibilisateur m-THPC (0.5  $\mu\text{M}$ ), et traitement avec 5  $\mu\text{M}$  de doxorubicine. Les 2 autres membranes étant destinées à des contrôles : contrôle PC3 non traitées et non exposées et PC3 traitées au m-THPC mais non exposées. Le choix du temps d'incubation après le traitement pour l'extraction des protéines a été le plus délicat à déterminer : sachant que dans la plupart des voies de signalisation les temps de réponse sont assez courts, ce choix s'est porté sur 5 min puis sur 30 min après les traitements, c'est-à-dire 5/30 min après l'exposition des cellules traitées au photosensibilisateur ou 5/30 min après les 2h d'incubation à la doxorubicine.

A ces différents temps, les protéines ont été extraites des cellules en suivant le protocole du fabricant, puis déposées sur les membranes et révélées par un deuxième anticorps. La détection a été réalisée par chimiluminescence et l'intensité des spots obtenus a été mesurée avec le logiciel ImageJ.

### Gene array

La technique de PCR Array (Qiagen) est une technique exploratoire qui permet d'évaluer rapidement le niveau relatif d'expression des gènes entre 2 échantillons de cellules traitées et non traitées, quelque soit le traitement. Nous avons choisi de quantifier l'expression des gènes du stress oxydant : les plaques de 384 puits contiennent 84 gènes différents (liste disponible dans la partie 8.4.2), tous potentiellement en relation avec la voie de signalisation du stress oxydant. Comme pour l'analyse des protéines avec le proteome array, des cellules PC3 ont été traitées soit avec le photosensibilisateur mTHPc (0.5  $\mu\text{M}$ ), exposées ou non, soit avec 5  $\mu\text{M}$  de doxorubicine pendant 2h. 30 min après l'exposition pour le mTHPC ou après le traitement à la doxorubicine, les ARNs sont extraits des cellules selon le protocole du fabricant du kit (Macherey-Nagel), puis les cDNAs sont synthétisés par une reverse transcriptase (Qiagen) avec environ 400 ng d'ARN pour chaque échantillon. La PCR quantitative est ensuite réalisée et les expressions relatives de chaque échantillon traité sont comparées à l'échantillon témoin (cellules non traitées).

### 2.8.3 Origine des vésicules

Pour connaître l'origine des vésicules, nous avons utilisé des nanoparticules magnétiques comme traceur de localisation. Nous induisons la vésiculation de cellules traitées au m-THPC après avoir fait deux types de marquages magnétiques : pour la première condition, le marquage est suivi d'une chasse de la nuit avant l'exposition, de sorte que les nanoparticules magnétiques se retrouvent dans les endosomes tardifs ou les lysosomes, dans la deuxième condition les cellules sont exposées directement après les 30 min de marquage, de sorte que les nanoparticules magnétiques sont localisées à la membrane (face externe) des cellules. Normalement pour un marquage de la membrane, les cellules sont incubées avec les nanoparticules à 4°C. Seulement dans notre cas, pour ne pas perturber le métabolisme des cellules, le marquage a été effectué à 37°C. Nous laissons les cellules vésiculer pendant 1h et nous relevons le milieu qui est ensuite placé dans une chambre à micromagnétophorèse, afin de voir si les vésicules émises sont magnétiques.

### Transfert des vésicules

Le milieu de culture prélevé après traitement (m-THPC : 0.02, 0.08, 0.2, 0.5, 2 et 10  $\mu\text{M}$  et Doxorubicine : 0.1, 0.5, 2, 5, 10, 50  $\mu\text{M}$ ) les cellules cancéreuses (PC3) a été transféré sur des cellules endothéliales humaines (HUVEC pour "Human Umbilical Vein Endothelial Cells") pour une incubation de 2h. Après l'incubation, les cellules sont remises en culture dans du milieu frais.

## 2.9 Imagerie

### 2.9.1 Microscopie optique

La plupart des images de microscopie optique ont été réalisées à l'aide d'un microscope inversé et thermalisé Leica DMIRB équipés des objectifs 20X, 63X à immersion ou 100X à immersion. Ce microscope est équipé d'une lampe fluorescente et de différents filtres (m-THPC, rhodamine), qui nous ont permis de faire de images en fluorescence. Le dispositif magnétique est installé sur ce

microscope. Il est également équipé des caméra Cool Snap HQ, utilisée en particulier pour la prise d'images en fluorescence via le logiciel Metavue, et Phantom V9.1 Vision Research (caméra rapide) combinée au logiciel Phantom Camera Control, utilisée en particulier pour le suivi des mouvements intracellulaires et les mesures actives. La taille des pixels pour les différentes caméra est mesurée en prenant des images d'une cellule de Malassez (généralement utilisée pour compter les cellules) présentant un quadrillage fin avec des carrés de 50  $\mu\text{m}$  de côté.

### 2.9.2 Microscopie confocale

Certaines images ont été acquises à l'aide d'un microscope thermalisé confocal Olympus JX81/BX61 Device/Yokogawa CSU équipé d'un spinning disk (Andor Technology plc, Belfast, Northern Ireland). Les images sont prises avec un objectif 63X à immersion.

### 2.9.3 Microscopie électronique

La préparation des échantillons pour la microscopie électronique a été réalisée sur monocouches de cellules fixées et incluses dans de la résine EPON. Les cellules sont fixées avec du glutaraldéhyde à 5% dans du tampon cacodylate à 0.1 mol/L pendant 1h à température ambiante. Il s'en suit plusieurs étapes de déshydratation de la monocouche avec de l'éthanol (50, 70, 90 puis 100%). Ensuite, nous plongeons les cellules dans une résine (EPON), qu'on laisse polymériser à 70°C pendant 48 à 72h. Les échantillons sont coupés et observés à la plateforme d'imagerie Mima2 - Inra (Jouy en Josas).

Le protocole est détaillé dans la partie 8.3.

## 2.10 Statistiques

Nous avons fait des analyses statistiques des résultats avec le logiciel Prism 3.0 (GraphPad). Les résultats sont généralement présentés sous forme de moyenne  $\pm$  l'erreur type ( $\frac{\text{écart-type}}{\sqrt{N}}$ ). Nous avons testé les distributions de résultats avec le test de Student (ou t-test) avec une correction de Welch. \*\*\* correspond à  $p < 0.001$ . \*\* correspond à  $p < 0.01$ . \* correspond à  $p < 0.05$ . NS (non significatif) correspond à  $p > 0.05$ .



# Chapitre 3

## Perturbation mécanique

### Sommaire

---

<b>3.1</b>	<b>Introduction</b>	<b>48</b>
<b>3.2</b>	<b>Impact d'une perturbation mécanique locale sur le trafic d'une chaîne d'endosomes</b>	<b>50</b>
3.2.1	Résultats des mesures passives	50
3.2.2	Analyse des mesures passives avant et après la perturbation	51
3.2.3	Suivi du mouvement des chaînes pendant la rotation (mesures passives)	57
3.2.4	Discussion	58
<b>3.3</b>	<b>Impact d'une perturbation mécanique sur les propriétés viscoélastiques du cytoplasme</b>	<b>61</b>
3.3.1	Résultats des mesures actives	61
3.3.2	Analyse des mesures actives avant et après la perturbation	62
3.3.3	Discussion	64
<b>3.4</b>	<b>Impact d'une perturbation mécanique globale sur le trafic intracellulaire d'un endosome unique</b>	<b>66</b>
3.4.1	Résultats des mesures passives	66
3.4.2	Analyse des mesures passives avant et après la perturbation	67
3.4.3	Discussion	67
<b>3.5</b>	<b>Comparaison entre le mouvement d'un endosome unique et d'une chaîne à <math>N_e</math> endosomes</b>	<b>70</b>
3.5.1	Résultats des mesures passives	70
3.5.2	Analyse des mesures passives en fonction du nombre d'endosomes $N$	70
3.5.3	Discussion	71
<b>3.6</b>	<b>Discussion générale</b>	<b>74</b>
<b>3.7</b>	<b>Conclusion et perspectives</b>	<b>78</b>

---

### 3.1 Introduction

Lorsqu'on observe une cellule au microscope, on peut voir une multitude de vésicules bouger à l'intérieur des cellules. On peut distinguer des mouvements très dirigés, d'une durée plus ou moins longue, et des déplacements qui s'apparentent plus à de la diffusion libre. Toute cette agitation au sein du cytoplasme caractérise le trafic intracellulaire. Il est permis grâce à l'activité des moteurs moléculaires qui transforment l'énergie chimique en énergie mécanique afin de tracter des charges qui évoluent le long des filaments du cytosquelette. Ces mouvements sont dépendants des propriétés mécaniques locales du cytoplasme, qui est un milieu viscoélastique. En effet, que ce soit lors de déplacements actifs, lorsque les moteurs sont actifs, ou lors de déplacements passifs, correspondant à une diffusion, les propriétés mécaniques du milieu dans lequel baignent les vésicules de trafic vont moduler ces mouvements par le biais des coefficients viscoélastiques.

Agir sur le trafic intracellulaire en utilisant une perturbation mécanique, nous a donc semblé pertinent. De plus, nous disposons d'outils intracellulaires capables d'agir mécaniquement sur le cytoplasme : les endosomes magnétiques. Ces endosomes magnétiques s'organisent spatialement sous forme de chaînes par l'application d'un champ magnétique. Ces chaînes étant des objets magnétiques et anisotropes, elles peuvent être manipulées par des champs magnétiques et en particulier par des couples magnétiques. Une fois ces chaînes formées, nous avons constaté que, de manière surprenante, ces chaînes pouvaient elles-mêmes participer au trafic intracellulaire. De cette observation sont nées deux études du trafic intracellulaire en présence d'une perturbation mécanique du cytoplasme.

La première, directement reliée à cette observation, concerne l'étude du mouvement spontané de ces chaînes, avant et après la perturbation, qui consiste à faire tourner ces mêmes objets. Dans ce cas, les sondes du trafic intracellulaire sont les mêmes objets que ceux qui créent la perturbation. De ce fait, nous avons pu perturber directement le trafic intracellulaire des chaînes dans la mesure où nous faisons tourner des objets potentiellement connectés au cytosquelette. Avec ce système, nous avons également fait des mesures de microrhéologie active, afin de mesurer l'impact de la rotation sur les propriétés viscoélastiques locales du cytoplasme.

Dans la deuxième étude, nous voulions découpler l'étude du trafic intracellulaire et l'application de la perturbation en utilisant deux objets différents pour sonder le trafic intracellulaire et pour créer la perturbation. Les acteurs de la perturbation sont toujours des chaînes d'endosomes magnétiques mais pour sonder le trafic intracellulaire, nous avons utilisé des endosomes ponctuels non-magnétiques. Nous avons donc étudié les mouvements d'endosomes uniques non-magnétiques se trouvant dans une zone pouvant être cisailée par la rotation de chaînes d'endosomes magnétiques. De cette façon, nous agissons de manière plus indirecte sur le trafic intracellulaire, en tentant de modifier l'environnement dans lequel se trouvent les sondes.

Finalement, nous avons confronté les deux types de système que nous avons utilisé, en comparant le mouvement d'un endosome ponctuel et celui d'une chaîne d'endosomes. Ainsi, nous avons pu comparer les mesures de trafic intracellulaire d'objets de différentes tailles en fonction du nombre d'endosomes constituant la sonde.

Dans cette partie nous verrons que la perturbation mécanique n'a pas d'incidence notable sur les propriétés visco-élastiques mais que le fait de faire tourner une sonde ralentit son trafic intracellulaire.

## 3.2 Impact d'une perturbation mécanique locale sur le trafic d'une chaîne d'endosomes

La première étude consiste à observer et quantifier les modifications du trafic intracellulaire d'une chaîne d'endosomes avant et après sa rotation dans un champ magnétique. Après avoir marqué magnétiquement les cellules, nous formons des chaînes de 2 à 4 endosomes magnétiques. Une fois sous microscope l'échantillon est plongé dans un champ magnétique, dont la direction est constante afin de conserver la structure des sondes en chaînes. Nous étudions leur mouvement spontané avant, pendant et après 3 rotations successives de 3 min chacune à vitesse constante (0.01 Hz, 0.1 Hz, 1 Hz) par des calculs de déplacement quadratique moyen puis par des analyses plus détaillées des trajectoires.

### 3.2.1 Résultats des mesures passives

Nous avons élaboré un protocole de marquage magnétique qui nous a permis d'avoir un petit nombre de chaînes intracellulaires. De cette manière, les différentes chaînes ont peu de chance d'interagir entre elles par des attractions magnétiques et nous observons seulement des mouvements spontanés des sondes. Nous enregistrons les déplacements des chaînes pendant 200s à une fréquence de 10 images par seconde. Nous analysons les images obtenues afin d'obtenir la trajectoire des chaînes. A partir de leurs coordonnées  $(x(t), y(t))$ , nous calculons le déplacement quadratique moyen (MSD) en fonction du temps en faisant une moyenne glissante le long de la trajectoire :

$$\langle \Delta r^2(t) \rangle = \langle [x(t+t') - x(t')]^2 + [y(t+t') - y(t')]^2 \rangle_{t'} = \langle x^2(t) \rangle + \langle y^2(t) \rangle \quad (3.1)$$

Comme nous le verrons, le MSD se comporte généralement en loi puissance, on peut alors le modéliser par une fonction du type :

$$\langle \Delta r^2(t) \rangle = D_0 \left( \frac{t}{t_0} \right)^\alpha \quad (3.2)$$

$D_0$  est l'amplitude du MSD. Elle dépend de la vitesse de déplacement des sondes, de leur processivité, des propriétés mécaniques du cytoplasme et du choix de  $t_0$ . Ici et pour la suite, nous avons pris  $t_0 = 1s$ .

$\alpha$  est l'exposant du MSD. Il nous renseigne sur le type de mouvement. Généralement dans la cellule, du fait des processus intracellulaires actifs, on a  $1 < \alpha < 2$ , correspondant à un comportement super-diffusif.

### Avant la perturbation

Nous avons suivi 40 chaînes avant la rotation pendant 200s. A partir des trajectoires, nous avons calculé les MSD glissants correspondant à chacune des chaînes. Nous avons ensuite moyenné ces MSD et ajusté cette moyenne globale par une loi puissance (figure 3.1).

La moyenne géométrique des MSD des 40 chaînes avant la rotation donne une amplitude moyenne de  $D_0^{\text{avant}} = 0.0159 + 0.0012/ - 0.0008 \mu\text{m}^2$  et un exposant moyen de  $\alpha^{\text{avant}} = 1.21 \pm 0.02$ . Les chaînes présentent un comportement super-diffusif avant la rotation ( $\alpha^{\text{avant}} > 1$ ).

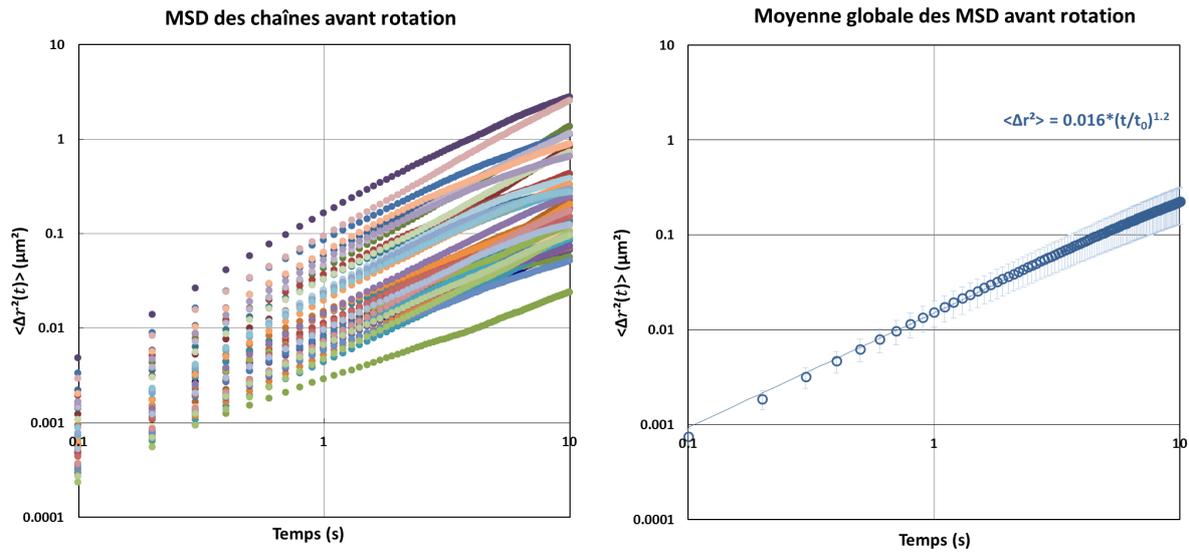


FIGURE 3.1 – MSD glissant des chaînes avant la rotation. Moyenne géométrique des 40 chaînes. Les chaînes d'endosomes ont un comportement super-diffusif avant leur rotation. La barre d'erreur correspond à l'erreur type (SEM, "standard error of the mean"). (N=40)

### Après la perturbation

Les mêmes chaînes sont suivies après la rotation également pendant 200s. Nous calculons de la même façon le MSD glissant de chaque chaîne, puis la moyenne globale des 40 chaînes (figure 3.2).

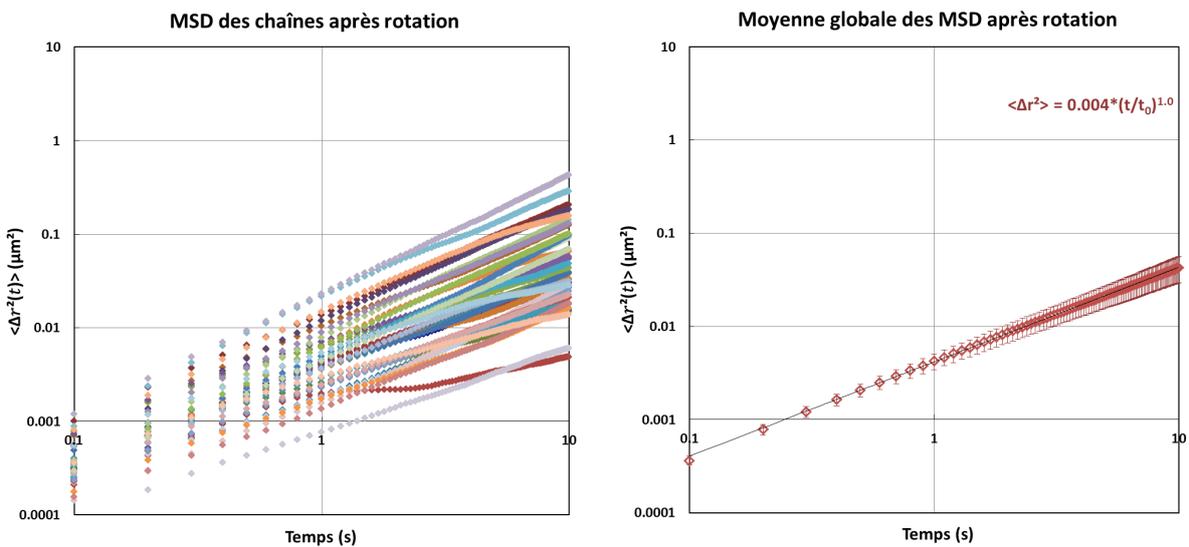


FIGURE 3.2 – MSD glissant des chaînes après la rotation. Moyenne géométrique des 40 chaînes. Les chaînes d'endosomes ont un comportement quasi-diffusif après leur rotation. La barre d'erreur correspond à l'erreur type. (N=40)

La moyenne géométrique des MSD des 40 chaînes après la rotation donne une amplitude moyenne de  $D_0^{\text{après}} = 0.0042 + 0.0016/\sqrt{t} - 0.0011 \mu\text{m}^2$  et un exposant moyen de  $\alpha^{\text{après}} = 1.01 \pm 0.03$ . Les chaînes ont un comportement quasi-diffusif ( $\alpha \approx 1$ ) après leur rotation.

### 3.2.2 Analyse des mesures passives avant et après la perturbation

Les courbes de MSD nous renseignent sur le comportement moyen de la chaîne pendant toute la durée de l'enregistrement (amplitude et exposant moyens du MSD). Lorsqu'on observe le mouvement spontané des sondes, on remarque qu'il y a une alternance de phases dirigées et de phases plus diffusives. Seulement, lorsque nous calculons le MSD, nous moyennons les différentes portions de trajectoires entre elles et en quelque sorte nous perdons la notion de mouvement dirigé pour avoir un comportement global. Les phases de mouvement dirigé sont intéressantes, car elles sont directement reliées à l'activité des moteurs moléculaires. Si nous voulons approfondir l'analyse des phases dirigées, il nous faut trouver un moyen de découper les trajectoires afin de distinguer les phases de mouvement dirigé des phases de mouvement diffusif.

#### Les observables

A partir des trajectoires obtenues après le traitement des images, nous avons introduit deux grandeurs : la distance élémentaire moyenne et le paramètre de directionnalité. Pour bien illustrer les différentes étapes d'analyse des trajectoires, des exemples seront systématiquement montrés à partir de la trajectoire de la figure 3.3.

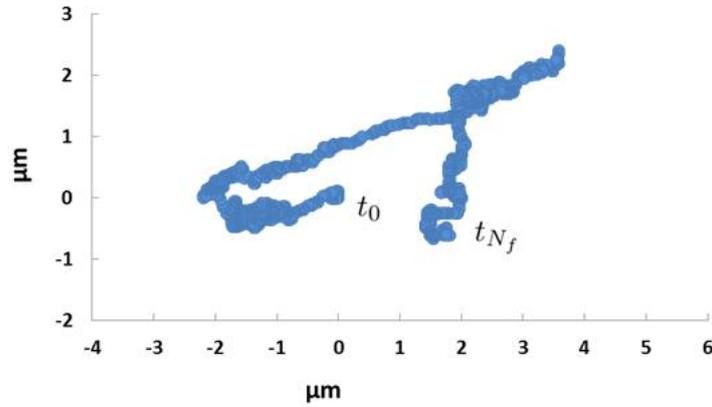


FIGURE 3.3 – Trajectoire d'une chaîne d'endosomes (durée 200 s).  $t_0$  et  $t_{N_f}$  indiquent respectivement le début et la fin de la trajectoire. Cette trajectoire est utilisée comme exemple pour les prochaines figures (figures 3.4, 3.6).

**La distance élémentaire moyenne** La distance élémentaire moyenne correspond à la distance bout à bout entre  $N_p$  points divisée par le nombre de points. Lorsque le mouvement est dirigé, la distance parcourue est plus grande que lorsque la sonde a un mouvement diffusif. Nous prenons des images pendant 200s à 10 images par seconde, nos trajectoires contiennent donc 2000 points. Nous définissons  $d_{k,j}$  comme étant la distance entre les points  $(x_k, y_k)$  et  $(x_j, y_j)$  de la courbe, avec  $(k, j) \in [1, N_f = 2000]$ .

La distance élémentaire moyenne est définie par :

$$\overline{d}_i = \frac{d_{i,i+N_p}}{N_p} \quad (3.3)$$

La première difficulté ici était de choisir le nombre de points  $N_p$ . Le choix de ce paramètre est important, car si on prend un  $N_p$  trop petit, le bruit ressort trop ; s'il est trop grand, on rate les différentes phases du mouvement. Nous avons donc tracé les courbes pour un certain nombre de chaînes et pour différents paramètres  $N_p$  (voir exemple figure 3.4 correspondant à la trajectoire de la figure 3.3). Nous avons calculé la distance élémentaire moyenne en fonction du temps pour  $N_p = 10, 20, 50, 100, 200, 500$ . Comme nous prenons 10 images par seconde, cela correspond respectivement à 1, 2, 5, 10, 20 et 50 s.

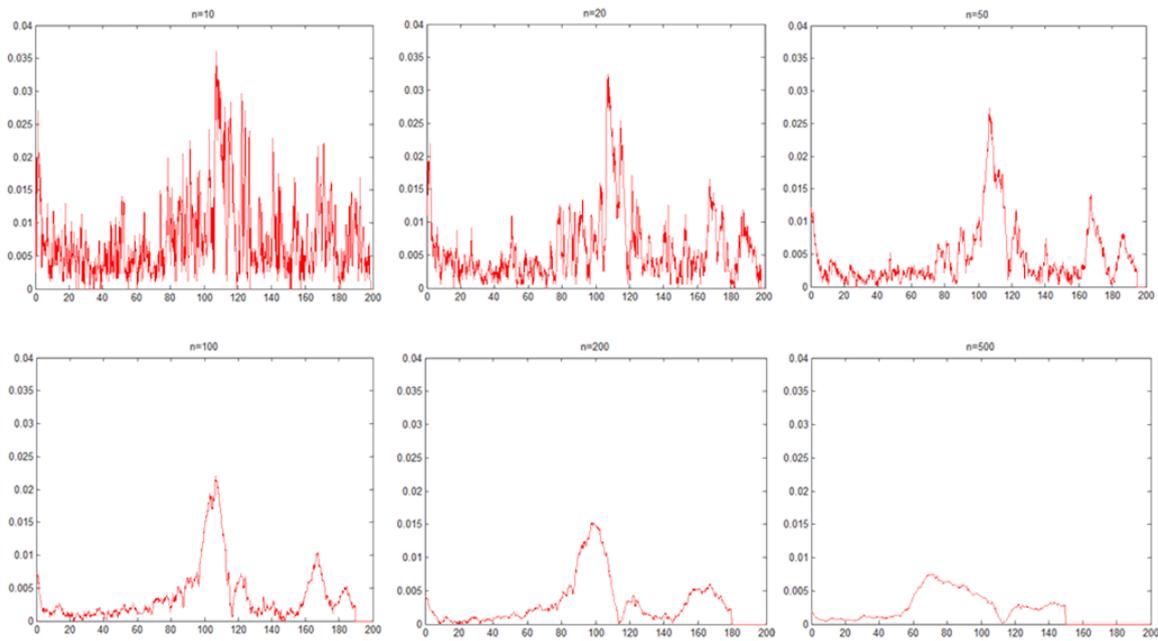


FIGURE 3.4 – Exemple de courbes de distance élémentaire moyenne ( $\overline{d}(t)$ ) pour différents nombres de points  $N_p = 10, 20, 50, 100, 200$  et 500 (calculées à partir de la trajectoire de la figure 3.3). Le signal est très bruité pour  $N_p=10, 20$  et l'est encore pour  $N_p=50$ . A partir de  $N_p=200$ , les courbes sont trop lissées et on perd de l'information.  $N_p=100$  semble être un bon choix.

En analysant les courbes de la figure 3.4, on constate que pour  $N_p=10$ , le signal est trop bruité. Lorsque  $N_p$  augmente, le bruit diminue mais à partir de  $N_p=200$  on commence à perdre de l'information, les courbes sont trop lissées. L'objectif étant d'avoir une courbe la moins bruitée possible, tout en gardant le maximum d'information, de façon à bien pouvoir identifier les différents types de mouvements (phases de mouvement dirigé, phases de mouvement diffusif). De façon systématique en analysant les courbes correspondant aux différentes chaînes, notre choix s'est porté sur  $N_p = 100$  soit 10 s. Nous avons une courbe où le bruit se distingue des pics, qui correspondent à des phases de mouvement dirigé. Nous avons gardé ce même paramètre pour toutes les études.

**Le paramètre de directionnalité** Il nous fallait définir une grandeur physique, de préférence adimensionnée, qui rendait compte du caractère dirigé ou non des déplacements. Nous avons alors

simplement défini  $\delta$  comme étant le rapport de la distance bout-à-bout entre  $N_p$  points sur la somme des déplacements élémentaires, de la manière suivante :

$$\delta_i = \frac{d_{i,i+N_p}}{i+N_p-1 \sum_{k=i}^{i+N_p-1} d_{k,k+1}} \quad (3.4)$$

$\delta \rightarrow 0$  lorsque le mouvement est diffusif et  $\delta \rightarrow 1$  lorsque le mouvement est balistique.

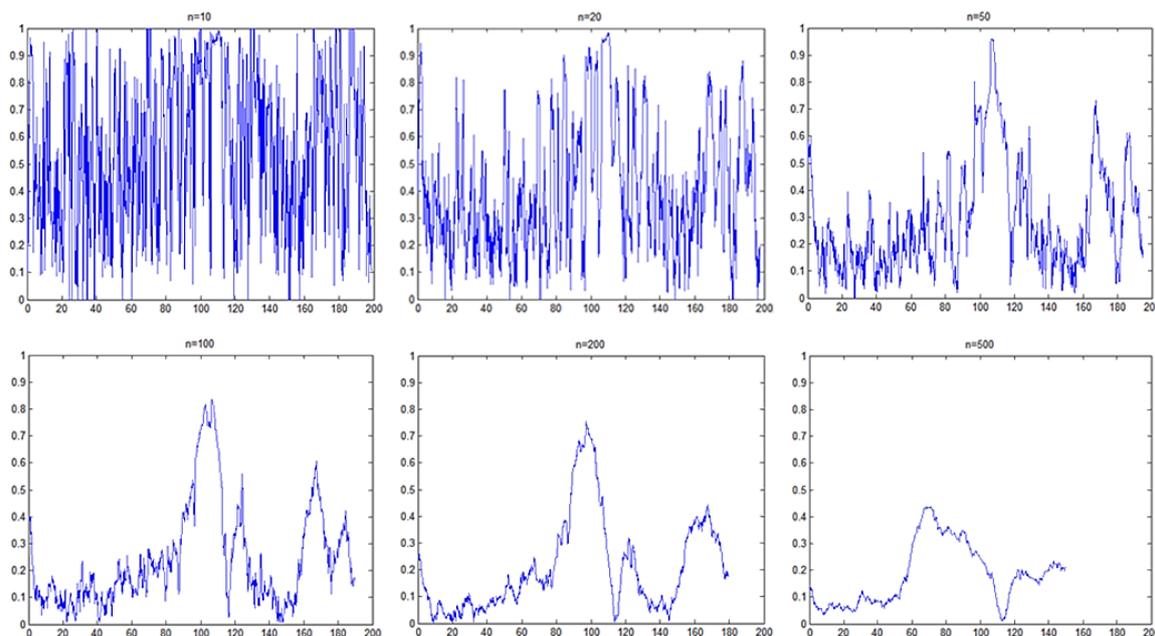


FIGURE 3.5 – Exemple de courbes donnant le paramètre de directionnalité ( $\delta(t)$ ) pour différents nombres de points  $N_p = 10, 20, 50, 100, 200$  et  $500$  (calculées à partir de la trajectoire de la figure 3.3). Les courbes pour  $N_p=10,20$  et  $50$  sont trop bruitées. A partir de  $N_p=200$ , le signal est trop lissé. Même conclusion que pour la figure 3.4 :  $N_p=100$  semble être un bon choix.

La figure 3.5, nous montre qu'il existe une bonne corrélation entre les courbes de distance élémentaire moyenne (figure 3.4) et les courbes donnant le paramètre de directionnalité (figure 3.5). De plus, en analysant les courbes en fonction du paramètre  $N_p$ , on constate à nouveau que  $N_p=100$  est un bon choix, car la courbe correspondante nous offre un bon compromis entre un maximum d'information avec un minimum de bruit.

La courbe de  $\delta(t)$  avec  $N_p = 100$  est donnée figure 3.6.

Une fois les courbes de paramètre de directionnalité obtenues, nous avons dû déterminer un seuil ( $\delta_s$ ) au-dessus duquel les déplacements devaient être considérés comme dirigés. L'idée est de choisir un  $\delta_s$  assez bas pour pouvoir identifier tous les intervalles de temps sur lesquels le mouvement est dirigé tout en étant au-dessus du bruit, qui correspond aux mouvements de diffusion libre. Sur la trajectoire de la figure 3.3, on peut identifier 5 portions de phases dirigées. Il en est de même sur la courbe de la figure 3.6, on peut identifier 5 pics, correspondant chacun à une phase de mouvement dirigé. Le reste de la courbe, correspond à des phases diffusives. On peut remarquer, que le bruit ne dépasse le seuil de  $\delta_s = 0.3$ , alors que tous les pics vont au-delà de  $\delta_s = 0.3$ . Nous avons systématiquement comparé la courbe de directionnalité avec les déplacements (films) des

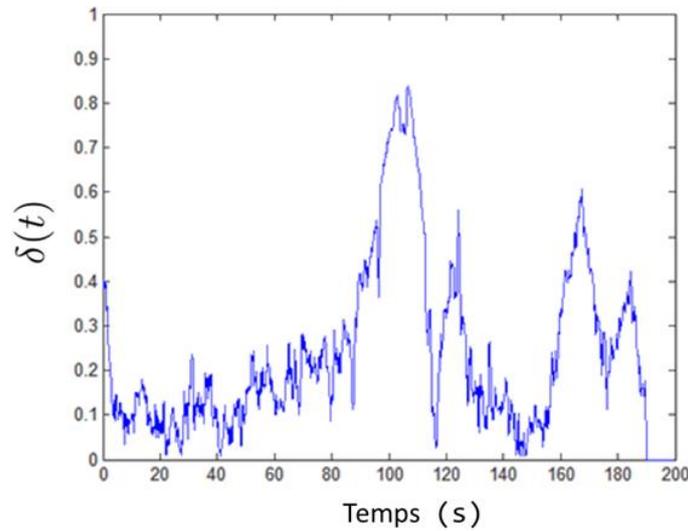


FIGURE 3.6 – Courbe du paramètre de directionnalité  $\delta(t)$  en fonction du temps avec le paramètre  $N_p = 100$  (calculée à partir de la trajectoire de la figure 3.3). On constate qu’il y a 5 pics correspondant aux 5 phases dirigées qu’on peut identifier sur la trajectoire (figure 3.3).

chaînes correspondantes et nous avons constaté que le seuil de  $\delta_s = 0.3$  était valable pour toutes les trajectoires. Nous avons décidé de fixer le seuil à  $\delta_s = 0.3$  pour cette étude et pour toutes les autres.

**Découpage des trajectoires** A partir de la courbe de  $\delta(t)$  et du seuil  $\delta_s = 0.3$ , nous avons pu identifier les intervalles de temps correspondant à des mouvements dirigés. Une fois ces intervalles dirigés identifiés, nous avons découpé la trajectoire pour analyser en détails les phases où le mouvement est dirigé. Nous avons notamment analysé les portions de la courbe de distance élémentaire moyenne  $\overline{d}(t)$  correspondant aux intervalles de temps déterminés précédemment.

## Résultats

A partir de ces intervalles de mouvements dirigés, nous pouvons en particulier déterminer la durée de chaque phase dirigée ( $t_d$ ), ainsi que la proportion de phases dirigées ( $\tau_d$ ) qui correspond au rapport de ces durées cumulées sur la durée totale d’acquisition d’une trajectoire (200s). Il est également possible de déterminer la distance parcourue par une chaîne pendant chaque phase dirigée ( $D_d$ ) et la vitesse moyenne de déplacement ( $v_d$ ). Un récapitulatif de ces résultats est donné dans le tableau 3.1.

**Durée des phases dirigées  $t_d$**  Une fois que nous connaissons les intervalles sur lesquels le mouvement est dirigé, l’accès à  $t_d$  est immédiat. Les résultats sont donnés sous forme d’histogramme montrant la probabilité d’apparition en fonction de la durée des phases dirigées. Ces mêmes résultats sont également donnés sous forme de fonction de répartition. Les données qui correspondent aux analyses des trajectoires avant et après la rotation des chaînes sont présentées sur le même graphe (figure 3.7).

Les moyennes obtenues pour la durée des phases dirigées avant et après la rotation, sont respectivement  $t_d^{\text{avant}} = 1.3 \pm 0.2\text{s}$  et  $t_d^{\text{après}} = 1.1 \pm 0.2\text{s}$ .

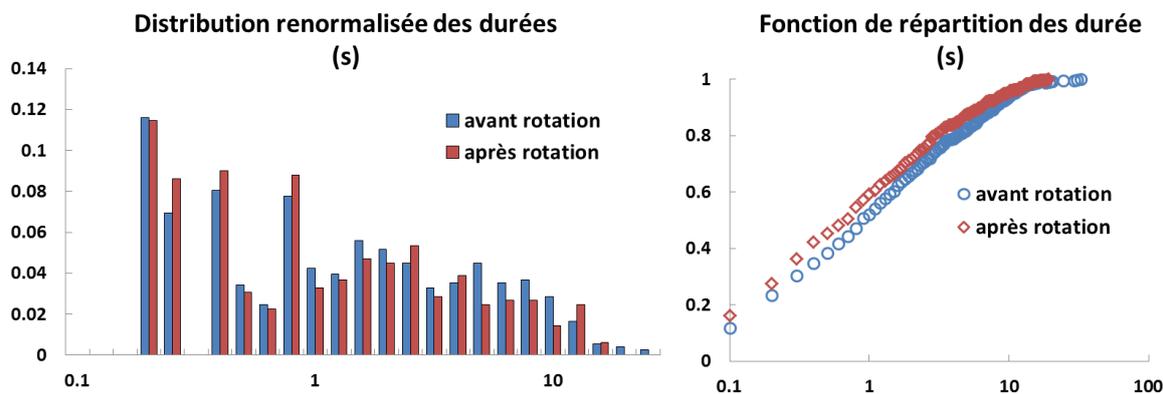


FIGURE 3.7 – Distribution renormalisée et fonction de répartition des durées des phases dirigées. La durée des phases de mouvement dirigé ne semble pas être affectée par la rotation des chaînes. ( $N=40$ )

Il semblerait que la durée des phases dirigées ne soit pas modifiée par la rotation des chaînes.

**Proportion de phases dirigées  $\tau_d$**  Nous connaissons la durée de chacune des phases dirigées d'une trajectoire, il suffit alors de diviser la somme des  $t_d$  d'une trajectoire par sa durée totale pour chaque chaîne. Nous calculons la proportion de phases dirigées pour chaque chaîne (figure 3.8).

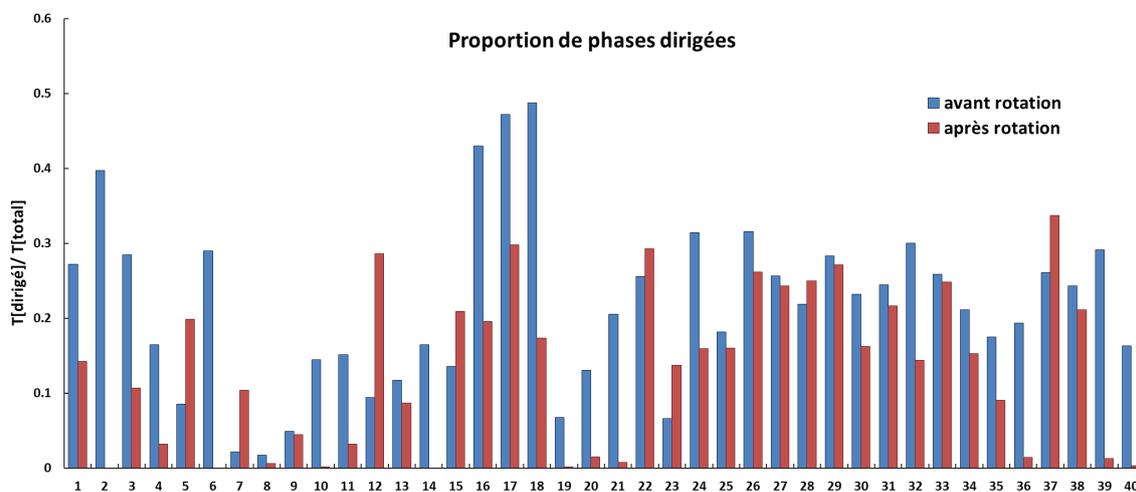


FIGURE 3.8 – Proportion du temps à réaliser des phases de mouvement dirigé pour chaque chaîne, avant et après la rotation. Il y a plus d'événements de mouvement dirigé avant la rotation des chaînes qu'après. ( $N=40$ )

Pour quasiment toutes les chaînes, la proportion de temps passée à réaliser des mouvements dirigés est diminuée après la rotation. Pour certaines chaînes (presque 1/4 de la population), il n'y a quasiment plus d'évènement de mouvement dirigé après la rotation (chaînes 8, 10, 14, 19, 20, 21, 36, 39 et 40).

La moyenne obtenue pour les proportions de phases dirigées avant et après la rotation des chaînes sont respectivement  $\tau_d^{\text{avant}} = 22 \pm 2\%$  et  $\tau_d^{\text{après}} = 13 \pm 2\%$ . On constate une baisse de la proportion de phases dirigées d'environ 40%. Nous avons vu précédemment que la durée moyenne des phases dirigées n'était pas modifiée par la rotation. Si on observe une baisse de la proportion de phases dirigées c'est parce que le nombre d'événements de mouvement dirigé diminue après rotation. On passe d'environ  $15 \pm 1$  événements avant rotation à  $10 \pm 1$  après (pendant les 200S d'acquisition).

**Distance parcourue pendant les phases dirigées  $D_d$**  A partir des intervalles de mouvement dirigé, nous pouvons identifier ces mêmes intervalles sur la courbe de distance élémentaire moyenne. Si nous intégrons la fonction  $\overline{d}(t)$  sur la durée d'un intervalle dirigé, nous avons alors comme résultat la distance parcourue pendant cet intervalle. Les distributions des distances avant et après la perturbation sont données figure 3.9.

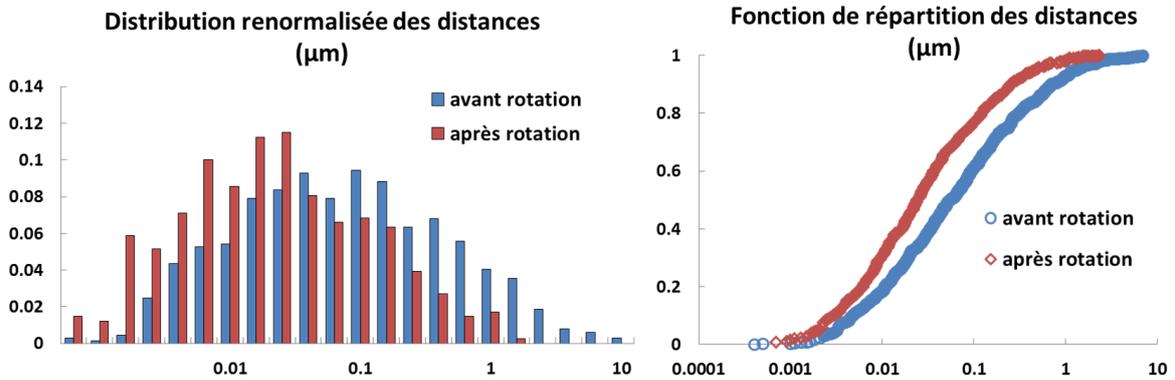


FIGURE 3.9 – Distribution renormalisée et fonction de répartition des distances parcourues pendant les phases dirigées. Les distances parcourues pendant les phases de mouvement dirigé sont plus grandes avant la rotation des chaînes qu'après. ( $N=40$ )

La moyenne des distances parcourues pendant les phases de mouvement dirigé, avant et après la perturbation, sont respectivement  $D_d^{\text{avant}} = 0.058 \pm 0.013\mu\text{m}$  et  $D_d^{\text{après}} = 0.026 \pm 0.007\mu\text{m}$ . (moyenne  $\pm$  SEM)

**Vitesse de déplacement pendant les phases dirigées  $v_d$**  Une fois que nous connaissons la distance moyenne parcourue pendant les phases de mouvement dirigé, nous pouvons simplement diviser cette distance par la durée de l'intervalle. Ainsi, nous pouvons calculer une vitesse moyenne de déplacement pour chaque phase de mouvement dirigé (figure 3.10).

La moyenne des vitesses de déplacement pendant les phases de mouvement dirigé avant et après la perturbation, sont respectivement  $v_d^{\text{avant}} = 0.044 \pm 0.002 \mu\text{m/s}$  et  $v_d^{\text{après}} = 0.024 \pm 0.001 \mu\text{m/s}$  (moyenne  $\pm$  erreur type).

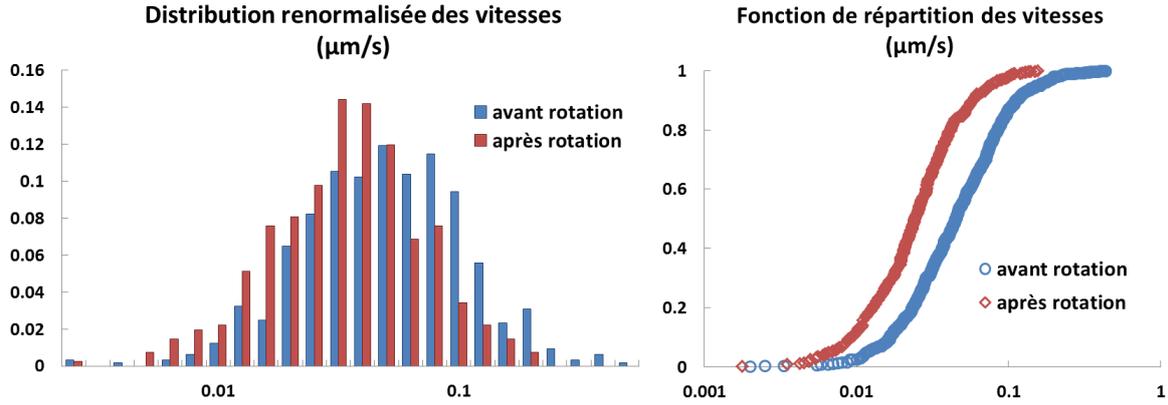


FIGURE 3.10 – Distribution renormalisée et fonction de répartition des vitesses de déplacements pendant les phases dirigées. (N=40) Les mouvements dirigés des chaînes sont plus rapides avant qu'après la rotation des chaînes.

### 3.2.3 Suivi du mouvement des chaînes pendant la rotation (mesures passives)

Nous avons également suivi les déplacements des chaînes pendant les rotations. De manière surprenante, nous avons pu observer quelques événements de mouvement dirigé alors même que la chaîne subissait une rotation. Lors du suivi des chaînes, nous avons rencontré un problème qui ne nous permet pas d'exploiter pleinement ces résultats : la rotation de la chaîne induit une erreur sur la mesure de chaque position. Pour avoir le déplacement de translation de la chaîne, nous devons être au centre de rotation de la chaîne pour éviter de quantifier des déplacements qui seraient dus à la rotation. Seulement le centre de rotation n'est pas forcément confondu avec le centre géométrique de la chaîne, il est donc difficile de l'identifier et il arrive même que le centre de rotation change au cours du temps. Les courbes de MSD (figure 3.11) sont donc à interpréter avec précautions.

Les courbes de la figure 3.11 correspondent aux moyennes géométriques des MSD glissants de 10 chaînes pour chaque fréquence. Les amplitudes et les exposants moyens des MSD pendant les rotations de 0.01 Hz, 0.1 Hz et 1 Hz sont respectivement :

$$D_0^{0.01\text{Hz}} = 0.018 + 0.009 / - 0.004 \mu\text{m}^2 \text{ et } \alpha^{0.01\text{Hz}} = 1.15 \pm 0.05 ;$$

$$D_0^{0.1\text{Hz}} = 0.050 + 0.016 / - 0.008 \mu\text{m}^2 \text{ et } \alpha^{0.1\text{Hz}} = 1.02 \pm 0.05 ;$$

$$D_0^{1\text{Hz}} = 0.049 + 0.024 / - 0.009 \mu\text{m}^2 \text{ et } \alpha^{1\text{Hz}} = 1.02 \pm 0.02.$$

On peut voir que les amplitudes des MSD sont d'emblée supérieures à celles obtenues avant la rotation  $D_0^{\text{avant}} = 0.0159 + 0.0012 / - 0.0008 \mu\text{m}^2$ . Ceci est dû au fait que nous quantifions en plus des mouvements diffusifs de la chaînes, des mouvements qui sont dus à la rotation. Les amplitudes ne sont donc pas exploitables. Les exposants, quant à eux, sont compris entre  $\alpha^{\text{avant}}$  et  $\alpha^{\text{après}}$ . Les valeurs obtenues ne sont pas aberrantes et si elles sont exploitables, il semblerait que l'exposant du MSD diminue lorsque la fréquence augmente.

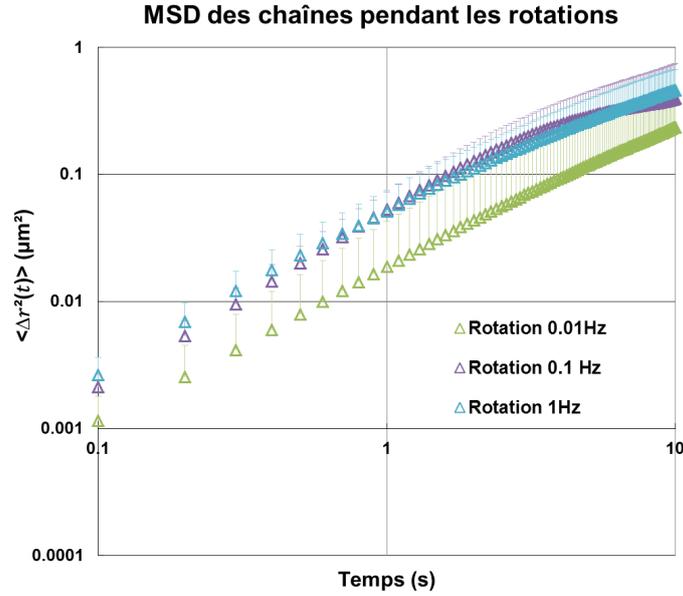


FIGURE 3.11 – MSD des chaînes pendant les différentes rotations (0.01, 0.1, 1 Hz). Moyenne globale calculée à partir des MSD glissants de 10 chaînes. ( $N=10$ ) Les mouvements des chaînes pendant la rotation à 0.01 Hz sont super-diffusifs. Pendant les rotations de 0.1 et 1 Hz, ils deviennent quasi-diffusifs, ce qui correspond au régime après rotation.

### 3.2.4 Discussion

Nous avons suivi les mouvements de chaînes d'endosomes avant, pendant et après leur propre rotation dans le cytoplasme. Dans un premier temps, les courbes de déplacement quadratique moyen nous montrent une diminution du trafic intracellulaire après la perturbation mécanique. Nous avons observé une baisse de l'amplitude du MSD d'environ 30 % et l'exposant passe de  $\alpha^{avant} = 1.2$  à  $\alpha^{après} = 1.0$ , autrement dit, on passe d'un comportement super-diffusif à un comportement quasi-diffusif (figure 3.12). Ceci met en évidence une diminution globale de l'activité des moteurs après la rotation des chaînes.

De plus, lorsque nous analysons plus en profondeur les trajectoires et que nous distinguons les phases de mouvement dirigé des phases non dirigées suivant 2 critères ( $N_p = 100$  et  $\delta_s = 0.3$ ), nous constatons qu'il y a environ 1.5 fois moins d'événements dirigés après la rotation. Nous pouvons interpréter ce résultat en considérant que l'attachement des moteurs aux microtubules est affecté par la rotation, dans le sens où les événements dirigés sont moins nombreux après la rotation. Ce qui signifie que soit les moteurs sont moins efficaces (comportement individuel), soit une partie des moteurs est inactivée (comportement collectif). Cependant lorsque les moteurs sont actifs, leur durée d'activité semble être inchangée ( $t_d^{avant} \approx t_d^{après}$ ), mais on ne peut pas en dire autant de la distance parcourue ou de la vitesse pendant les phases actives, qui elles diminuent d'un facteur 2 après la rotation des chaînes (voir tableau 3.1).

La baisse de la proportion de phases dirigées après la rotation peut expliquer à elle seule l'observation faite à partir des courbes de MSD. Seulement, en regardant la distance parcourue et la vitesse pendant les phases de mouvement dirigé, nous constatons, qu'en plus d'une baisse du nombre d'événements de mouvement dirigé, la rotation des chaînes induit une diminution de la distance parcourue et de la vitesse moyenne pendant les phases de mouvement dirigé. De plus, cette

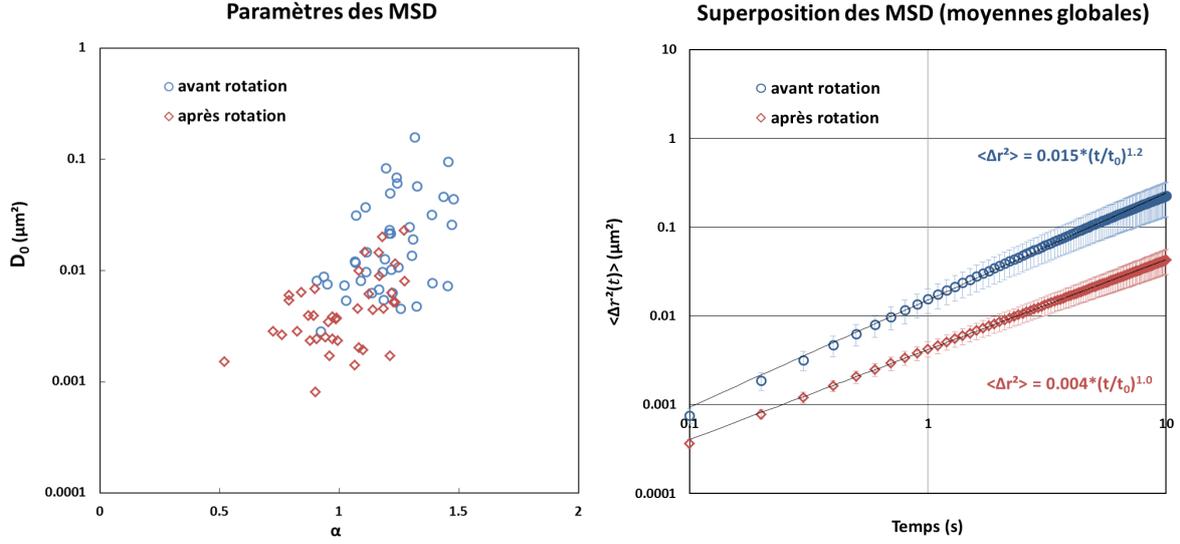


FIGURE 3.12 – Superposition des courbes de MSD avant et après la rotation des chaînes. L'amplitude ainsi que l'exposant des MSD diminue après la rotation des chaînes ( $N=40$ ).

	Avant la rotation	Après la rotation
Nombre d'événements dirigés par chaîne	$15 \pm 1$	$10 \pm 1$
Proportion de phases dirigées $\tau_d$	$22 \% \pm 2 \%$	$13 \% \pm 1 \%$
Durée $t_d$ (s)	$1.3 \pm 0.1$	$1.1 \pm 0.2$
Distance moyenne parcourue $D_d$ ( $\mu\text{m}$ )	$0.058 \pm 0.013$	$0.026 \pm 0.007$
Vitesse moyenne $v_d$ ( $\mu\text{m/s}$ )	$0.044 \pm 0.002$	$0.024 \pm 0.001$

TABLE 3.1 – Tableau récapitulatif des moyennes et l'erreur type des grandeurs physiques mesurées après analyse des trajectoires des chaînes d'endosomes. Comparaison des résultats obtenus avant et après la rotation des chaînes.

perturbation du trafic intracellulaire des chaînes par leur propre rotation ne semble pas réversible. Nous avons analysé les trajectoires (200s) après la rotation des chaînes en les découpant en 4 intervalles de 50s. Aucune "récupération" n'a été observée durant les 200s qui suivent la perturbation. Nous avons observé autant d'événements de mouvement dirigé pendant les 50 premières secondes que pendant les deuxième, troisième et quatrième intervalles de 50s qui suivent la perturbation.

Lors du suivi des chaînes pendant les rotations, les exposants des MSD pour les différentes fréquences sont inférieurs à celui mesuré avant rotation ( $\alpha^{avant} = 1.2 > \alpha^{0.01Hz} > \alpha^{0.1,1Hz}$ ). De plus l'effet semble progressif de 0.01 à 0.1Hz. Nous avons découpé les trajectoires des chaînes pendant la rotation pour savoir quelle était la proportion de phases dirigées. Nous avons obtenu des valeur autour de  $\tau_d^{rotation} = 0.1$  quelle que soit la fréquence de rotation ( $\tau_d^{0.01Hz} = 0.11 \pm 0.02$ ,  $\tau_d^{0.1Hz} = 0.10 \pm 0.03$ ,  $\tau_d^{1Hz} = 0.12 \pm 0.03$ ). Cette valeur est inférieure à celle mesurée avant la rotation ( $\tau_d^{avant} = 0.22 \pm 0.02$ ) mais s'approche de celle mesurée après la rotation ( $\tau_d^{après} = 0.13 \pm 0.02$ ). Le comportement des chaînes pendant la rotation semble donc similaire à celui après la rotation.

Tous ces résultats montrent que le trafic intracellulaire des chaînes est diminué par leur rotation mais il n'est pas complètement inhibé ( $\alpha^{\text{rotation}} \geq 1$ ).

Par ailleurs, la persistance de mouvement dirigé pendant les rotations montre à quel point le trafic intracellulaire est robuste. Une chaîne peut continuer à bouger "activement" grâce aux moteurs moléculaires, même lorsqu'elle est soumise à un mouvement rotationnel forcé. Le changement de centre de rotation au cours du temps, semble indiquer que le centre de rotation est déterminé par une liaison moteur-microtubule. La rotation de la chaîne ne semble pas empêcher les moteurs de se relayer, car nous avons observé à plusieurs reprises, une modification du centre de rotation de la chaîne.

A ce stade, plusieurs hypothèses non exclusives s'offrent à nous. Nous ne savons pas si la baisse du trafic intracellulaire des chaînes est due à un réarrangement du réseau des filaments du cytosquelette ou à une modification directe du fonctionnement des moteurs. Ce point sera abordé dans la partie 3.4. Mais tout d'abord, regardons dans quelle mesure les propriétés mécaniques du cytoplasme ont été modifiées par la rotation des chaînes.

### 3.3 Impact d'une perturbation mécanique sur les propriétés viscoélastiques du cytoplasme

Le système utilisé pour mesurer l'impact de la rotation sur le trafic intracellulaire d'une chaîne d'endosomes a également été utilisé pour réaliser des mesures actives. Comme ce système nous permet de disposer d'un petit nombre de chaînes indépendantes, il est idéal pour des mesures actives. Celles-ci consistent à mesurer la relaxation de position angulaire des chaînes d'endosomes magnétiques lorsqu'on les soumet à une variation instantanée de la direction du champ magnétique. A l'échelle nanométrique, lorsque la position angulaire du champ change de façon instantanée, les moments magnétiques de chaque nanoparticule s'alignent avec le champ très rapidement, de façon à ce que le moment magnétique global d'un endosome soit aligné avec la direction du champ magnétique. Au sein d'une chaîne d'endosomes, les forces d'interaction entre les moments magnétiques des endosomes poussent les endosomes à aligner leur moment magnétique, ce qui engendre la rotation globale de la chaîne vers une nouvelle position d'équilibre.

#### 3.3.1 Résultats des mesures actives

Nous enregistrons la position angulaire des chaînes pendant 100s durant 4 sauts angulaires successifs du champ magnétique d'environ  $45^\circ$  (voir 2.2.2 pour les détails). Ces mesures sont effectuées avant et juste après une série de 3 rotations successives de 3 min chacune (à 0.01 Hz, 0.1 Hz et 1 Hz), avec une acquisition de 100 images par seconde. La relaxation de la chaîne suite à la modification de l'orientation du champ est suivie pendant 25s pour chaque saut angulaire. Cependant nous avons constaté que le temps de relaxation de la position angulaire des chaînes est inférieure à 150 ms. L'analyse des images avec un plugin d'ImageJ nous donne la position angulaire en fonction du temps de chacune des chaînes, pendant les 150 premières millisecondes qui suivent le saut angulaire. La taille des chaînes, le couple magnétique ainsi que les propriétés mécaniques influencent la dynamique de relaxation de la position angulaire des chaînes. Nous avons suivi la relaxation d'une dizaine de chaînes subissant 4 sauts angulaires successifs. Cependant, il arrive souvent que la rotation de la chaîne soit bloquée, probablement par un obstacle (un organite) ou que la chaîne se casse durant les premières millisecondes. Les données de ces chaînes n'ont pas été traitées et il y a 25 sauts avant la rotation et 19 sauts après la rotation qui ont été exploités.

#### Avant la perturbation

Les positions angulaires des chaînes soumises à 4 sauts angulaires du champ magnétique avant les rotations des chaînes sont données figure 3.13.

La position angulaire est normalisée par l'amplitude du saut angulaire du champ magnétique, voisine de  $45^\circ$  pour chaque saut. Les courbes sont classées par couleur suivant le nombre d'endosomes ( $N_e$ ) constituant la chaîne. Il y a 4 types de chaînes :  $N_e = 2, 3, 4$  et 5.

#### Après la perturbation

Les positions angulaires des chaînes soumises à 4 sauts angulaires du champ magnétique après les rotations sont données figure 3.14.

Il y a 4 types de chaînes :  $N_e = 2, 3$  et 4. On peut remarquer que la taille des chaînes a diminué par rapport à celles présentes avant la rotation.

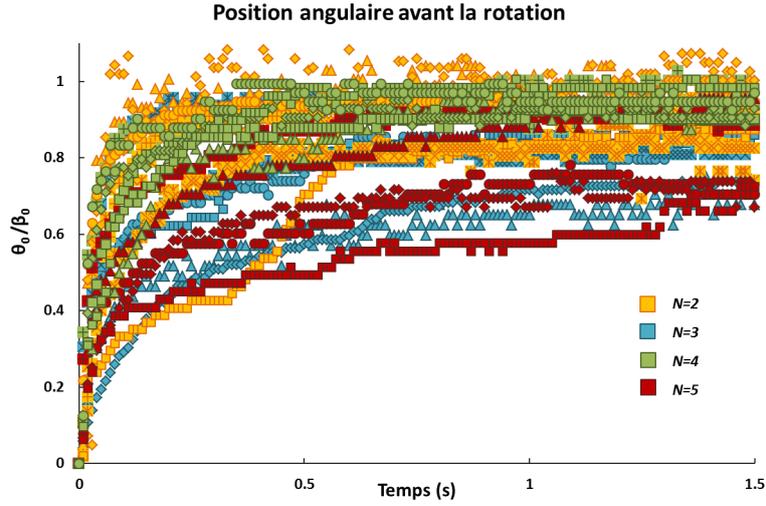


FIGURE 3.13 – Position angulaire renormalisée des chaînes avant rotation, lorsque le champ magnétique fait des sauts angulaires d'environ  $45^\circ$ . Il y a 4 types de chaînes :  $N_e = 2, 3, 4$  et 5. La position angulaire des chaînes relaxe vers la position du champ. ( $N=25$ )

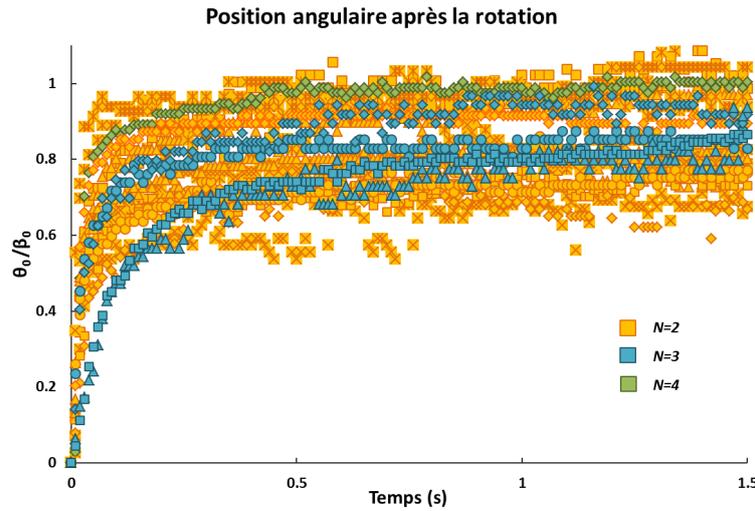


FIGURE 3.14 – Position angulaire renormalisée des chaînes après rotation, lorsque le champ magnétique fait des sauts angulaires d'environ  $45^\circ$ . Il y a 3 types de chaînes :  $N_e = 2, 3$  et 4. La position angulaire des chaînes relaxe vers la position du champ. ( $N=19$ )

### 3.3.2 Analyse des mesures actives avant et après la perturbation

Lors de mesure active de relaxation, on peut relier la contrainte  $\sigma(t)$ , la déformation  $\epsilon(t)$  et la fonction de fluage  $J(t)$  de la façon suivante :

$$\epsilon(t) = \int_{-\infty}^t J(t-t') \dot{\sigma}(t') dt' \quad (3.5)$$

Dans notre cas, la déformation correspond à la position angulaire et la contrainte au couple magnétique ( $\Gamma = \frac{3\mu_0 m^2 N_e^2 \sin(2\varphi)}{4\pi d^3}$ ) où  $\varphi = \beta - \theta$  est le déphasage entre les positions angulaires du champ  $\beta$  et de la chaîne ( $\theta$ ) divisé par le volume. On peut donc relier la position angulaire des chaînes, le couple magnétique et la fonction de fluage suivant l'équation 3.6.

$$\theta(t) = \int_0^t J(t-t') \frac{\dot{\Gamma}(t')}{\kappa V} dt' \quad (3.6)$$

où  $V = N_e v$  est le volume d'une chaîne constituée de  $N_e$  endosomes de volume  $v$  et  $\kappa = \frac{2N_e^2}{\ln(\frac{N_e}{2}) + \frac{2.4}{N_e}}$  un facteur géométrique adimensionné (voir [58, 63]).

A l'aide d'une intégration par parties et d'un changement de variable, la relation 3.6 peut être réécrite sous la forme :

$$\theta(t) = \frac{1}{\kappa V} \int_0^t \dot{J}(t') \Gamma(t-t') dt' \quad (3.7)$$

Les mesures sont échantillonnées à intervalles de temps  $\Delta t$  réguliers. On peut donc discrétiser la relation 3.7 de la manière suivante :

$$\theta_i = \frac{1}{\kappa V} \sum_{k=1}^i J'_k \Gamma_{i-k+1} \Delta t \quad (3.8)$$

On peut donc calculer par récurrence le  $J'_i$  à partir de la relation 3.8 et en déduire les  $J_i = \sum_{k=1}^i J'_k \Delta t$ .

$$J'_i = \frac{1}{\Gamma_1} \left[ \frac{\kappa V \theta_i}{\Delta t} - \sum_{k=1}^{i-1} J'_k \Gamma_{i-k+1} \right] \quad (3.9)$$

Les mesures effectuées ci-après montrent que la fonction de fluage se comporte en loi puissance (équation 3.10) dont l'amplitude est distribuée de façon log-normale [39]. Les moyennes globales seront donc des moyennes géométriques des fonctions de fluage calculées à partir des positions angulaires correspondant aux différents sauts angulaires, selon l'équation 3.9.

$$J(t) = J_0 * \left( \frac{t}{t_0} \right)^\gamma \quad (3.10)$$

### Avant la perturbation

Les fonctions de fluage correspondant à chaque saut angulaire ainsi que la moyenne globale avant la rotation, sont tracées figure 3.15.

La moyenne globale des fonctions de fluage confirme que le cytoplasme est un milieu visco-élastique, car l'exposant est compris entre 0 (cas d'un solide élastique) et 1 (cas d'un liquide purement visqueux). L'exposant moyen est de  $\gamma^{\text{avant}} = 0.55 \pm 0.03$  et l'amplitude moyenne est de  $J_0^{\text{avant}} = 0.15 + 0.05 / -0.02 \text{ Pa}^{-1}$ . Les résultats sont donnés sous forme de moyenne  $\pm$  l'erreur type (SEM).

### Après la perturbation

Les courbes de fonction de fluage obtenues après rotation des chaînes sont données figure 3.16.

Après la rotation des chaînes, on a encore  $0 < \gamma^{\text{après}} < 1$ . L'exposant moyen est de  $\gamma^{\text{après}} = 0.42 \pm 0.04$  et l'amplitude moyenne est de  $J_0^{\text{après}} = 0.12 + 0.03 / -0.01 \text{ Pa}^{-1}$ .

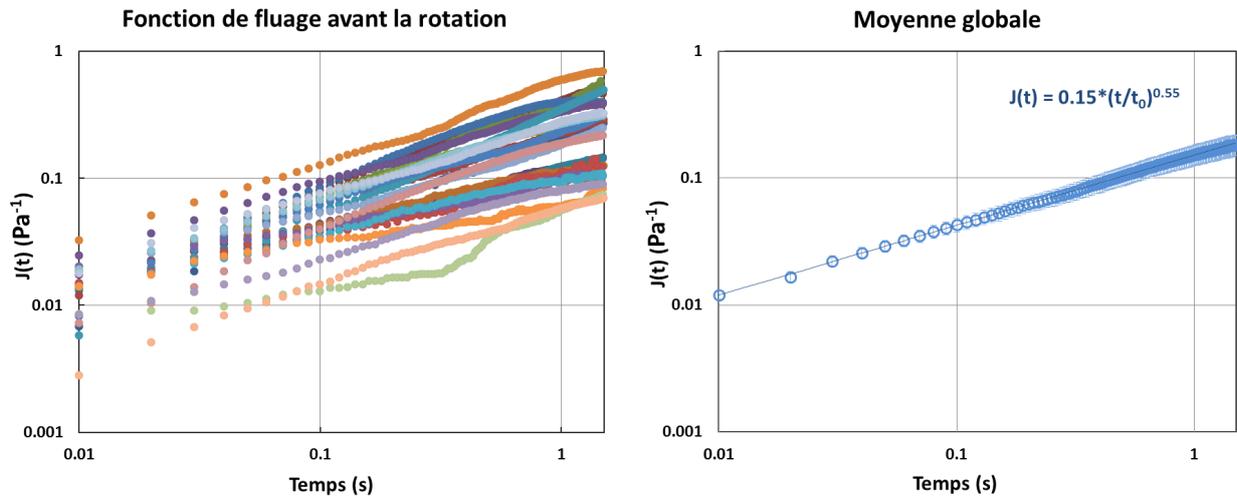


FIGURE 3.15 – Fonction de fluage pour les 25 sauts angulaires et la moyenne globale, avant la rotation. Le comportement est viscoélastique avant la perturbation. (N=25)

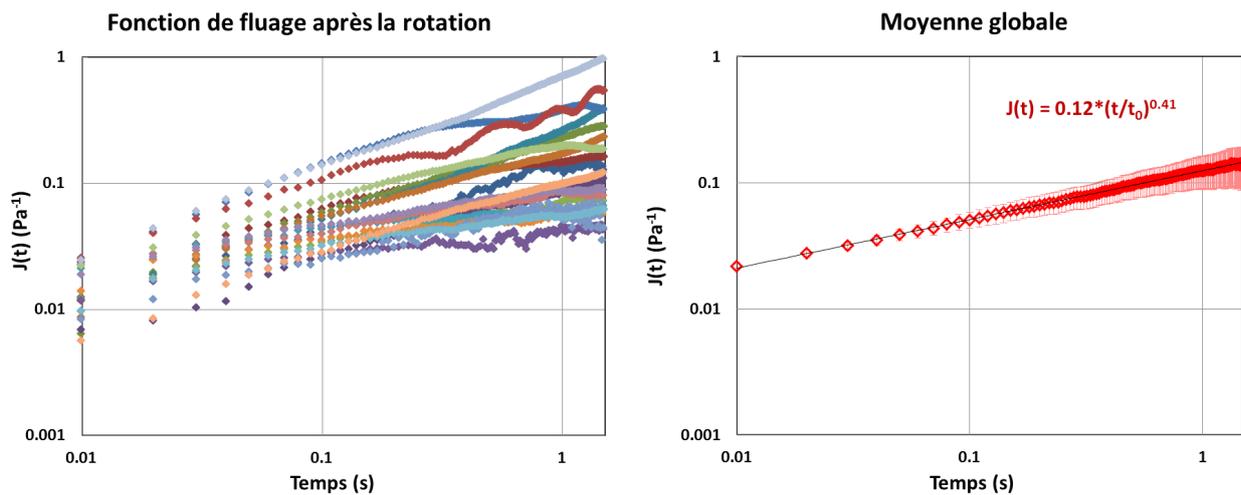


FIGURE 3.16 – Fonction de fluage pour les 19 sauts angulaires et la moyenne globale, après la rotation. Le comportement est viscoélastique après la perturbation. (N=19)

### 3.3.3 Discussion

Lors des mesures actives, nous avons effectué 4 sauts angulaires successifs appliqués aux chaînes d'endosomes magnétiques via un couple magnétique dont la position angulaire est modifiée instantanément d'un angle d'environ  $45^\circ$ . Nous avons fait ces mesures avant et après 3 rotations successives (à 0.01, 0.1 et 1 Hz) de ces mêmes chaînes. Nous avons analysé les données expérimentales en terme de fonction de fluage, calculée à partir de la position angulaire des chaînes et de l'amplitude du couple magnétique.

En étudiant les courbes de moyenne globale des fonctions de fluage (figure 3.17), nous avons

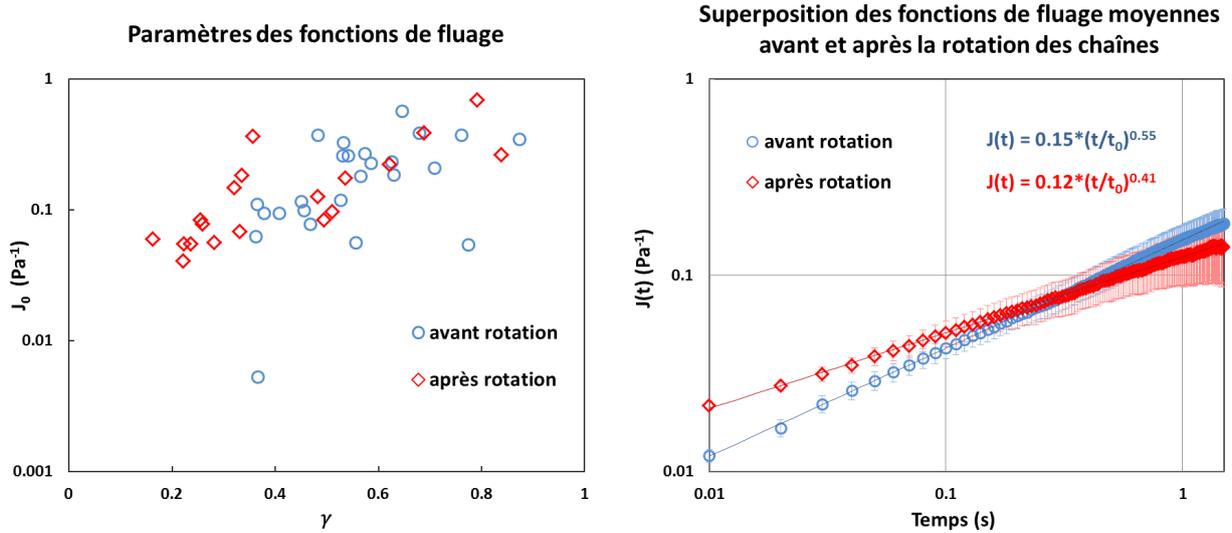


FIGURE 3.17 – Répartition des paramètres ( $\gamma$  et  $J_0$ ) et superposition des moyennes globales de la fonction de fluage avant (bleu) et après (rouge) la rotation des chaînes.

constaté qu'aussi bien avant la rotation des chaînes qu'après, l'exposant de la fonction de fluage est compris entre 0 et 1, témoignant d'un comportement viscoélastique du cytoplasme au voisinage des chaînes. Les 3 rotations successives créent un cisaillement local du cytoplasme, dont les propriétés viscoélastiques ne semblent pas être modifiées par ces rotations. À la fois l'exposant de la fonction de fluage,  $\gamma^{\text{avant}} = 0.55 \pm 0.03 \approx \gamma^{\text{après}} = 0.42 \pm 0.04$  et l'amplitude  $J_0^{\text{avant}} = 0.15 \pm 0.03 \text{ Pa}^{-1} \approx J_0^{\text{après}} = 0.12 \pm 0.04 \text{ Pa}^{-1}$  ne sont pas modifiés de façon significative.

Il semble donc que les rotations des chaînes ne modifient pas les propriétés mécaniques locales au voisinage de ces chaînes. Ce résultat est plutôt surprenant, car nous nous attendions à ce que la rotation agisse sur la composante dissipative en la diminuant (tel un milieu rhéofluidifiant) et éventuellement sur la composante élastique par une modification du réseau de microtubules (réarrangement, voire dégradation), correspondant à une diminution du coefficient élastique. En effet, lorsque les microtubules sont dépolymérisés, le cytoplasme devient plus fluide ce qui correspond à une augmentation de l'exposant du module complexe viscoélastique  $G(\omega)$  qui est le même que celui de  $J(t)$  et une diminution de l'amplitude de  $G(\omega)$  qui correspondrait à une augmentation de  $J(t)$  [24].

Cependant, même si la comparaison de la fonction de fluage entre avant la rotation des chaînes et après met en évidence une faible différence, les résultats nous montrent qu'on a plutôt une diminution de l'exposant  $\gamma$ , ce qui va à l'encontre de ce qui est attendu.

### 3.4 Impact d'une perturbation mécanique globale sur le trafic intracellulaire d'un endosome unique

Pour savoir dans quelle mesure le trafic intracellulaire est perturbé par un cisaillement mécanique agissant sur le milieu environnant, nous avons étudié le trafic intracellulaire d'endosomes uniques et non magnétiques se trouvant dans une zone pouvant être cisailée par la rotation de chaînes d'endosomes magnétiques. Ici la rotation des chaînes agit indirectement sur le trafic intracellulaire des endosomes en cisillant la zone du cytoplasme dans laquelle se trouvent les endosomes. Après avoir marqué magnétiquement les cellules, nous formons des chaînes de 3 à 8 endosomes magnétiques. Une fois sous microscope l'échantillon est plongé dans un champ magnétique (dont la position angulaire est constante) afin de conserver la structure des chaînes prévues pour le cisaillement. Nous étudions le mouvement spontané d'endosomes ponctuels non magnétiques avant et après une rotation à 0.05Hz pendant 6 min par des calculs de déplacement quadratique moyen puis par des analyses plus détaillées des trajectoires.

#### 3.4.1 Résultats des mesures passives

##### Avant la perturbation

Nous avons calculé le MSD glissant de chaque endosome avant la perturbation ainsi que la moyenne globale des 15 endosomes. Ces résultats sont donnés figure 3.18.

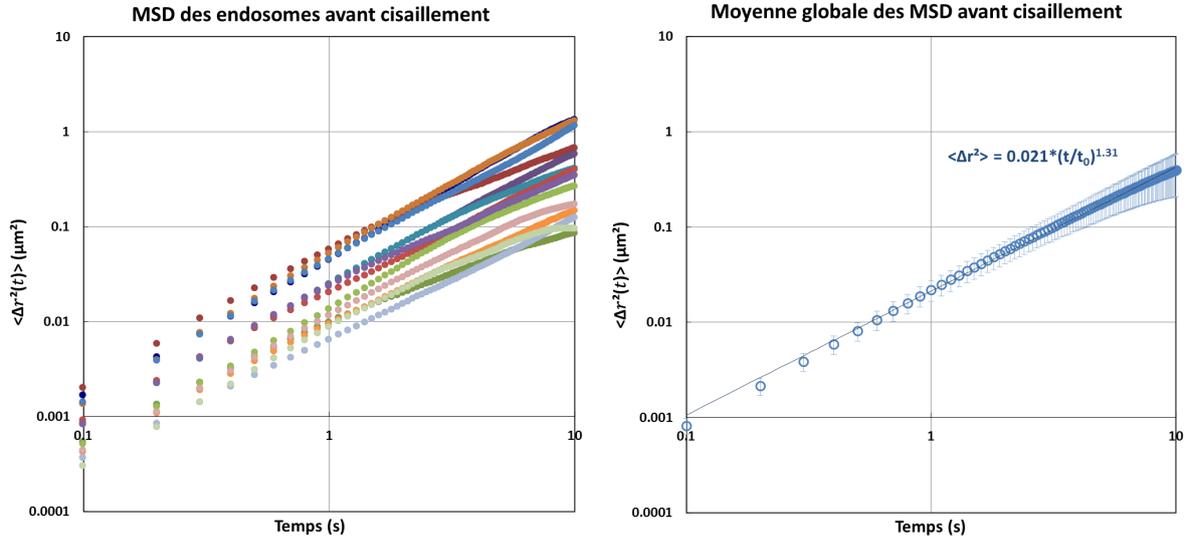


FIGURE 3.18 – MSD glissant des endosomes avant le cisaillement. Moyenne globale des 15 endosomes. Les endosomes ont un comportement super-diffusif avant le cisaillement. La barre d'erreur correspond à la l'erreur type (SEM). (N=15)

Les endosomes ont un comportement super-diffusif avant le cisaillement, avec une amplitude moyenne du MSD de  $D_0^{\text{avant}} = 0.021 + 0.006/ - 0.003 \mu\text{m}^2$  et un exposant moyen de  $\alpha^{\text{avant}} = 1.31 \pm 0.03$ .

### Après la perturbation

De la même façon qu'avant la perturbation, nous avons calculé le MSD de chaque endosome ainsi que la moyenne globale des MSD après le cisaillement (figure 3.19).

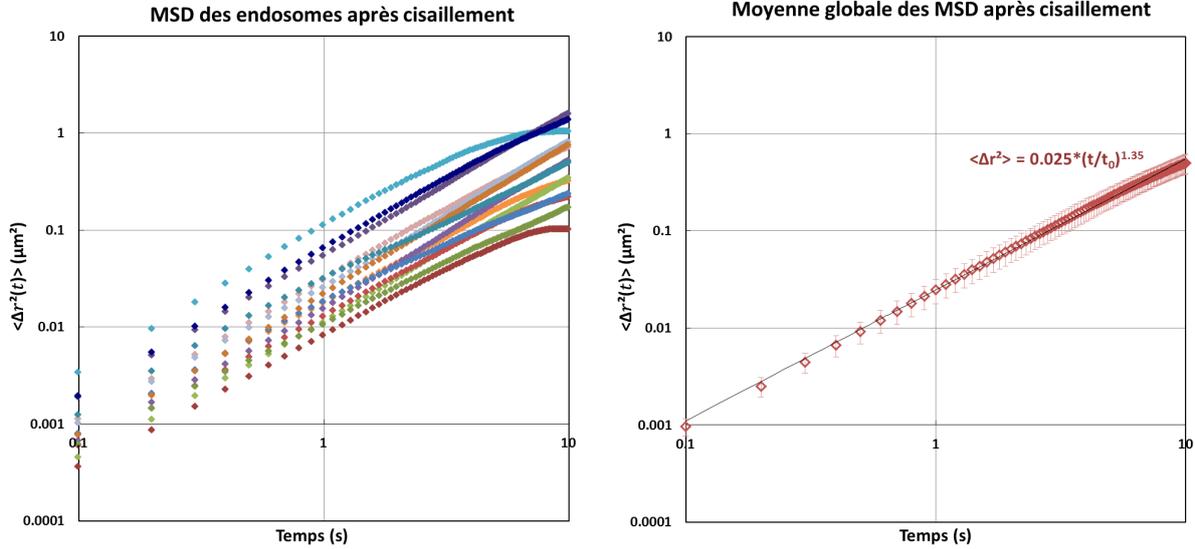


FIGURE 3.19 – MSD glissant des endosomes après le cisaillement. Moyenne géométrique des 15 endosomes. Les endosomes ont un comportement super-diffusif après le cisaillement. La barre d'erreur correspond à la l'erreur type (SEM). (N=15)

Les endosomes ont un encore un comportement super-diffusif après le cisaillement, avec une amplitude moyenne du MSD de  $D_0^{\text{avant}} = 0.025 + 0.007 / - 0.003 \mu\text{m}^2$  et un exposant moyen de  $\alpha^{\text{avant}} = 1.35 \pm 0.03$ .

#### 3.4.2 Analyse des mesures passives avant et après la perturbation

De la même façon que pour le trafic des chaînes, nous avons analysé les trajectoires des endosomes, afin d'extraire des paramètres tels que la proportion de phases dirigées, la durée, la distance et la vitesse des phases dirigées, avant et après le cisaillement. Les fonctions de répartition de ces grandeurs sont données figure 3.20.

Nous avons observé en moyenne  $14 \pm 1$  événements de mouvement dirigé par endosome avant le cisaillement et  $12 \pm 1$  après sur une durée de 200s.

Les proportions moyennes de phases dirigées sont :  $\tau_d^{\text{avant}} = 25 \pm 1\%$  et  $\tau_d^{\text{après}} = 23 \pm 1 \%$ .

Les durées moyennes des phases dirigées sont :  $t_d^{\text{avant}} = 1.4 \pm 0.3 \text{ s}$  et  $t_d^{\text{après}} = 1.4 \pm 0.4 \text{ s}$ .

Les distances moyennes parcourues pendant les phases dirigées sont :  $D_d^{\text{avant}} = 0.070 \pm 0.004 \mu\text{m}$  et  $D_d^{\text{après}} = 0.080 \pm 0.015 \mu\text{m}$ .

Les vitesses moyennes de déplacement pendant les phases dirigées sont :  $v_d^{\text{avant}} = 0.048 \pm 0.004 \mu\text{m/s}$  et  $v_d^{\text{après}} = 0.056 \pm 0.005 \mu\text{m/s}$ .

Toutes ces données sont regroupées dans le tableau 3.2.

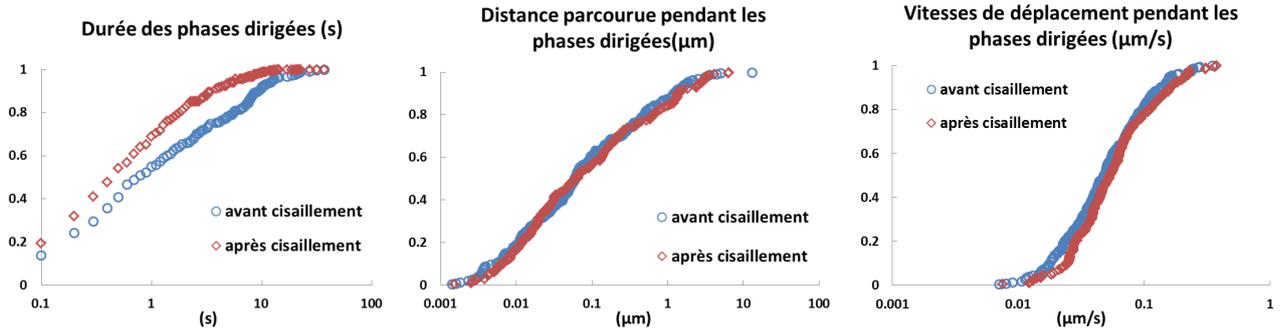


FIGURE 3.20 – Fonctions de répartition des durées des phases dirigées, distance parcourue pendant les phases dirigées et des vitesses de déplacement pendant les phases dirigées des endosomes avant et après le cisaillement. Les durées, distances parcourues ainsi que les vitesses moyennes ne semblent pas être affectées par le cisaillement.

### 3.4.3 Discussion

Nous avons suivi le trafic d’endosomes ponctuels non magnétiques localisés dans une zone pouvant être cisailée par la rotation de chaînes d’endosomes magnétiques. Dans un premier temps, nous avons calculé le déplacement quadratique moyen de 15 endosomes avant et après le cisaillement. Les courbes de MSD (figure 3.21) nous montrent que la mobilité des endosomes ne semble pas avoir été modifié par le cisaillement.

Dans un deuxième temps, nous avons analysés les trajectoires afin d’isoler les phases de mouvement dirigé, dont nous avons pu extraire la proportion de phases dirigées, la durée des phases dirigées, la distance parcourue et la vitesse moyenne pendant les phases dirigées (voir tableau 3.2). Nous avons constaté que les différences de ces grandeurs avant et après le cisaillement ne sont pas significatives (figure 3.20, 3.26).

	Avant le cisaillement	Après le cisaillement
Nombre d’événements par endosome	$14 \pm 1$	$12 \pm 1$
Proportion de phases dirigées $\tau_d$	$25 \% \pm 1 \%$	$23 \% \pm 1 \%$
Durée $t_d$ (s)	$1.4 \pm 0.3$	$1.4 \pm 0.4$
Distance parcourue $D_d$ ( $\mu\text{m}$ )	$0.070 \pm 0.004$	$0.080 \pm 0.015$
Vitesse moyenne $v_d$ ( $\mu\text{m/s}$ )	$0.048 \pm 0.004$	$0.056 \pm 0.005$

TABLE 3.2 – Tableau récapitulatif donnant la moyenne et l’erreur type des grandeurs physiques mesurées après analyse des trajectoires des endosomes. Comparaison des résultats avant et après cisaillement.

Il semble donc que le trafic intracellulaire d’endosomes ponctuels ne soit pas perturbé par un cisaillement global du cytoplasme environnant, tel que nous l’effectuons.

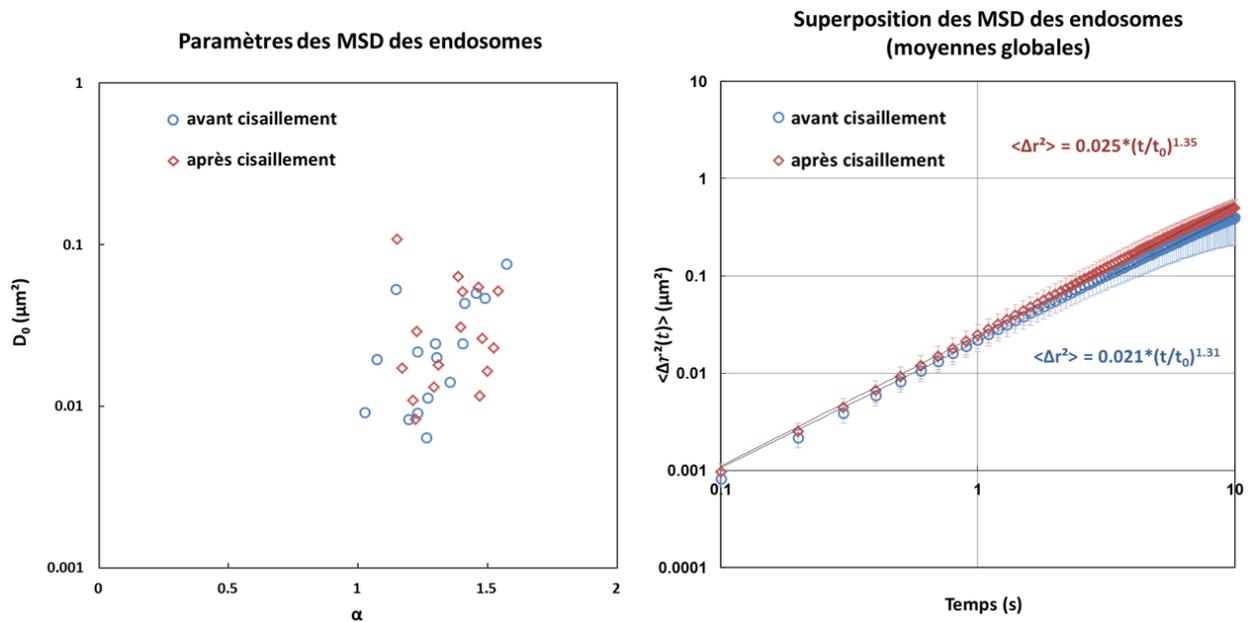


FIGURE 3.21 – Superposition des courbes de MSD et les paramètres extraits des MSD des endosomes avant et après le cisaillement. Les endosomes ont un comportement similaire avant et après la perturbation. (N=15)

### 3.5 Comparaison entre le mouvement d'un endosome unique et d'une chaîne à $N_e$ endosomes

Dans toutes les parties précédentes, il s'agissait de comparer le trafic intracellulaire d'un objet (chaîne ou endosome) avant et après une perturbation mécanique. Maintenant nous vous proposons de comparer le trafic intracellulaire d'un endosome et d'une chaîne à  $N_e$  endosomes.

#### 3.5.1 Résultats des mesures passives

Les données concernant les endosomes sont les mêmes que celles de la partie "Impact d'une perturbation mécanique globale sur le trafic intracellulaire d'un endosome" (3.4) (avant cisaillement). Celles concernant les chaînes sont extraites de la partie "Impact d'une perturbation mécanique locale sur le trafic intracellulaire d'une chaîne d'endosomes" (3.2) (avant rotation des chaînes). Les MSD correspondant à chaque population d'objet (endosome  $N_e=1$ , chaînes  $N_e=2, 3$  ou 4) sont tracés figure 3.22 avec un code couleur différent pour chaque nombre d'endosomes  $N_e$ . On constate que les courbes correspondant aux différentes populations forment un nuage homogène. Les moyennes sur chaque  $N_e$  ne donnent pas de variation significative.

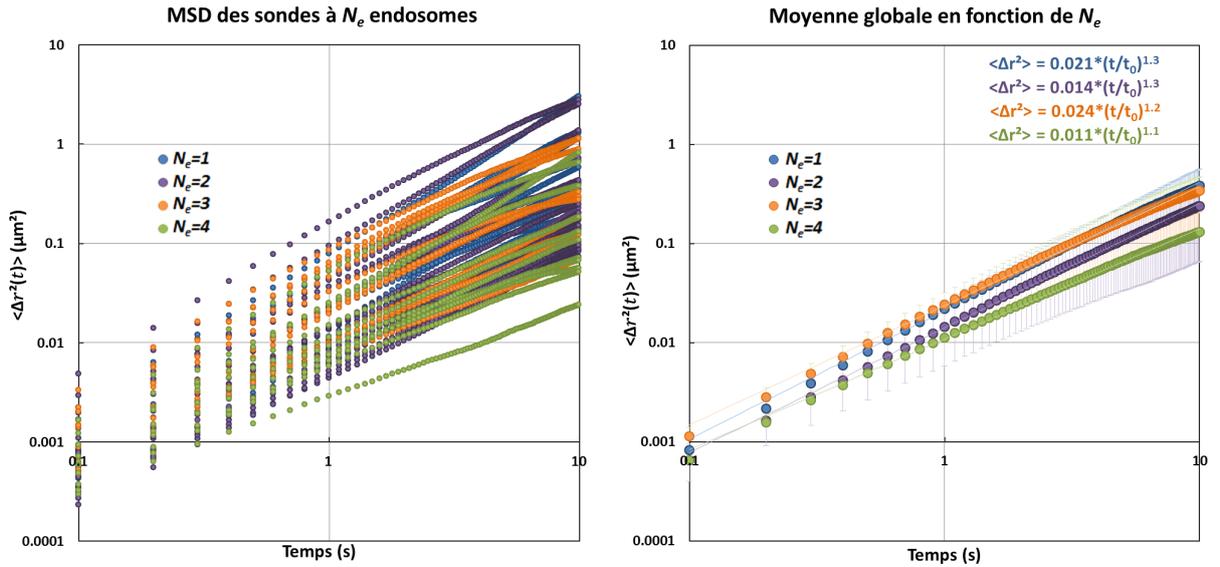


FIGURE 3.22 – Superposition des MSD de chaque objet à  $N_e$  endosome(s) ( $N_e=1$  en bleu,  $N_e=2$  en violet,  $N_e=3$  en orange,  $N_e=4$  en vert, avec respectivement 16, 20, 11 et 11 courbes) et moyenne globale des MSD pour chaque  $N_e$ . Le nombre d'endosomes constituant la sonde ne semble pas avoir d'incidence sur les MSD.

#### 3.5.2 Analyse des mesures passives en fonction du nombre d'endosomes $N$

A partir des trajectoires des différentes populations de sondes, nous avons analysé les phases dirigées pour en extraire le nombre moyen de phases dirigées par sonde ainsi que la vitesse moyenne de déplacement.

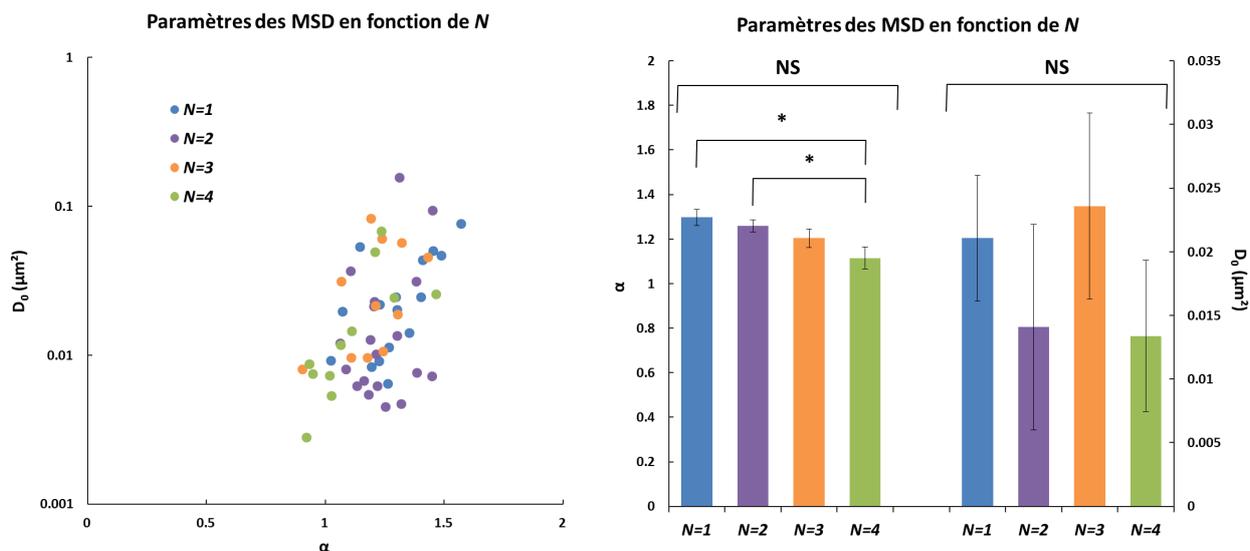


FIGURE 3.23 – Répartition et statistique sur les exposants  $\alpha$  et les amplitudes des MSD en fonction de  $N_e$  (nombre d'endosomes constituant la sonde). Sauf cas indiqué, les données ne sont pas significativement différentes. Il semble n'y avoir qu'un léger effet sur l'exposant des MSD lorsque  $N_e$  varie ( $\alpha$  diminue quand  $N_e$  augmente). Les amplitudes des MSD sont conservées quel que soit  $N_e$ .

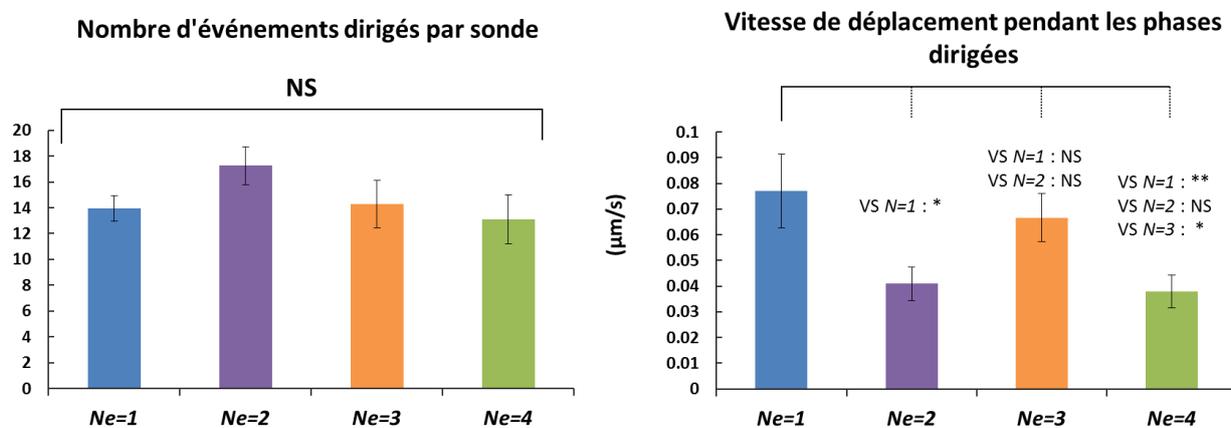


FIGURE 3.24 – Nombre d'événements dirigés par sonde et vitesse moyenne de déplacement lors des phases de mouvement dirigé en fonction de  $N_e$  (nombre d'endosomes constituant la sonde). Le nombre d'événements dirigés ne semble pas dépendre du nombre d'endosomes constituant la sonde. La vitesse par contre semble plus importante dans les cas où  $N_e$  est impair.

Le nombre d'événements moyen de phases dirigés par sonde sur une durée de 200s en fonction du nombre d'endosomes  $N_e=1, 2, 3$  ou  $4$  sont respectivement :  $14 \pm 1$  ( $N_e=1$ ),  $17 \pm 1$  ( $N_e=2$ ),  $14 \pm 2$  ( $N_e=3$ ) et  $13 \pm 1$  ( $N_e=4$ ). Les vitesses moyennes de déplacement sont :  $v_d^{N_e=1} = 0.08 \pm 1 \mu\text{m/s}$ ,  $v_d^{N_e=2} = 0.04 \pm 1 \mu\text{m/s}$ ,  $v_d^{N_e=3} = 0.07 \pm 1 \mu\text{m/s}$  et  $v_d^{N_e=4} = 0.04 \pm 1 \mu\text{m/s}$ .

### 3.5.3 Discussion

La chaîne d'endosomes magnétiques n'est pas un objet naturellement présent dans le cytoplasme. Cependant elle est un outil très pratique pour étudier le trafic intracellulaire et notamment l'impact d'une perturbation mécanique sur ce phénomène biologique naturel. En comparant le trafic intracellulaire d'un endosome unique à celui d'une chaîne d'endosomes, nous avons constaté que leur comportement extrait des MSD est similaire quelle que soit la valeur de  $N_e$ . Seul un petit effet apparaît ( $p < 0.01$ , \*) sur l'exposant, qui diminue lorsque  $N_e$  augmente. Cela implique qu'il n'y a pas de différences significatives qu'on utilise un endosome unique ou une chaîne d'endosomes pour quantifier le trafic intracellulaire.

Nous avons analysé les phases de mouvement dirigé pour en extraire le nombre d'événements de mouvement dirigé par sonde pendant la durée d'acquisition des trajectoires (200s) ainsi que la vitesse moyenne de déplacement. Le nombre d'événements de mouvement dirigé ne semble pas dépendre de  $N_e$ . Par contre, les résultats pour les vitesses sont surprenantes, car il semblerait que les vitesses pour  $N_e$  impair soient 2 fois plus élevées que pour  $N_e$  pair.

Pour comprendre ces résultats, plusieurs éléments "contradictoires" sont à prendre en compte :

- plus le nombre d'endosome est grand, plus le nombre total de moteurs disponibles pour mettre en mouvement la chaîne est grand,
- plus  $N_e$  est grand plus la friction de l'objet en mouvement est grande.

Les moteurs moléculaires dont sont équipés chaque endosome peuvent coopérer entre eux [8]. Cependant au sein d'une chaîne, la cohésion entre les endosomes est uniquement due aux interactions magnétiques entre les endosomes en présence d'un champ (lorsqu'on coupe le champ, les endosomes se séparent, les moteurs moléculaires de chaque endosome ne déplaçant pas forcément les endosomes dans les mêmes directions). Il n'y a donc a priori pas raison pour que les moteurs des différents endosomes constituant une chaîne travaillent "ensemble".

Voici une interprétation possible compte tenu des hypothèses suivantes :

- on suppose que chaque endosome possède le même nombre de moteurs,
- les moteurs sont corrélés à l'échelle d'un endosome mais pas à l'échelle de toute la chaîne,
- un endosome suffit à atteindre une vitesse de saturation (si les moteurs de deux endosomes veulent faire avancer la chaîne dans le même sens, la vitesse n'est pas 2 fois la vitesse d'un endosome mais correspond à la vitesse de saturation  $V$ )
- un endosome à une probabilité équirépartie d'aller dans un sens ou dans l'autre
- lorsque les moteurs de deux endosomes veulent aller dans des directions opposées, il en résulte un déplacement moins rapide dans l'une ou l'autre des directions.

Les configurations possibles de déplacement sont données figure 3.25.

Lorsque le nombre d'endosomes constituant la sonde est pair, la symétrie de la sonde donnerait naissance à des mouvements à vitesse réduite ( $v$ ). Ce qui n'est pas le cas de sonde à nombre d'endosomes impair. Dans ce cas, la symétrie est brisée et les mouvements actifs sont tous à la vitesse moyenne  $V$ . Bien que cette interprétation soit très spéculative, elle peut expliquer le fait que la vitesse soit plus élevée dans le cas où  $N_e$  est impair  $N_e = 1$  ou 3, avec une valeur maximale pour  $N_e = 1$ .

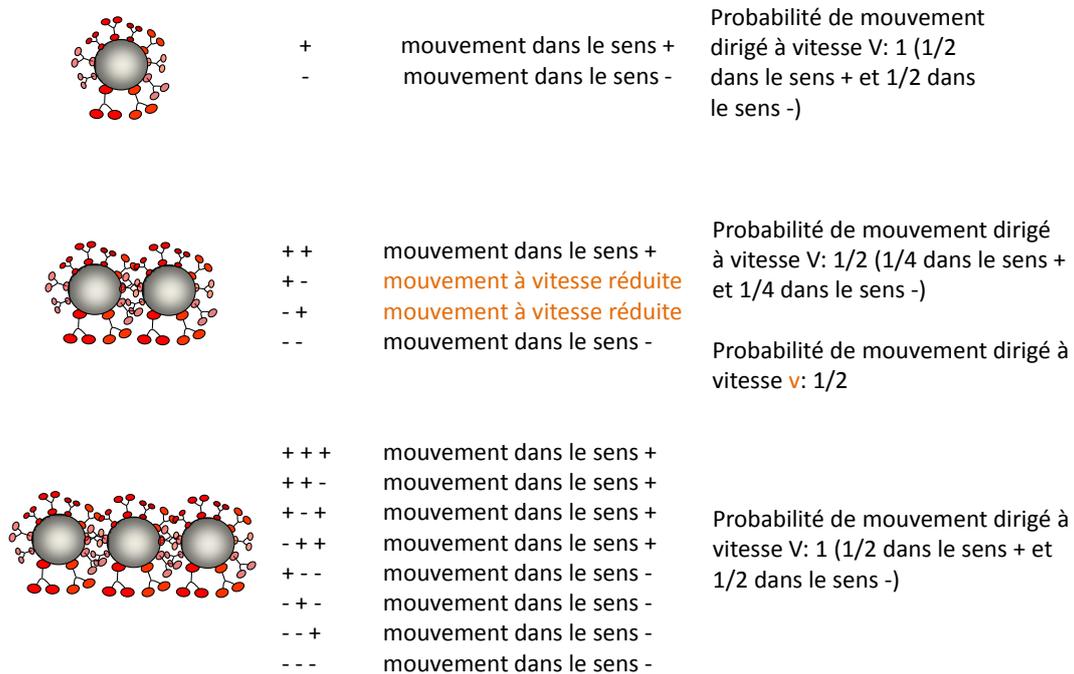


FIGURE 3.25 – Configurations possibles de vitesses de déplacement en fonction du nombre d'endosomes. Lorsque le nombre d'endosomes est impair, les mouvements sont tous à vitesse  $V$ . Lorsque le nombre d'endosomes est pair, une partie des déplacements se font à vitesse  $v$ , réduisant ainsi la vitesse moyenne.

### 3.6 Discussion générale

Pour étudier l'impact d'une perturbation mécanique sur le trafic intracellulaire, nous avons mis en place différents systèmes, auxquels nous avons appliqué une perturbation mécanique en mettant en rotation des chaînes d'endosomes magnétiques.

Dans un premier temps, nous avons comparé le trafic intracellulaire de chaînes d'endosomes magnétiques avant et après une perturbation mécanique appliquée par ces mêmes chaînes sous forme de rotation. Le MSD avant la rotation nous montre un comportement super-diffusif, ce qui témoigne de l'activité des moteurs moléculaires. Cependant celle-ci n'est pas complètement conservée après plusieurs rotations successives (0.01 Hz, 0.1 Hz et 1 Hz), car les sondes ont un comportement quasi-diffusif après ces rotations (figure 3.26). La rotation des chaînes diminue le trafic intracellulaire de ces mêmes chaînes de façon significative.

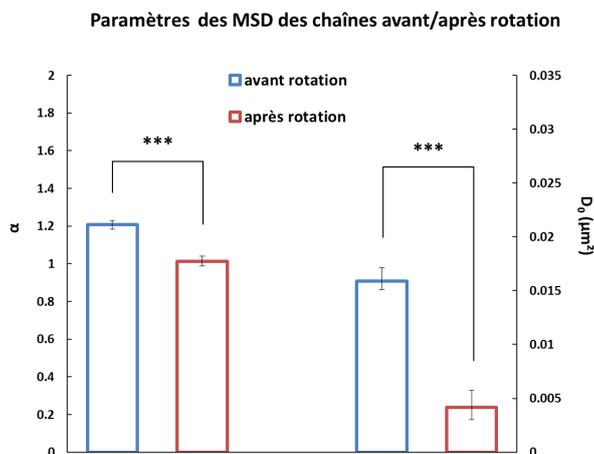


FIGURE 3.26 – Comparaison statistique des amplitudes et exposants des MSD des chaînes avant et après leur rotation. Les exposants ainsi que les amplitudes sont significativement différents avant et après la perturbation.

A partir des trajectoires des chaînes obtenues avant et après leur rotation, nous avons fait des analyses plus profondes en identifiant les portions de trajectoire correspondant à des mouvements dirigés. A partir de ces intervalles dirigés, nous avons pu déterminer la durée des phases dirigées, la proportion de phases dirigées (par rapport à la durée totale de la trajectoire), la distance parcourue pendant les phases dirigées, ainsi que la vitesse moyenne de déplacement durant les phases dirigées.

Nous avons constaté que la proportion de phases dirigées (ainsi que le nombre d'événements de mouvements dirigés) étaient diminuées d'un facteur 1.5 après la rotation, sans que la durée des phases dirigées ne soit modifiée de façon significative. Indépendamment du nombre d'événements, la distance parcourue ainsi que la vitesse moyenne de déplacement lors des phases dirigées sont diminuées d'au moins un facteur 2 et ce de manière significative (figure 3.27). Il semble donc que non seulement, la probabilité d'observer un mouvement dirigé diminue après la rotation des chaînes mais aussi que lorsqu'un événement se produit, la processivité ainsi que la vitesse des moteurs est diminuée.

Seulement, à ce stade, nous ne savions pas si l'effet observé était dû à une modification de l'acti-

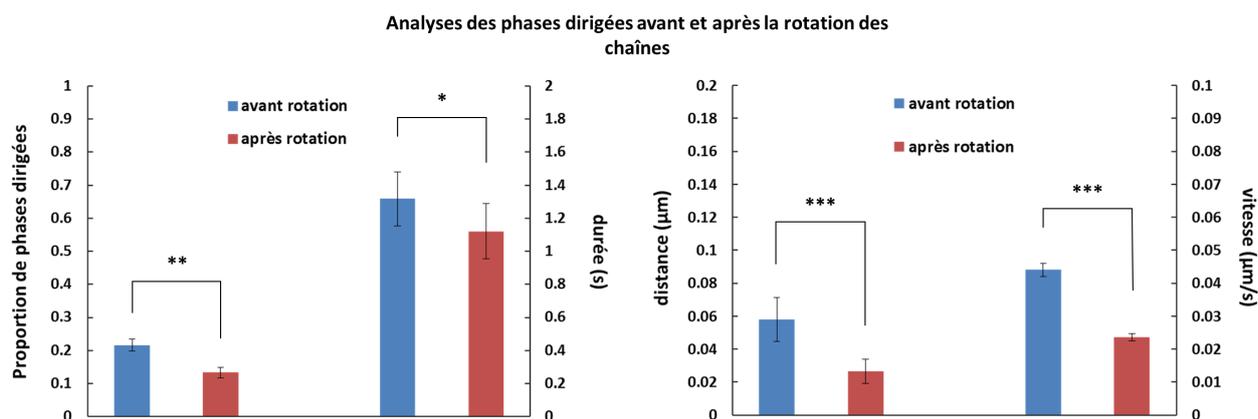


FIGURE 3.27 – Analyses statistiques des grandeurs physiques extraites des phases de mouvement dirigé des chaînes d’endosomes : proportion de phases dirigées ( $\tau_d$ ), durée des phases dirigées ( $t_d$ ), distance parcourue ( $D_d$ ) et vitesse moyenne pendant les phases dirigées ( $v_d$ ). La durée de phases dirigées est quasiment inchangée après la rotation. La proportion de phases dirigées diminue après la rotation. La distance parcourue ainsi que la vitesse moyenne diminue significativement après la rotation.

vités des moteurs ou, de façon plus indirecte, à une modification de la structure et/ou des propriétés visco-élastiques de l’environnement local dans lequel se trouvent les chaînes.

C’est pourquoi dans un deuxième temps, nous avons réalisé des mesures actives, par l’application de couples magnétiques sur des chaînes d’endosomes magnétiques. De la relation contrainte-déformation qui relie la position angulaire de la chaîne et le couple magnétique appliqué, nous avons extrait la fonction dite de fluage. La fonction de fluage est une grandeur physique qui rend compte des propriétés viscoélastiques. Dans notre cas, elle peut être ajustée à l’aide d’une loi puissance dont l’exposant pour un fluide viscoélastique est généralement compris entre 0 (cas purement élastique) et 1 (cas d’un liquide purement visqueux). Nous avons mesuré la dynamique de relaxation de la position angulaire des chaînes d’endosomes magnétiques lorsque la position du champ magnétique était modifiée instantanément d’un angle d’environ  $45^\circ$ , et ce avant et après 3 rotations successives (0.01 Hz, 0.1 Hz et 1 Hz), afin de comparer les propriétés viscoélastiques du cytoplasme avant et après la perturbation mécanique. Les données ont été analysées en termes de fonction de fluage, dont les moyennes globales avant et après la perturbation montrent effectivement un comportement viscoélastique ( $0 < \gamma < 1$ ).

La comparaison des moyennes globales des fonctions de fluage avant et après la rotation des chaînes, ne mettent en évidence qu’une légère diminution de l’exposant ( $\gamma^{\text{avant}} = 0.55$ ,  $\gamma^{\text{après}} = 0.42$ ), l’amplitude étant conservée (figure 3.28). Ce qui signifie que contrairement à ce que l’on pourrait penser, le cytoplasme n’est pas fluidifié par le cisaillement mécanique.

Dans un troisième temps, pour savoir si les rotations des chaînes ont pu modifier localement l’organisation du cytoplasme sans en changer radicalement les propriétés mécaniques, nous avons mis au point un système nous permettant de mesurer l’impact d’un cisaillement mécanique, créé par la rotation de chaînes d’endosomes magnétiques sur le trafic intracellulaire d’objets ponctuels non-magnétiques et donc non soumis à la rotation. Les expériences réalisées avec ce système, nous ont montré que le trafic intracellulaire des endosomes ponctuels après cisaillement du cytoplasme

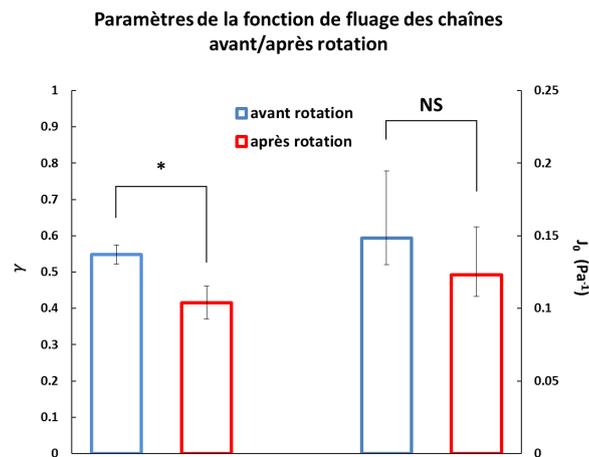


FIGURE 3.28 – Comparaison statistique des amplitudes et exposants des fonctions de fluages avant et après la rotation des chaînes. Les exposants montrent une légère diminution après la rotation. Les amplitudes ne sont pas significativement différentes avant et après la perturbation.

n'était pas modifié (la différence des listes de données avant et après le cisaillement ne donne pas de différence significative (NS)) (figure 3.29).

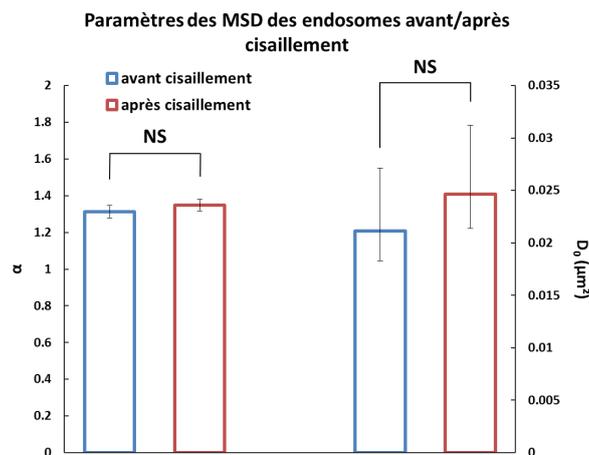


FIGURE 3.29 – Comparaison statistique des amplitudes et des exposants des MSD des endosomes avant et après le cisaillement. Les exposants ainsi que les amplitudes ne sont pas significativement différents avant et après la perturbation.

Même en analysant plus en profondeur les trajectoires des endosomes avant et après, la durée et la proportions des phases dirigées ainsi que la distance parcourue et la vitesse moyenne pendant les phases dirigées, ne sont pas affectés par le cisaillement (figure 3.30).

Nous n'avons donc pas retrouvé le même effet qui avait été obtenu lors d'une perturbation mécanique sur une chaîne d'endosomes.

Soumettre une chaîne d'endosomes à une rotation ne perturbe pas l'organisation du cytoplasme (ni mécaniquement, ni structurellement). En revanche, cette rotation inactive (décrochage ou dom-

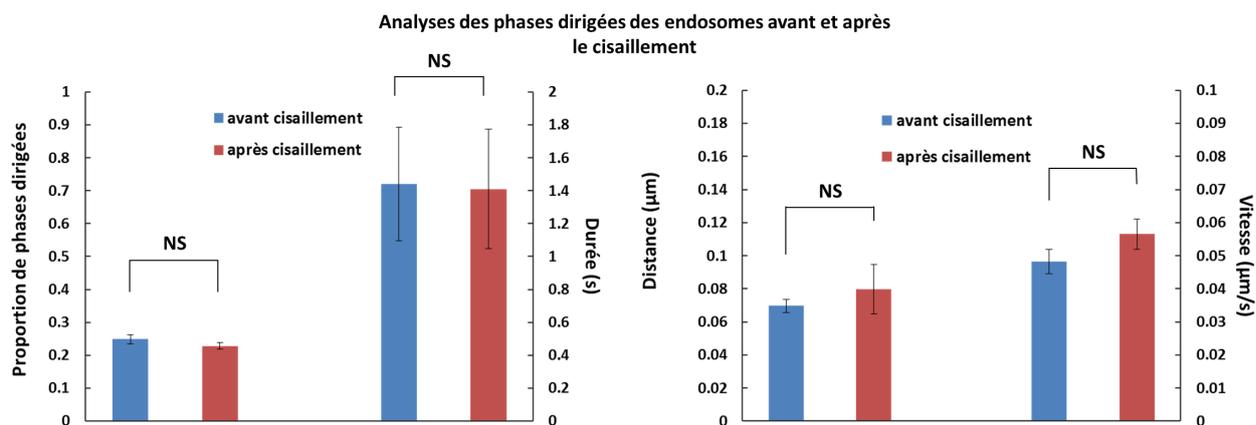


FIGURE 3.30 – Analyses statistiques des grandeurs physiques extraites des phases de mouvement dirigé des endosomes uniques : proportion de phases dirigées, durée des phases dirigées, distance parcourue et vitesse moyenne pendant les phases dirigées. Aucune des grandeurs mesurées n'est significativement différente après la perturbation.

mage irréversible) d'une partie des moteurs de la chaîne, ce qui modifie le trafic intracellulaire. En effet, si le nombre de moteurs actifs après cisaillement est diminué, cela affecte le trafic intracellulaire de deux manières différentes : d'une part la probabilité d'observer un mouvement dirigé est diminué, car la probabilité pour les moteurs de s'accrocher à un microtubule est moindre et d'autre part si l'accrochage a lieu il y a de fortes chances pour que le mouvement soit moins processif, le nombre de moteurs disponibles pour coopérer étant plus faible.

La chaîne d'endosomes magnétiques est un outil très pratique et c'est une sonde intracellulaire qui est obtenue facilement. Cependant elle n'est pas un objet naturel. Bien que nous ayons observé que ces sondes participent au trafic intracellulaire, nous avons voulu vérifier qu'elles avaient un comportement similaire à celui d'endosomes uniques. Nous avons comparé le déplacement quadratique moyen d'endosomes uniques (naturels) avec celui obtenu à partir du suivi de chaînes composées de 2 à 4 endosomes. L'analyse des courbes de MSD en fonction du nombre d'endosomes constituant la sonde ( $N_e$ ), nous apprend que quel que soit  $N_e$ , les sondes ont un comportement globalement similaire (figure 3.23). Des analyses plus détaillées des portions de phase dirigée de trajectoires, nous ont appris que le nombre d'événements de mouvement dirigé ne dépend pas du nombre d'endosomes constituant la sonde. Mais on ne peut pas en dire autant de la vitesse moyenne de déplacement lors des phases dirigées qui est maximale pour  $N_e = 1$  semble être accrue lorsque le nombre d'endosomes est impaire (figure 3.24).

### 3.7 Conclusion et perspectives

Les mesures passives sur les chaînes d'endosomes magnétiques, nous apprennent que le trafic intracellulaire d'une chaîne est perturbé lorsqu'on la soumet à une rotation de quelques minutes. Cependant les moteurs moléculaires dont sont équipés les endosomes constituant la chaîne ne sont pas complètement inactivés, la rotation n'a pas pour effet de décrocher ou d'inactiver tous les moteurs moléculaires. Certaines chaînes ont un mouvement sous-diffusif après la rotation, mais certaines sont encore capables d'effectuer des mouvements dirigés mais de façon moins processive.

La cause de cet effet ne semble pas être due à une modification des propriétés mécaniques du cytoplasme, car les mesures actives ne montrent pas de différences significative entre avant et après la rotation des chaînes.

Cet effet n'est pas non plus dû à une réorganisation locale du cytoplasme car les mouvements d'une sonde ponctuelle non soumise à la rotation mais se trouvant dans un environnement ayant été perturbé, de la même façon que celui dans lequel se trouvent les chaînes, ne sont pas modifiés par la perturbation de façon significative.

Lorsqu'on confronte les résultats obtenus lors de l'étude d'une perturbation sur le trafic intracellulaire d'une chaîne avec ceux obtenus lors de mesures actives ou ceux obtenus lors de l'étude du trafic intracellulaire d'endosomes uniques, cela nous apprend que si le trafic intracellulaire d'une chaînes d'endosomes est modifié par sa propre rotation, ce n'est ni parce que la rotation de la chaîne modifie localement les propriétés mécaniques du cytoplasme, ni parce que l'environnement au voisinage des chaînes est modifié, mais parce qu'on modifie directement l'activité des moteurs moléculaires. On peut supposer que la rotation des chaînes, inactive une partie des moteurs moléculaires dont sont équipés les endosomes constituant la chaîne. Notre interprétation est que cette inactivation conduit d'une part à une diminution de la probabilité d'observer un événement de mouvement dirigé et d'autre part à une diminution de la distance parcourue ainsi que de la vitesse moyenne de déplacement, étant donné qu'un nombre plus faible de moteurs sont disponibles pour travailler ensemble.

L'analyse des trajectoires (200s) par intervalles de 50s des chaînes après la perturbation, nous indique qu'aucune récupération n'est effective dans les 200s qui suivent la perturbation. Il serait intéressant de regarder si le système récupère à des temps plus longs, par exemple 30 min après la perturbation.

Les cellules utilisées sont des cellules souches mésenchymateuses humaines, qui peuvent évoluer en adipocytes, chondrocytes ou en ostéoblastes, grâce à des facteurs de différenciations. Nous avons vu que la perturbation appliquée aux cellules n'a pas modifié les propriétés viscoélastiques du cytoplasme. Cependant il serait intéressant de voir dans quelle mesure ces propriétés mécaniques évoluent au cours de la différenciation de ces cellules en différents adipocytes ou en ostéoblastes, qui sont les cellules typiques de tissus aux propriétés mécaniques très différentes.

Chapitre **4**

# Perturbation photochimique

## Sommaire

---

<b>4.1</b>	<b>Introduction</b>	<b>80</b>
<b>4.2</b>	<b>Résultats et analyses publiés dans PlosOne : Impact of Photosensitizers Activation on Intracellular Trafficking and Viscosity</b>	<b>81</b>
<b>4.3</b>	<b>Discussion</b>	<b>95</b>
<b>4.4</b>	<b>Conclusion et perspectives</b>	<b>97</b>

---

## 4.1 Introduction

La photosensibilisation consiste à exciter une molécule photosensible par une énergie lumineuse. Une partie de l'énergie absorbée lors de l'excitation va être réémise sous forme de photons, permettant une visualisation des molécules photosensibles. Une autre partie de l'énergie absorbée lors de l'activation du photosensibilisateur va être utilisée pour réaliser des réactions chimiques qui auront comme produits des radicaux libres sous forme d'oxygènes singulets. Ce sont des espèces hautement réactives, qui dans le milieu intracellulaire vont engendrer une cascade de réactions biochimiques. Généralement ils sont cytotoxiques et peuvent créer des dommages irréversibles aux cellules ou avoir un effet plus contrasté et affecter localement une partie de la cellule, sans remettre en cause la viabilité cellulaire. Les cibles principales des radicaux libres sont les membranes, les mitochondries, le réticulum endoplasmique et le cytosquelette.

La localisation intracellulaire du photosensibilisateur dépend de ses propriétés chimiques et en particulier de son hydrophobicité, de sa charge et de son caractère amphiphile. L'impact sur la cellule dépend ensuite de la localisation intracellulaire, les radicaux libres créés lors de la photo-activation étant libérés au voisinage de la molécule photosensible avec une durée de vie limitée. Pour étudier l'impact de la photosensibilisation sur le trafic intracellulaire, nous avons choisi deux photosensibilisateurs, dont les propriétés d'hydrophobicité entraînent une localisation intracellulaire différente et de ce fait différentes applications sur le plan biomédical : le m-THPC ou le TPCS<sub>2a</sub>.

Le m-THPC est une molécule hydrophobe, qui dans la cellule va se combiner aux protéines intracellulaires. Il est distribué de façon homogène dans le cytoplasme, sans entrer dans le noyau. La localisation de cette molécule en fait un bon candidat pour les thérapies anticancéreuses, car sa photo-activation va engendrer des dommages à plusieurs endroits de la cellule [76, 77]. Cet effet est utilisé en thérapie photodynamique (PDT pour "photodynamic therapy"), une thérapie anticancéreuse, utilisée en clinique depuis les années 90 (le m-THPC est alors connu sous le nom de FOSCAN) [78]. Elle consiste à injecter le FOSCAN par voie intraveineuse. Les cellules cancéreuses vont (comme les autres) se charger progressivement en photosensibilisateur. Puis une excitation sélective, au niveau de la tumeur, va induire une mort cellulaire [79]. Les principales cibles intracellulaires du m-THPC sont le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi [80, 67], ainsi que les mitochondries [77]. La PDT peut être combinée avec une chimiothérapie classique, par exemple par doxorubicine pour augmenter l'efficacité du traitement [81].

Le TPCS<sub>2a</sub> est une molécule moins hydrophobe que le m-THPC et possède des charges, qui lui imposent une localisation intracellulaire au niveau des vésicules d'endocytose (endosomes, lysosomes). La première cible des radicaux libres produits lors de la photo-activation va donc être la membrane de ces vésicules. C'est cet effet qui est exploité lors de la thérapie ciblée photo-assistée, encore appelée PCI (pour "photochemical internalization"). Des macromolécules thérapeutiques sont co-intériorisées avec l'agent photosensible. La photo-activation induit une perméabilisation de la membrane des vésicules contenant également ces macromolécules, qui sont alors libérées au cœur de la cellule. La PCI peut être utilisée en thérapie anticancéreuse, par exemple en co-intériorisant du TPCS<sub>2a</sub> avec de la bléomycine, qui une fois libre dans la cellule va induire la rupture du brin d'ADN, inhibant ainsi les processus de transcription et réplication [68].

De nombreuses études *in vivo* ont été menées, afin de déterminer l'efficacité des traitements photothérapeutiques [67]. A l'échelle de la cellule unique, les chercheurs ont étudié la capacité des agents photosensibles à pénétrer dans les cellules et ont également déterminé leur localisation intracellulaire en fonction des propriétés chimiques (hydrophobicité, charges, amphiphilicité) [82, 80]. Ils ont également cherché à établir quelles étaient les cibles majoritaires des radicaux libres délivrés par

la photo-activation de différents types de photosensibilisateurs ainsi que leur cytotoxicité [67, 78].

Le trafic vésiculaire est un phénomène naturel essentiel pour la cellule et joue un rôle dans le transport de macromolécules dans le cytoplasme ainsi que dans le renouvellement des constituants des différentes membranes. Pourtant, peu d'études se sont intéressées à l'impact de la photo-activation sur les acteurs du trafic intracellulaire (microtubules, moteurs moléculaires). Quelques études qualitatives ont mis en évidence que la structure des microtubules pouvait être affectée par la photothérapie [83, 84, 85] et ainsi impacter le trafic vésiculaire [86].

Ici, nous avons étudié de manière quantitative comment le trafic intracellulaire était impacté par la photo-activation des photosensibilisateurs (m-THPC et TPCS<sub>2a</sub>), par des analyses de déplacement quadratique moyen. Finalement, les propriétés mécaniques du milieu intracellulaire sont importantes pour l'efficacité de la photothérapie puisque les radicaux libres produits par la photo-activation ont une durée de vie limitée et se déplacent dans le milieu cellulaire par diffusion libre, avec un rayon d'efficacité de l'ordre de la dizaine de nm [80]. Nous avons donc également mis en place des mesures de viscosité effective pour mesurer l'évolution de la composante mécanique dissipative suite à l'activation des deux types de photosensibilisateurs.

La PDT est utilisée pour de nombreux types de cancers et peut être utilisée pour des cancers de la prostate. C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser pour cette étude des cellules de cancer prostatique humain (PC3).

## 4.2 Résultats et analyses publiés dans PlosOne : Impact of Photosensitizers Activation on Intracellular Trafficking and Viscosity

Nous insérons ici le manuscrit qui a fait l'objet d'une publication dans PlosOne.

# Impact of Photosensitizers Activation on Intracellular Trafficking and Viscosity

Kelly Aubertin<sup>1</sup>, Stéphanie Bonneau<sup>2</sup>, Amanda K. A. Silva<sup>1</sup>, Jean-Claude Bacri<sup>1</sup>, François Gallet<sup>1</sup>, Claire Wilhelm<sup>1\*</sup>

**1** Laboratoire Matière et Systèmes Complexes (MSC), CNRS and Université Paris Diderot, Paris, France, **2** Laboratoire Jean Perrin-CNRS, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6, Paris, France

## Abstract

The intracellular microenvironment is essential for the efficiency of photo-induced therapies, as short-lived reactive oxygen species generated must diffuse through their intracellular surrounding medium to reach their cellular target. Here, by combining measurements of local cytoplasmic dissipation and active trafficking, we found that photosensitizers activation induced small changes in surrounding viscosity but a massive decrease in diffusion. These effects are the signature of a return to thermodynamic equilibrium of the system after photo-activation and correlated with depolymerization of the microtubule network, as shown in a reconstituted system. These mechanical measurements were performed with two intracellular photosensitizing chlorins having similar quantum yield of singlet oxygen production but different intracellular localizations (cytoplasmic for mTHPC, endosomal for TPCS2a). These two agents demonstrated different intracellular impact.

**Citation:** Aubertin K, Bonneau S, Silva AKA, Bacri J-C, Gallet F, et al. (2013) Impact of Photosensitizers Activation on Intracellular Trafficking and Viscosity. PLoS ONE 8(12): e84850. doi:10.1371/journal.pone.0084850

**Editor:** Nikolai Lebedev, US Naval Research Laboratory, United States of America

**Received:** August 9, 2013; **Accepted:** November 19, 2013; **Published:** December 27, 2013

**Copyright:** © 2013 Aubertin et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by the European commission's FP7 (project Magnifyco NMP4-SL-2009-228622). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: [claire.wilhelm@univ-paris-diderot.fr](mailto:claire.wilhelm@univ-paris-diderot.fr)

## Introduction

Photodynamic therapy uses photo-activated organic molecules (porphyrins, chlorins, phthalocyanins, etc.) with very special photo-physical properties. Owing to their triplet state, irradiation of these photosensitizers generates reactive species such as singlet oxygen [1]. The lifetime of these molecular species is very short [2,3] and their action is highly localized [4–6].

The ability of photosensitizers to target a specific cellular compartment explains their potential to modify and control cellular physiology. For example, photochemical internalization (PCI) using the photoactivation of photosensitizers that localize in endosomes, induces endosomal membrane changes, enabling release into the cytosol of an active substance stored in the endosomal compartment [7,8]. More marked changes occur if the photosensitizer is localized in the cytoplasm - particularly affecting mitochondria, endoplasmic reticulum or functional organelles - and potentially leading to cell death by necrosis or apoptosis [9,10]. This approach, called photodynamic therapy (PDT), is already used in the clinic for cancer treatment [11].

While the cellular effects of photosensitizers (cytotoxicity, membrane permeabilization, ...) have been extensively

explored [12,13], their impact on intracellular mechanics and trafficking are much less documented [14,15]. In particular, as the cytotoxic effect is based on the production of very short-lived reactive oxygen species, it is important to know the mechanical properties of the medium through which these species must diffuse in order to reach their target. A first approach to this issue was recently developed using a photosensitive molecule coupled to a molecular rotor whose orientation could be optically determined, allowing the diffusion properties of the molecule to be followed [15].

However, the relationship between diffusion and dissipation is not direct, especially in a living system [16–19]. For a Newtonian fluid at thermodynamic equilibrium, the diffusion coefficient is directly related to the viscosity, through the Stokes-Einstein relationship. This particular expression of the Fluctuation-Dissipation Theorem (FDT) can be generalized to any non-newtonian fluid, provided that it remains at thermodynamical equilibrium. However, in the intracellular medium, molecular motors regularly consume ATP, converting chemical energy into the mechanical work needed to sort and transport each cargo to its final destination [20–23]. The intracellular space is thus, by its nature, a system far from thermal equilibrium, thus challenging the validity of the fluctuation-dissipation theorem in this situation. The ratio of the

chemical energy input over thermal fluctuations energy, can then be measured, as described for aging complex systems [24] as well as for the cell interior [17]. This ratio can reach 1000, implying diffusion coefficients 1000 times greater than those deduced from viscosity measurements, using FDT.

To access this ratio or, more simply, to measure dissipative and diffusive properties independently, one must be able, at the same time and in the same system, to make a passive measurement ("fluctuation") as well as an active measurement ("dissipation"). This is the approach we used here, taking advantage of magnetic micromanipulation techniques developed in recent years to measure local viscoelasticity [25], while at the same time following the transport modalities of intracellular vesicles.

Two types of chlorins, m-THPC (hydrophobic) and TPCS2a (more hydrophilic), were chosen as photosensitizers, as their different hydrophobicities affect their intracellular localization [26–28]. Endosomes containing magnetic nanoparticles were used as both probes of the trafficking and magnetic probes for the local viscosity within irradiated cells.

Combined measurement of rheological properties and active transport, according to the photosensitizer localization and the duration of the treatment and post-treatment steps, should provide information on the intracellular mechanisms of action of photodynamic stress, a largely unexplored area.

## Results

### Simultaneous internalization of photosensitizers and magnetic nanoparticles by tumor cells

Incubation of cells with magnetic nanoparticles and photosensitizers led to internalization of both components (Figure 1A). Each cell contained an average of  $10^7$  nanoparticles, equivalent to 10 pg of iron. The nanoparticles penetrate through the endocytic pathway and cluster within endosomes, as previously demonstrated [29–31].

Then, if a homogeneous magnetic field is applied, each endosome acquires a magnetic moment which aligns with its neighbors under the effect of magnetic dipole forces. This creates small intracellular chains that can be manipulated via the external magnetic field. The two photosensitizers are also internalized, at dose equivalent of 0.2 fmoles per cell on average. However, m-THPC spreads in the cytoplasmic compartment, while TPCS2a is found in the endosomal compartments.

After irradiation (deposited energy between 1.5 and 30 J/cm<sup>2</sup>), the cells' metabolic activity was not reduced during the first two hours (Figure 1B). In contrast, a strong decrease in cell viability was detected 24 hours after exposure.

We thus obtained magnetic sensors inside cells containing photosensitizers with different intracellular targets, within a range of concentrations at which treatment is cytotoxic at long times.

### Probing intracellular trafficking with magnetic endosomes : Diffusion measurements

We first aimed at exploring the impact of photodynamic stress on intracellular trafficking. Endosomes loaded with

magnetic nanoparticles are easily detectable by optical microscopy. It is possible to track their position ( $x,y$ ) in a time-resolved manner (image capture every 100 ms for 100 s). In figure 2, left images show a few example of endosome trajectories (color lines) superimposed to cells before photo-activation. After photo-activation, one can see a dramatic decrease in trafficking (strong shortening of all track lengths).

To quantify such an effect, the mean square displacement  $\langle \Delta r^2(t) \rangle$  was calculated for each trajectory (see Methods, equation 4).

Figure 3A shows the  $\langle \Delta r^2(t) \rangle$  for different treatment conditions : control cells and microtubule disrupted cells, m-THPC treatment, TPCS2a treatment, both at various exposure times. In all cases  $\langle \Delta r^2(t) \rangle$  obeys a power law with time:

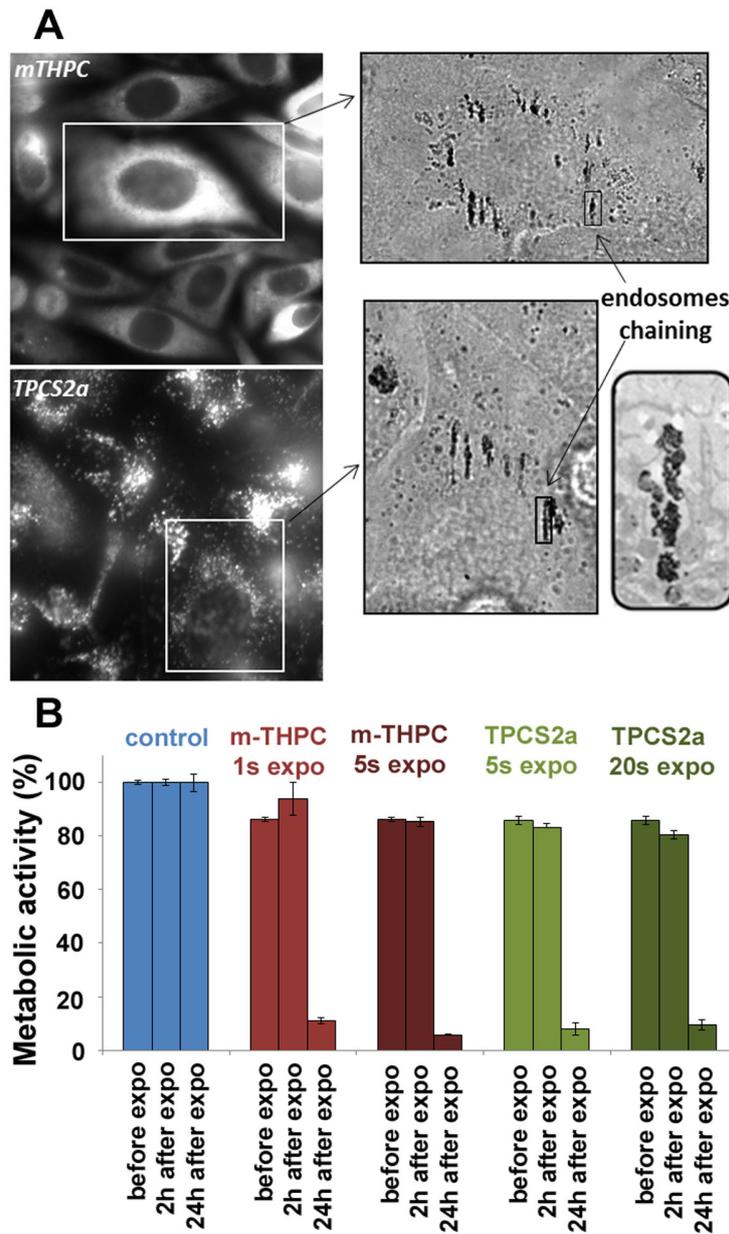
$$\langle \Delta r^2(t) \rangle = 2D_{1s}t^\alpha \quad (1)$$

$\alpha$  characterizes the type of movement (confined  $\alpha < 1$ , diffusive  $\alpha = 1$ , directed  $\alpha > 1$ ; more details are given in the Methods section);  $D_{1s}$  reflects the amplitude of motion at the characteristic time  $t = 1$ s. Figure 3B summarizes all mean  $D_{1s}$  values extracted from the mean square displacements data presented in Figure 3A, and includes all complementary controls.  $D_{1s}$  fell when the microtubules were depolymerized and when the photosensitizers were irradiated, the fall being proportional to the dose of irradiation, and demonstrating a reduction of intracellular motions. The value of the exponent  $\alpha$  (extracted from the fitting of the curves shown in Figure 3A) provides information related to the mode of the observed motions. In untreated cells, exponent  $\alpha \approx 1.3$  is a signature of a super-diffusive motion related to active transport of the endosomes along the microtubule network by its associated molecular motors [16,32–34]. Indeed, the same cells treated with nocodazole, a microtubule depolymerizing agent, exhibit an average exponent of 0.8, indicating confined movement. The same effect was observed after irradiation, increasing with the amount of light energy deposited. With m-THPC, irradiation for 1 s or 5 s reduced the exponent to 1.0 or 0.6, respectively, while with TPCS2a irradiation for 1s, 5 s or 20 s reduced the exponent to 1.2, 1.1 or 0.7, respectively.

At this stage of our understanding, the drop in endosomes trafficking after irradiation could be due either to an inhibition of the motor-mediated out-of-equilibrium endosomes motions, or to a stiffening of the mechanical environment, causing an increase of the local viscosity, as previously reported [15]. In this latter case, the viscosity  $\eta$ , should rise by the same factor as the recorded drop in displacements (that is up to a hundred-fold), as further discussed in the Discussion section. The next step therefore requires performing dissipative measurements of the endosomes surrounding viscosity to validate one or the other hypothesis.

### Probing the intracellular viscosity with magnetic manipulation

Such a measurement of the viscosity requires an externally applied stress on an internal probe. The idea here is to exploit the magnetic properties of the labeled endosomes to make them align in chains and impose the chain rotation by an

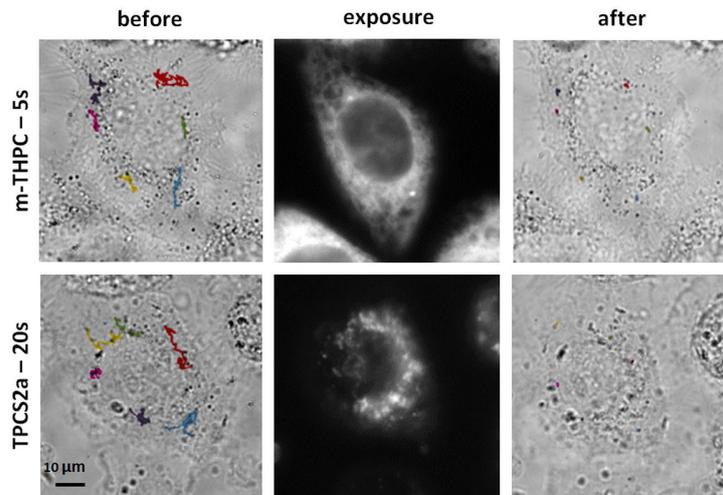


**Figure 1. Intracellular localization of the photosensitizers and the magnetic nanoparticles and metabolic activity.** (A) Co-internalization, in PC3 tumor cells, of photosensitizer molecules (mTHPC and TPCS2a) and magnetic nanoparticles. mTHPC localizes in the cytoplasm while TPCS2a is found in vesicular structures. The magnetic nanoparticles are concentrated in late endosomes and lysosomes, and align in the direction of the applied magnetic field, as shown by electron microscopy (inset). (B) Metabolic activity was not modified 2 hours after exposure, regardless of the conditions. The subsequent steps therefore involved viable cells. However, a noteworthy cytotoxic effect was detected the following day, with more than a 80% fall in cellular activity. The error bars represent the standard error of the mean (SEM).

doi: 10.1371/journal.pone.0084850.g001

external magnetic rotating field: the lag in time for the endosomal chains to align with the rotated field is a measurement of viscosity. The technical difficulty however is to produce a rotating magnetic field strong enough to align

magnetic endosomes, and deliver a sufficient magnetic torque to permanently rotate these chains. To do so, we designed a miniaturized magnetic device (Figure 4), consisting of a set of 4 home-made small coils magnetizing 4 soft iron engineered



**Figure 2. Monitoring of intracellular trafficking.** The dark compartments (endosomes filled with magnetic nanoparticles) were followed for 100 s and their trajectories (before and after exposure) were superimposed on the image of the cell obtained at the outset of the monitoring phase. Movements were clearly inhibited by the action of the photosensitizer (mTHPC and TPCS2a, 5 s and 20 s of exposure, respectively).

doi: 10.1371/journal.pone.0084850.g002

pieces separated by only 0.6 mm. All details and pictures are presented in the Methods section “magnetic device”. Thanks to the small spacing, the magnetic field created in the center can be tuned between 0 to 70 mT and its direction can be adjusted within the cell sample plane, by tuning the current supplying each coil. In particular, if the two pairs of coils are supplied with an alternating current 90° out of phase, the produced magnetic field rotates in the cells plane. Chains of endosomes then undergo a magnetic torque (defined in the Methods) which forces them to rotate along with the field (if the latter is strong enough), with an angular delay  $\varphi$  (between the direction of the chain and the magnetic field, examples given in Figure 5A). This delay is due to the opposition to rotation of the surrounding medium (creating a viscous restoring torque proportional to the viscosity  $\eta$ , details also given in the Methods). The measure of  $\varphi$  thus provides direct access to the viscosity  $\eta$  according to

$$\eta = \frac{\mu_0 m^2 \sin(2\varphi)}{32\pi\kappa F} \quad (2)$$

where  $\mu_0 = 4\pi \cdot 10^{-7} \text{ kg m A}^{-2} \text{ s}^{-2}$ ,  $m$  is the endosomes magnetic moment at the applied field,  $F$  the frequency of the field, and  $\kappa$  a previously calibrated geometric factor ( $\kappa = 6.7, 14.9$  and  $24.7$  for chains containing 2, 3 and 4 endosomes, respectively [35,36]).

To retrieve quantitative viscosity values, we also needed an independent measurement of the magnetic moment of each endosomes. To do so, we extracted them from the cell and injected them into a magnetophoresis chamber subjected to a calibrated magnetic gradient (280 T/m). Each endosome migrated with an average speed of about 30  $\mu\text{m/s}$ , which corresponds to a magnetic moment for an applied field of 50 mT (the one selected for the experiments) of  $m = (1.8 \pm 0.2) \cdot 10^{-16} \text{ A m}^2$ .

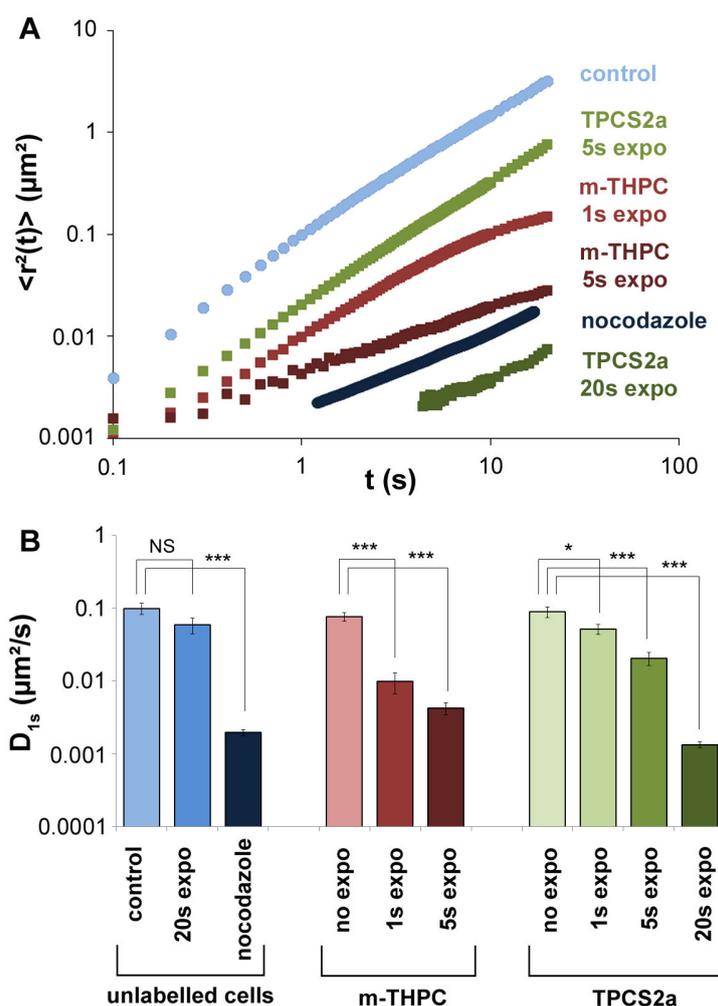
Before photoactivation, the mean value of the viscosity retrieved was  $0.25 \pm 0.03 \text{ Pa}\cdot\text{s}$ . The error corresponds to the standard error of the mean (SEM), averaged over more than 25 independent measurements. One must note however that the standard deviation is large (in order 45%), due to the variability of the viscosity within the cytoplasm.

Neither the presence of a photosensitizer without irradiation, nor cell irradiation without a photosensitizer, affected this value. After cell exposition to the photosensitizer and irradiation, the intracellular viscosity slightly increased to values in order 0.4 Pa.s (all values are shown in Figure 5B), and the increase was significant considering a confidence level of  $p < 0.01$ . By contrast, after nocodazole treatment, the mean viscosity value slightly decreases to 0.2 Pa.s but not significantly.

Therefore, while the diffusion coefficients  $D_{is}$  decreased after exposure by a factor at least 20, and up to 100, with a significance at a confidence level of  $p < 0.001$  for all measures, the viscosity values for irradiated cells only increased by a factor 2 or lower, compared to the ones of untreated cells, and with less significance ( $p < 0.01$ ). This means that the irradiation strongly impact the endosomes transport but not their surrounding viscosity, bringing the system back to a situation close to equilibrium. These results could be explained by the inhibition of molecular motors mediated transport on microtubules, and we therefore investigated further the impact on the microtubules of photoactivation with the investigated photosensitizers.

#### Microtubules: targets of the photodynamic effect

Microtubules are in perpetual remodeling [37,38] and have yet been identified as a target during photodynamic treatment [39–41] and, at this stage, it is logical to hypothesize that an action of the two photosensitizers on the microtubules network

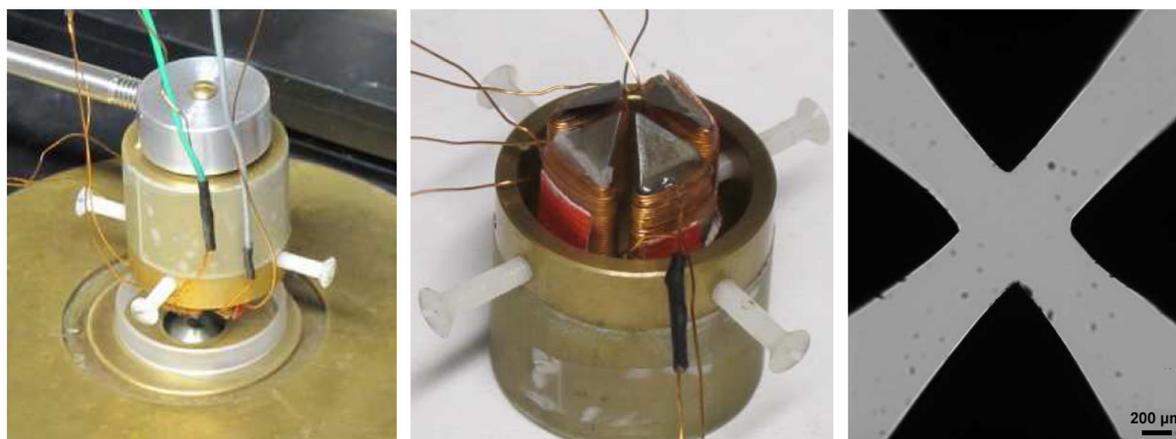


**Figure 3. Quantification of intracellular trafficking.** (A). The mean square displacement ( $\langle \Delta r^2(t) \rangle$ ) was calculated for all conditions according to equation (4) and averaged over 30 independent measurements. For means of clarity, only the main conditions are represented: unlabeled cells non exposed (control, light blue), unlabeled cells treated with nocodazole (dark blue), cells treated with m-THPC and exposed for 1s (red) or 5s (dark red), and cells treated with TPCS2a and exposed for 5s (green) or 20s (dark green). (B). Diffusion coefficient ( $D_{1s}$ ) defined in equation (1). It corresponds to the value of the mean square displacement at 1s ( $\langle \Delta r^2(1s) \rangle$ ). It is shown for all tested conditions, the ones presented in part A, as well as additional ones, including unlabeled cells exposed for 20s (blue), cells treated with both photosensitizers (m-THPC, light red and TPCS2a, very light green) but non exposed, and cells treated with TPCS2a and exposed 1s (light green). The error bars represent the standard error of the mean (SEM), NS (Non Significant) corresponds to  $p > 0.05$ , \* corresponds to  $0.01 < p < 0.05$ , and \*\*\* corresponds to  $p < 0.001$ .

doi: 10.1371/journal.pone.0084850.g003

may be responsible for the observed decrease in active trafficking. As the reactive species photo-induced via the photosensitizers present a very short action range, their subcellular localization may strongly impact their respective effects. For TPCS2a, unlike for m-THPC, the produced oxygen species must first cross the membrane of the endosome before coming close to the microtubule. However, their ability to react with these membranes is well-known - and used as basis of PCI [42,43]. Consequently, it is expected that the diffuse-labelled photosensitizer m-THPC reacts faster with the microtubules. To test this possibility, we developed an *in vitro*

system of reconstituted microtubules and followed their dynamics after irradiation. Within the range of intracellular photosensitizer concentrations (0.2 fmoles per cell), irradiation had a significant depolymerizing effect (Figure 6): immediately after 5 s of irradiation, with a m-THPC concentration of 2 or 5  $\mu\text{M}$ , the microtubule depolymerization took only a few seconds. For TPCS2a, two kinds of experiments were performed, with the aim to mimic, in a reconstructed system, the effects observed within cells. First, results similar to those of m-THPC were obtained with TPCS2a in solution within the same concentration range. This highlights that both photosensitizers,



**Figure 4. Magnetic device.** (Left): The magnetic set-up was adapted to an inverted microscope with a plan 63x oil immersion lens. (Middle): It consists of two pairs of home-made coils magnetizing four engineered soft iron pieces. (Right): The space between the magnetic pieces is 0.6 mm, creating a strong magnetic field in the center (up to 70 mT for the maximum applied current of 1A).

doi: 10.1371/journal.pone.0084850.g004

which have similar singlet oxygen quantum yields, act similarly in solution as photo-depolymerization agent. However, within cells, the subcellular localization of TPCS2a is strongly different from that of m-THPC : it remains sequestered within endosomes. Then, in a second experiment, TPCS2a-labelled endosomes were prepared and used as photo-depolymerization agent in the same way as free TPCS2a (i.e. within the same photosensitizer concentrations, determined by fluorescence spectroscopy). The TPCS2a activity is then strongly slackened as compared to free TPCS2a, corroborating the trapping role of the endosomal membrane for the photo-induced reactive species.

## Discussion

Here we examined the intracellular impacts of the photodynamic effect. Photosensitizers are used in various biomedical applications, from induction of cell death for cancer therapy (PDT) to triggering the release of endocytised macromolecules (PCI) [9,44]. We chose two “standard” photosensitizers, mTHPC and TPCS2a, for this study. These two molecules, which have very similar chemical formulas (chlorin rings), differ only by a terminal functional group. This simple difference makes TPCS2a less hydrophobic than mTHPC and strongly modifies the intracellular localization (cytoplasmic for mTHPC and endosomal for TPCS2a). It is interesting to note that the therapeutic functions of the two photosensitizers also differ: m-THPC (FOSCAN) is used in the clinic, providing effective PDT, while TPCS2a is used within the context of drug delivery as PCI agent, to induce endosomal membrane rupture and the release of active molecules into the cytoplasm. We used this well-controlled model to study the effect of photodynamic stress on intracellular mechanics.

Viscosity changes of the intracellular medium following irradiation have only been studied previously in a single model system using spectrally resolved fluorescence measurements

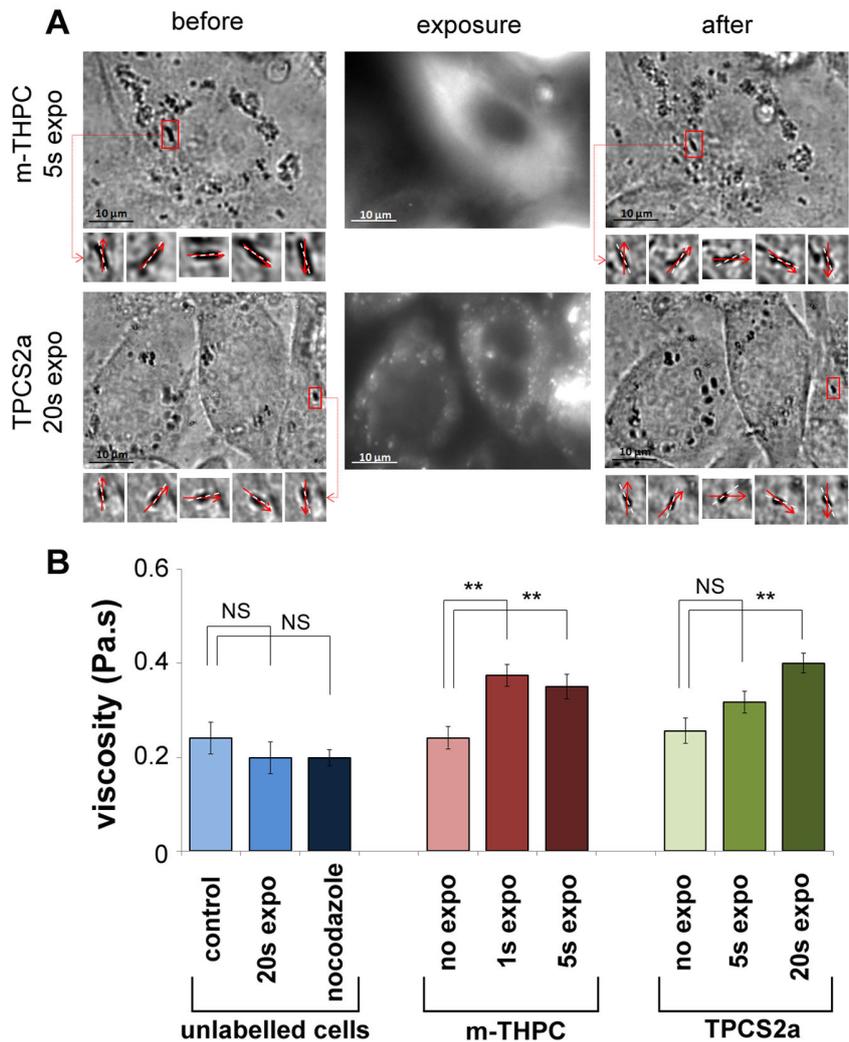
of a porphyrin-dimer-based molecular rotor [15]. Such an approach is only valid if the measurement is made at thermodynamic equilibrium. This does not hold if the probe is localized in endosomes, which appears to be the case in this latter model: the rotor-photosensitizer appears as a small dot in the cytoplasm, suggesting that it is localized in vesicles (presumably endosomes). The observed diffusion of the molecule thus reflects both its diffusion within the vesicle and the diffusion/transport of the vesicle itself.

Here, we chose to investigate the properties of the intracellular microenvironment after photosensitizers activation by using a dual approach: on the one hand, we measured viscosity directly from the angular delay between a chain of magnetic spheres (endosomes) and a rotating magnetic field, and, on the other hand, we followed the spontaneous movement of the same objects and thus derived a diffusion coefficient.

For a Newtonian fluid at thermodynamic equilibrium, the diffusion coefficient  $D$  is related to the viscosity  $\eta$  of the surrounding medium according to the Stokes-Einstein equation:

$$D = kT / 6\pi\eta a \quad (3)$$

where  $a$  is the endosome probe diameter. Note that  $D$  corresponds to our parameter  $D_{1s}$  in the case of Brownian diffusion where exponent  $\alpha$  is equal to 1, and equation (1) becomes the equation of diffusion  $\langle \Delta r^2(t) \rangle = 2Dt$ . In our present case, the intracellular medium surrounding the endosomes is not a Newtonian fluid (because of the cytoskeleton structure and the presence of membrane compartments) and the coefficient  $D_{1s}$  only represents the amplitude of diffusion at the characteristic time  $t=1s$ . Also, strictly speaking, the viscosity of the medium cannot be defined since the relationship between velocity and drag force is not linear and  $\eta$  must be seen as a viscous coefficient at a characteristic time. Nevertheless, at

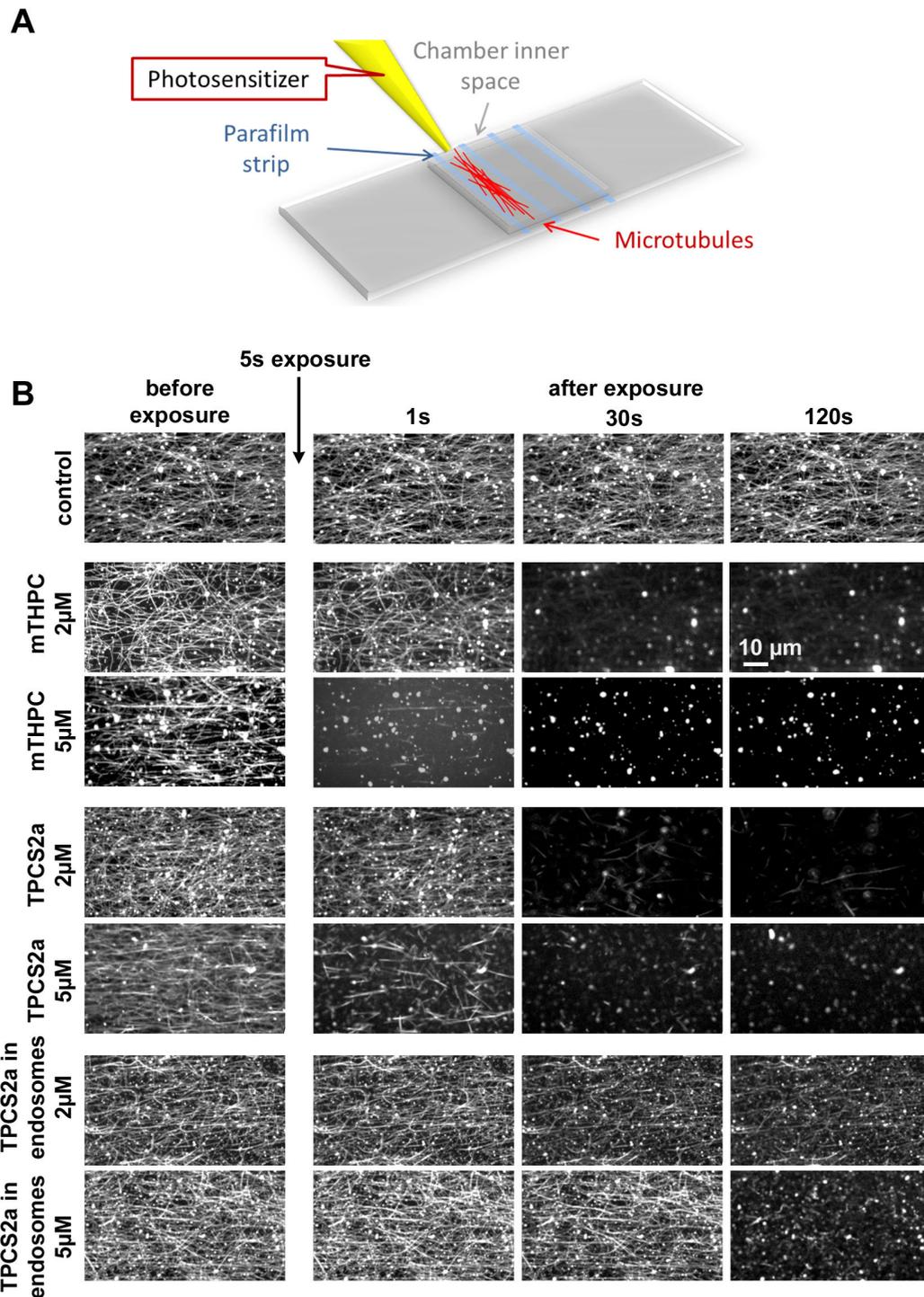


**Figure 5. Measuring intracellular viscosity.** (A) Example of rotations of a chain of magnetic endosomes before and after exposure, for the mTHPC (top) or the TPCS2a (bottom) photosensitizers. The phase lag  $\varphi$  between the direction of the magnetic field (dotted white line) and the direction of the selected chain (red arrow) are indicated in each case. For these two examples, the viscosity around the observed chain slightly increased after treatment, from  $0.11 \pm 0.01$  Pa.s to  $0.18 \pm 0.03$  Pa.s in the mTHPC case, and from  $0.25 \pm 0.05$  Pa.s to  $0.55 \pm 0.04$  Pa.s in the TPCS2a case. (B) Mean viscosity (averaged over 25 independent measurements at least) is shown for each condition (for unlabeled control cells, for unlabeled cells exposed for 20s, for unlabeled cells treated with nocodazole ( $10\mu\text{M}$ , 30min), for cells treated with m-THPC (without exposition, or exposed for 1s and 5s), for cells treated with TPCS2a (without exposition, or exposed for 1s, 5s, and 20s). Controls and cells treated with photosensitizers but not exposed all display the same viscosity mean value, in order 0.25 Pa.s. After nocodazole treatment, the mean viscosity value slightly decreases to 0.2 Pa.s but not significantly, while after exposure of the photosensitizers, it increases to 0.4 Pa.s at maximum. This increase is significant considering a confidence level of  $p < 0.01$ . The error bars represent the standard error of the mean (SEM), NS (Non Significant) corresponds to  $p > 0.05$ , and \*\* corresponds to  $p < 0.01$ .

doi: 10.1371/journal.pone.0084850.g005

thermal equilibrium, a rough generalization of the Stokes-Einstein relation may be written as equation (3). Let us then derive the viscosity from the diffusive measurements according to Stokes Einstein equation, for the purpose of demonstration: before treatment, one retrieves  $\eta_{\text{from diffusion}} = 0.007$  Pa.s, and after

treatments, for the different conditions,  $\eta_{\text{from diffusion}} = 0.07$  Pa.s (mTHPC 1s),  $\eta_{\text{from diffusion}} = 0.2$  Pa.s (mTHPC 5s),  $\eta_{\text{from diffusion}} = 0.03$  Pa.s (TPCS2a 5s),  $\eta_{\text{from diffusion}} = 0.5$  Pa.s (TPCS2a 20s). The effective viscosity deduced from the diffusivity, increase after irradiation. However, as the system is out



**Figure 6. Monitoring microtubule depolymerization.** (A) Schematic representation of the cover glass chamber used in the *in vitro* microtubule assay featuring an inner space filled by capillarity. (B) Network of reconstituted microtubules immersed in a bath containing a photosensitizer. With m-THPC or TPCS2a at a concentration of 2 or 5  $\mu\text{M}$  in solution, complete depolymerization occurred very rapidly, within less than 10 seconds. We can see first the destabilization (1s) of the microtubule structure and second the depolymerization. When TPCS2a-labelled endosomes are used as photodynamic agent, at the same concentration, the depolymerization is strongly delayed.

doi: 10.1371/journal.pone.0084850.g006

equilibrium it does not reflect a real increase in the viscosity, it corresponds instead to a decrease of the intracellular trafficking. The value for untreated cells is far removed from the one obtained with the direct dissipation measurements ( $\eta=0.25$  Pa.s), while after exposure, the derived values get closer the measured ones ( $\eta=0.4$  Pa.s). Equation (3) is therefore strongly violated in untreated cells, indicating a deviation from equilibrium linked to ATP-dependent phenomena such as directed trafficking mediated by molecular motors. After irradiation, the intracellular environment gets closer to equilibrium (in particular for the longest exposure with TPCS2a). This provides indirect evidence that photosensitizers activation inhibits intracellular trafficking, bringing the system closer to thermodynamic equilibrium, where diffusion is controlled primarily by thermal energy. Finally, it must be noted that this study demonstrates that deriving a viscosity from diffusive measurements is not valid, and that any conclusion concerning an increase in viscosity after photosensitizers activation measured with such passive approach [15] must be considered with care. It should also be noted that the measured viscosity here increased only slightly, by a factor less than 2, but significantly (due to the important number of measures performed, always more than 25).

It is interesting to compare the magnitude of the effects between the two photosensitizers for the same dose of irradiation. The two photosensitizers have the same quantum yield of singlet oxygen, so that any differences between them can only result from differences in their modes of interaction with the cell. Thus, 5s of irradiation of cells loaded with TPCS2a had little effect on peri-endosomal viscosity or endosome diffusion, while the same irradiation of cells loaded with m-THPC strongly modified both parameters. These results were expected, given the cytoplasmic localization of m-THPC, as its immersion in the microtubule network makes it easier for short-lived singlet oxygen molecules to reach their target. In contrast, the singlet oxygen produced by TPCS2a, being located within endosomes, must diffuse through the endosome membrane prior to hit a cytoplasmic target such as microtubules.

To demonstrate further this hypothesis and to give direct evidence that the photosensitizer excitation impacts the microtubules network, we directly tested the irradiation on a reconstituted network of microtubules immersed in a bath containing the two photosensitizers in solution at concentrations equivalent to those measured inside the cell. The effect was immediate in the whole concentration range: irradiation entirely depolymerized the microtubules within a few seconds. At the lower concentration range, depolymerization occurred more slowly and was sometimes only partial, but the microtubule structure was nevertheless strongly modified. This observation, showing that microtubules are targets of photodynamic therapy, supports the results of some previous studies. Indeed, microtubule network has been identified as a prime target for anticancer photodynamic therapy [11], so that microtubule inhibitors have been tested as enhancers for photodynamic therapy [45]. Interestingly, these studies, corresponding to the early stages of the process of PCI invention, lead the authors to consider lysosomes and

microtubules as main targets. In fact, the localization of the photosensitizer dictates which of these entities the preferred target is.

Anyway, the inhibition of the microtubules polymerization within NHIK 3025 cells during photodynamic treatments has been studied with various photosensitizers, in particular with TPPSn [39,40]. Actually, cytoskeleton damages, notably on microtubules network, during PDT are partly involved in the initiation of the cell death [41,46]. More recently, the binding of porphyrin derivative photosensitizers to tubulin dimers was described [47] together with the photo-induced modification of the physical properties of the MTs network by reactive species generated directly by the light interaction with the fluorophore labeling the tubulin [48].

Finally, we can support that, regarding to their subcellular localization, the photodynamic effect of m-THPC and TPCS2a can be deciphered by two different scenarios. MTs are primary targets for the cytosolic photosensitizer m-THPC, whereas an important quenching of this effect results from the entrapping of the TPCS2a within the endosomal membrane, which constitutes a competitive target. As a consequence, larger doses of photosensitizer or light are necessary to overcome this barrier for endosomal TPCS2a to approach the potency of mTHPC's ability to disrupt microtubules and cause drastic decreases of active trafficking

## Conclusion

Here the dual effects of photosensitizers activation on the viscous and diffusive intracellular properties are evidenced for the first time.

The dominant effect concerns the inhibition of the endosomal trafficking, which is found up to 100-fold lower after irradiation. By contrast, the viscosity did not increase enough to explain such an effect, demonstrating that the ligand (or binding site) for the photosensitizer is the major determinant of its ability to disrupt intracellular transport through the depolymerization of microtubules.

Also interesting is the combining of active and passive measurements which allow us to compare the viscosity extrapolated from the passive diffusive measurements (assuming that the system is at thermal equilibrium) and the measured one: they differ by two orders of magnitude in control cells, which are clearly out-of-equilibrium systems; by contrast, they come closer to each other after irradiation: thermal equilibrium is approached, through the partial inhibition of the active motions mediated by molecular motors.

Finally, at the same concentration, cells treated with m-THPC are more impacted than the ones treated with TPCS2a, in keeping with their intracellular location and their use for cell treatments.

## Materials and Methods

### Photosensitizers

TPCS2a (Benzenesulfonic acid, 4,4'-(7,8-dihydro-15,20-diphenyl-21H,23H-porphine-5,10-diyl)bis-) was kindly provided by PCI Biotech AS, Oslo, Norway, as a powder with a purity of

more than 98%. m-THPC (5,10,15,20-tetra(3-hydroxyphenyl)chlorin), was purchased from Frontier Scientific (Logan UT, USA). Photosensitizer stock solutions were prepared in ethanol. All the solutions were handled in the dark.

### Cell labeling

The cells are Human Prostatic Cancer Cell lines (PC-3, ATCC® CRL-1435™) and were cultured in T75 flasks at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) completed with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin and streptomycin antibiotics.

Tumor cell were brought to confluence in glass-bottomed 35-mm Petri dishes for high magnification immersion microscopy (63X objective). The cells were then incubated with Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) containing citrate coated magnetic nanoparticles (maghemite, negatively charged, 8 nm in diameter, iron concentration 2mM)[31,49] and the photosensitizers (m-THPC or TPCS2a) at a concentration of 5μM. After incubation for 2 hours, the cells were rinsed three times and placed in complete DMEM. The next day they were irradiated and observed under a thermalized inverted microscope (at magnification 63x).

To assess the influence of the microtubules on the intracellular trafficking and viscosity, cells were treated with a microtubule-disrupting drug, namely nocodazole (Sigma Aldrich, 30 min, 10 mM).

### Irradiation

The cells were exposed to light under the microscope with a wavelength of 470 nm, corresponding to one of the two excitation peaks of the photosensitizers used. As the photosensitizers then emit at 650 nm, a fluorescence image is recorded systematically in order to observe the intracellular localization and intensity of the photosensitizers. Irradiation times of 1s, 5s and/or 20s were used, corresponding to deposited energies of 1.5 J/cm<sup>2</sup>, 7.5 J/cm<sup>2</sup> and 30 J/cm<sup>2</sup>. The fluorescent pictures were taken with a camera Cool Snap (CoolSnap HQ). The effect of irradiation on cellular metabolism was studied by using the Alamar blue test for metabolic activity.

### Monitoring of intracellular trafficking

We videomonitor the cells at a acquisition rate of 10fps during 100s, with a high speed camera Phantom (Phantom V9.1 Vision Research), to observe the spontaneous motion of the endosomes. Their trajectories were extracted using Image J software (Analyse Particles module), and the coordinates  $(x(t), y(t))$  retrieved. The mean square displacement  $\langle \Delta r^2(t) \rangle$  of each trajectory was then computed with Excel software, according to :

$$\langle \Delta r^2(t) \rangle = \langle (x(t+t') - x(t'))^2 + (y(t+t') - y(t'))^2 \rangle_t = \langle \Delta x^2(t) \rangle + \langle \Delta y^2(t) \rangle \quad (4)$$

where brackets denotes averaging.

In most situations,  $\langle \Delta r^2(t) \rangle$  follows a power law with time,  $\langle \Delta r^2(t) \rangle = 2D_{1s}t^\alpha$ , defined in the Results as equation (1). Generally speaking, the value of the exponent  $\alpha$  characterizes the diffusive behavior in the cell:  $\alpha=1$  corresponds to a pure diffusive behavior in a newtonian fluid at thermal equilibrium;

the motion is sub-diffusive (confined) for an exponent  $\alpha < 1$ , and super-diffusive (directed) for an exponent  $1 < \alpha < 2$  ( $\alpha=2$  corresponding to ballistic motion) [50].

### Extraction of endosomes and determination of the magnetic moment by magnetophoresis

The day after incubation, cells were detached with trypsin and centrifuged at 4°C for 5min (250 g). The cells were resuspended in HB (250mM sucrose, 3mM imidazole) plus 1mM DTT and 1/1000 PIC (protease inhibitor cocktail) and centrifuged twice. After the last centrifugation, the cells were resuspended in 1 mL of buffer and disrupted by extruding 10 times through a 23G needle, a treatment that leaves nuclei intact. Then this cell lysate were centrifuged 6 min at 700 g (4°C) to remove the nuclei. The post-nuclear supernatant were then placed against a magnet for 1h and the magnetic endosomes were collected in BRB-taxol-DTT (1X-10μM-5mM).

To measure the magnetization of the endosomes, a thin rod of nickel (50μm) was trapped in a chamber made of two cover glasses, creating a 150mT magnetic field and 280 mT/mm magnetic gradient (characterized with magnetic beads of known magnetization) in the window of observation, 50μm apart from the rod. A small volume (10μl) of the solution containing the magnetic endosomes was inserted in the chamber and the rod was magnetized by an external magnet. The velocity of the endosomes was measured, and the magnetization of the endosomes deduced by equilibrating the magnetic force with the viscous drag (see 51 for more details). The magnetic moment of endosomes at saturation was found equal to  $m_{sat} = (3.3 \pm 0.5) \times 10^{-15} \text{ A m}^2$  (equivalent to  $(26 \pm 4) \times 10^3$  nanoparticles per endosome). This saturation is reached for applied magnetic field over 200 mT. At 50 mT for instance (the field selected for the experiments here), the nanoparticles are magnetized at only 55% of their saturation value (see for instance [REF] for a magnetisation curve) and the magnetic moment per endosome equals  $m = 0.55 m_{sat} = (1.8 \pm 0.2) \times 10^{-15} \text{ A m}^2$ .

### Magnetic endosomes chaining

In the presence of a magnetic field, the magnetic endosomes should align in the direction of the field to form small chains within the cytoplasm. Indeed, the interaction energy between

two endosomes,  $E_{dipole-dipole} = -\frac{2\mu_0 m^2}{a^3}$ , where  $a$  is the

endosome diameter (0.6 μm), is in order  $10^3 k_B T$ : once formed inside the cell, the chains are stable against thermal fluctuations. In a 50 mT magnetic field, chains from two to four endosomes were observed within the cells.

### Magnetic device

The magnetic device to apply a rotational magnetic field was specially designed in the laboratory and is composed of four coils which cores are made of soft iron. Pictures of the devices are shown in the Figure 4. The coils are connected by pairs and supply by an alternative current. The space between each tip is about 600 microns yielding a strong magnetic field (50 mT for the one selected in this study, corresponding to a 0.65 A current; possibly reaching 70 mT for a 1A current) in the plane

of the cells. The magnetic field  $\vec{B}$  rotates if the two pairs of coils are supplied with sinusoidal currents displaying the same frequency but 90° out of phase: the generated magnetic fields in the  $x$ - $y$  plane,  $B_x$  and  $B_y$ , are sinusoidal with the same frequency, but with a phase lag of 90°, meaning that  $B_x=0$  when  $B_y$  is maximum, and reciprocally. The resulting magnetic field thus displays always the same modulus, but its direction rotates in the  $x$ - $y$  at the frequency of the currents applied. A light-emitting diode (LED) is mounted at the top of the device to illuminate the sample. This same diode is connected to the input signal, to trigger its turning on at the exact instant when  $B_x=0$  (and thus calibrate the magnetic field angle for all the captured frames). Finally, the whole set-up was adapted to a micromanipulator mounted on a Leica DMIRB microscope (thermostated at 37°C by Life Imaging Services), and was systematically sterilized prior to use.

### Magnetic rotation of the chains: principles and viscosity measurement

When the magnetic field rotates, the applied magnetic torque depends on the angle  $\varphi$  between the chain and the field:

$$\Gamma_{\text{magn}} = \Gamma_o \frac{\sin(2\varphi)}{2}. \Gamma_o \text{ is calculated by summing the torques}$$

exerted between pairs of endosomes in the chain, each due to the magnetic dipole interaction with its neighbors:

$$\Gamma_o = \frac{3\mu_o m^2 N^2}{4\pi d^3}, \text{ where } N \text{ is the number of endosomes in the}$$

chain. When the field is continuously rotating, at a constant frequency  $F = d\theta/dt$ , this magnetic moment equilibrates with the viscous torque:  $\Gamma_{\text{viscoel}} = \kappa\eta V \frac{d\theta}{dt}$ , where  $\eta$  is the viscosity of the

medium surrounding the chain at the frequency of field rotation (0.2 Hz),  $V$  the volume of the chain, and  $\kappa$  a previously calibrated geometric factor (see 35,36 for more details). The measurement of the angular delay  $\varphi$  thus provides direct

access to the viscous coefficient  $\eta$ :  $\eta = \frac{\mu_o m^2 \sin(2\varphi)}{32\pi\kappa F}$  (defined as equation 2). Such a measurement of the local viscosity was validated using magnetic beads (MyOne,  $m=10^{-14}$  A m<sup>2</sup>), and performing the measure in glycerol (99.9% purity,  $\eta=0.35$  Pa.s at 37°C). The magnetic local measurement performed retrieved a value  $\eta_{\text{meas}}=0.359\pm0.05$  Pa.s, in excellent agreement with the calibrated value.

### In vitro microtubules polymerization

The tubulin was provided from Cytoskeleton (Cytoskeleton Inc., Denver USA). It was stored at the concentration of 10mg/ml at -80°C in BRB 1X buffer containing glycerol (50%) and guanosine triphosphate (GTP) (1mM). Microtubules were polymerized from a 1:4 mixture of rhodamine-labeled tubulin and unlabeled tubulin in BRB 1X buffer containing GTP (1mM), MgCl<sub>2</sub> (25mM) and DMSO (1mM). This mixture was incubated at 37°C for 30min in order to allow for microtubule

polymerization. The microtubules were then diluted at least 30 fold with a mixture of BRB 1X, Taxol (10μM) and dithiothreitol (DTT) (5mM) for stabilization. The microtubules were stored at room temperature and used within two weeks (adapted from [52]).

### In vitro Microtubule assay

Chambers used for the *in vitro* microtubule assay featured two overlaid silanized cover glasses (26\*50 and 22\*22mm). The inner space of chambers was created by positioning thin strips of parafilm between the cover glasses (Figure 6A). The chambers were sealed by heating at 100°C. The inner space between the cover glasses was less than 0.5mm corresponding to a volume of 10-15 μl. Different solutions were injected and penetrated into the inner space by capillarity.

First, we incubated the chamber with Anti-α-tubulin (5 min) followed by F127 (Pluronic) (10-15 min) to passivate the surface, and then microtubules (15 min), including a washing step with BRB 1X buffer between each incubation. After microtubule incubation, the chamber was washed with BRB 1X buffer containing Taxol (10μM) and DTT (5mM). The last step consisted in injecting the last solution and the photosensitizer (free in solution or inside endosomes) at different concentrations. Concerning the free photosensitizer condition, triton X-100 was added to the solution at 0.3% final concentration in order to prevent photosensitizer aggregation. For the endosome solution, the photosensitizer (TPCS2a) concentration was determined by fluorescence spectroscopy (SLM Aminco Bowman Series 2 spectrometer) at the excitation wavelength of 410 nm.

### Statistics

Data are presented as mean values ± standard error of the mean (SEM). Numbers of independent measurements were  $n > 30$  for passive measurements,  $n > 25$  for active measurements. t-test with Welch's correction was performed to determine a significant difference between the test and control groups using Prism 3.0 version of GraphPad software (USA). A minimum of 99% confidence level was considered significant. \*\*\* indicates  $p < 0.001$ . \*\* indicates  $p < 0.01$ . \* indicates  $p < 0.05$ . NS (Non Significant) indicates  $p > 0.05$ .

### Acknowledgements

The authors thank Cécile Leduc for help with the microtubules *in vitro* test, Damien Robert for help in the magnetic device development, and Julien Tailleux for fruitful discussions.

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: KA SB AS JCB FG CW. Performed the experiments: KA SB AS CW. Analyzed the data: KA SB FG CW. Contributed reagents/materials/analysis tools: KA SB CW. Wrote the manuscript: KA FG CW.

## References

- DeRosa MC, Crutchley RJ (2002) Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews* 233–234: 351–371.
- Kuimova MK, Yahioglu G, Ogilby PR (2009) Singlet oxygen in a cell: Spatially dependent lifetimes and quenching rate constants. *J Am Chem Soc* 131: 332–340. doi:10.1021/ja807484b. PubMed: 19128181.
- Ogilby PR (2010) Singlet oxygen: There is indeed something new under the sun. *Chem Soc Rev* 39: 3181–3209. doi:10.1039/b926014p. PubMed: 20571680.
- Breitenbach T, Kuimova MK, Gbur P, Hatz S, Schack NB et al. (2009) Photosensitized production of singlet oxygen: Spatially-resolved optical studies in single cells. *Photochem Photobiol Sci* 8: 442–452. doi:10.1039/b809049a. PubMed: 19337656.
- Hatz S, Poulsen L, Ogilby PR (2008) Time-resolved singlet oxygen phosphorescence measurements from photosensitized experiments in single cells: Effects of oxygen diffusion and oxygen concentration. *Photochem Photobiol* 84: 1284–1290. doi:10.1111/j.1751-1097.2008.00359.x. PubMed: 18435700.
- Heuvingh J, Bonneau S (2009) Asymmetric oxidation of giant vesicles triggers curvature-associated shape transition and permeabilization. *Biophys J* 97: 2904–2912. doi:10.1016/j.bpj.2009.08.056. PubMed: 19948119.
- Berg K, Selbo PK, Prasmickaite L, Tjelle TE, Sandvig K et al. (1999) Photochemical internalization: A novel technology for delivery of macromolecules into cytosol. *Cancer Res* 59: 1180–1183. PubMed: 10096543.
- Selbo PK, Sivam G, Fodstad Y, Sandvig K, Berg K (2001) In vivo documentation of photochemical internalization, a novel approach to site specific cancer therapy. *International Journal of Cancer* 92: 761–766. doi:10.1002/1097-0215(20010601)92:5. PubMed: 11340584.
- Bonneau S, Vever-Bizet C (2008) Tetrapyrrole photosensitisers, determinants of subcellular localisation and mechanisms of photodynamic processes in therapeutic approaches. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 18: 1011–1025. doi:10.1517/13543776.18.9.1011.
- Petrovajova D, Jancura D, Miskovsky P, Chorvat D Jr, Chorvatova A et al. (2013) Monitoring of singlet oxygen luminescence and mitochondrial autofluorescence after illumination of hypericin/mitochondria complex: A time-resolved study. *Laser. Physics Letters* 10.
- Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D et al. (1998) Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* 90: 889–905. doi:10.1093/jnci/90.12.889. PubMed: 9637138.
- Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR (2005) Mechanisms in photodynamic therapy: Part three - Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2: 91–106. doi:10.1016/S1572-1000(05)00060-8.
- Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR (2005) Mechanisms in photodynamic therapy: Part two - Cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2: 1–23. doi:10.1016/S1572-1000(05)00030-X.
- Vikdal M, Generalov R, Berg K The photosensitizer disulfonated aluminum phthalocyanine reduces uptake and alters trafficking of fluid phase endocytosed drugs in vascular endothelial cells—Impact on efficacy of photochemical internalization. *Biochemical Pharmacology*.
- Kuimova MK, Botchway SW, Parker AW, Balaz M, Collins HA et al. (2009) Imaging intracellular viscosity of a single cell during photoinduced cell death. *Nat Chem* 1: 69–73. doi:10.1038/nchem.120. PubMed: 21378803.
- Brangwynne CP, Koenderink GH, MacKintosh FC, Weitz DA (2008) Cytoplasmic diffusion: Molecular motors mix it up. *J Cell Biol* 183: 583–587. doi:10.1083/jcb.200806149. PubMed: 19001127.
- Wilhelm C (2008) Out-of-equilibrium microrheology inside living cells. *Phys Rev Lett* 101: 028101. PubMed: 18764230.
- MacKintosh FC, Schmidt CF (2010) Active cellular materials. *Curr Opin Cell Biol* 22: 29–35. doi:10.1016/j.ceb.2010.01.002. PubMed: 20089390.
- Bursac P, Fabry B, Trepast X, Lenormand G, Butler JP et al. (2007) Cytoskeleton dynamics: Fluctuations within the network. *Biochem Biophys Res Commun* 355: 324–330. doi:10.1016/j.bbrc.2007.01.191. PubMed: 17303084.
- Stuhmann B, Soares E, Silva M, Depken M, MacKintosh FC, Koenderink GH (2012) Nonequilibrium fluctuations of a remodeling in vitro cytoskeleton. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 86: 020901. PubMed: 23005716.
- Brangwynne CP, Koenderink GH, MacKintosh FC, Weitz DA (2009) Intracellular transport by active diffusion. *Trends Cell Biol* 19: 423–427. doi:10.1016/j.tcb.2009.04.004. PubMed: 19699642.
- Goldstein D, Elhanan T, Aronovitch M, Weihs D (2013) Origin of active transport in breast-cancer cells. *Soft Matter* 9: 7167–7173. doi:10.1039/c3sm50172h.
- Bruno L, Salierno M, Wetzler DE, Despósito MA, Levi V (2011) Mechanical properties of organelles driven by microtubule-dependent molecular motors in living cells. *PLOS ONE* 6: e18332. PubMed: 21483765.
- Abou B, Gallet F (2004) Probing a nonequilibrium Einstein relation in an aging colloidal glass. *Physical Review Letters* 93: 160603–160601–160603–160604.
- Robert D, Aubertin K, Bacri JC, Wilhelm C (2012) Magnetic nanomanipulations inside living cells compared with passive tracking of nanopores to get consensus for intracellular mechanics. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 85: 011905. PubMed: 22400589.
- Mojzisova H, Bonneau S, Brault D (2007) Structural and physico-chemical determinants of the interactions of macrocyclic photosensitizers with cells. *Eur Biophys J* 36: 943–953. doi:10.1007/s00249-007-0204-9. PubMed: 17628795.
- Wang JTW, Berg K, Høgset A, Bown SG, MacRobert AJ (2013) Photophysical and photobiological properties of a sulfonated chlorin photosensitizer TPCS2a for photochemical internalisation (PCI). *Photochemical and Photobiological Sciences* 12: 519–526. doi:10.1039/c2pp25328c. PubMed: 23232550.
- Yow CMN, Chen JY, Mak NK, Cheung NH, Leung AWN (2000) Cellular uptake, subcellular localization and photodamaging effect of Temoporfin (mTHPC) in nasopharyngeal carcinoma cells: Comparison with hematoporphyrin derivative. *Cancer Lett* 157: 123–131. doi:10.1016/S0304-3835(00)00453-5. PubMed: 10936672.
- Salas-Cortes L, Ye F, Tenza D, Wilhelm C, Theos A et al. (2005) Myosin Ib modulates the morphology and the protein transport within multi-vesicular sorting endosomes. *J Cell Sci* 118: 4823–4832. doi:10.1242/jcs.02607. PubMed: 16219689.
- Verderio C, Cagnoli C, Bergami M, Francolini M, Schenk U, et al. (2012) TI-VAMP/VAMP7 is the SNARE of secretory lysosomes contributing to ATP secretion from astrocytes. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 104: 213–228.
- Rivière C, Wilhelm C, Cousin F, Dupuis V, Gazeau F et al. (2007) Internal structure of magnetic endosomes. *European Physical Journal E: Soft Matter* 22: 1–10. doi:10.1140/epje/e2007-00014-1. PubMed: 17334684.
- Vale RD (2003) The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 112: 467–480. doi:10.1016/S0092-8674(03)00111-9. PubMed: 12600311.
- Arcizet D, Meier B, Sackmann E, Rädler JO, Heinrich D (2008) Temporal analysis of active and passive transport in living cells. *Phys Rev Lett* 101: 248103. PubMed: 19113674.
- Robert D, Nguyen TH, Gallet F, Wilhelm C (2010) In vivo determination of fluctuating forces during endosome trafficking using a combination of active and passive microrheology. *PLOS ONE* 5: e10046. PubMed: 20386607.
- Marion S, Wilhelm C, Voigt H, Bacri JC, Guillén N (2004) Overexpression of myosin IB in living *Entamoeba histolytica* enhances cytoplasm viscosity and reduces phagocytosis. *J Cell Sci* 117: 3271–3279. doi:10.1242/jcs.01178. PubMed: 15226399.
- Wilhelm C, Browaeys J, Ponton A, Bacri JC (2003) Rotational magnetic particles microrheology: the Maxwellian case. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 67: 011504. doi:10.1103/PhysRevE.67.011504. PubMed: 12636503.
- Dogterom M, Leibler S (1993) Physical aspects of the growth and regulation of microtubule structures. *Phys Rev Lett* 70: 1347–1350. doi:10.1103/PhysRevLett.70.1347. PubMed: 10054353.
- Mitchison T, Kirschner M (1984) Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312: 237–242. doi:10.1038/312237a0. PubMed: 6504138.
- Berg K (1992) The unpolymerized form of tubulin is the target for microtubule inhibition by photoactivated tetra(4-sulfonatophenyl)porphine. *Biochim Biophys Acta* 1135: 147–153. doi:10.1016/0167-4889(92)90130-4. PubMed: 1616935.
- Berg K, Moan J, Bommer JC, Winkelman JW (1990) Cellular inhibition of microtubule assembly by photoactivated sulfonated meso-tetraphenylporphines. *Int J Radiat Biol* 58: 475–487. doi:10.1080/09553009014551821. PubMed: 1975609.
- Juarranz A, Espada J, Stockert JC, Villanueva A, Polo S et al. (2001) Photodamage induced by Zinc(II)-phthalocyanine to microtubules, actin, alpha-actinin and keratin of HeLa cells. *Photochem Photobiol* 73:

- 283-289. Available online at: doi: 10.1562/0031-8655(2001)0730283PIBZIP2.0.CO2. PubMed: 11281025
42. Berg K, Moan J (1997) Lysosomes and microtubules as targets for photochemotherapy of cancer. *Photochem Photobiol* 65: 403-409. doi: 10.1111/j.1751-1097.1997.tb08578.x. PubMed: 9077120.
  43. Berg K, Nordstrand S, Selbo PK, Tran DTT, Angell-Petersen E et al. (2011) Disulfonated tetraphenyl chlorin (TPCS 2a), a novel photosensitizer developed for clinical utilization of photochemical internalization. *Photochemical and Photobiological Sciences* 10: 1637-1651. doi:10.1039/c1pp05128h. PubMed: 21773635.
  44. Berg K, Selbo PK, Weyergang A, Dietze A, Prasmickaite L et al. (2005) Porphyrin-related photosensitizers for cancer imaging and therapeutic applications. *J Microsc* 218: 133-147. doi:10.1111/j.1365-2818.2005.01471.x. PubMed: 15857375.
  45. Ma LW, Berg K, Danielsen HE, Kaalhus O, Iani V et al. (1996) Enhanced antitumour effect of photodynamic therapy by microtubule inhibitors. *Cancer Lett* 109: 129-139. doi:10.1016/S0304-3835(96)04437-0. PubMed: 9020912.
  46. Liu T, Wu LY, Berkman CE (2010) Prostate-specific membrane antigen-targeted photodynamic therapy induces rapid cytoskeletal disruption. *Cancer Lett* 296: 106-112. doi:10.1016/j.canlet.2010.04.003. PubMed: 20452720.
  47. Tian F, Johnson EM, Zamarripa M, Sansone S, Brancaleon L (2007) Binding of porphyrins to tubulin heterodimers. *Biomacromolecules* 8: 3767-3778. doi:10.1021/bm700687x. PubMed: 18020394.
  48. Guo H, Xu C, Liu C, Qu E, Yuan M et al. (2006) Mechanism and dynamics of breakage of fluorescent microtubules. *Biophys J* 90: 2093-2098. doi:10.1529/biophysj.105.071209. PubMed: 16387782.
  49. Fayol D, Luciani N, Lartigue L, Gazeau F, Wilhelm C (2013) Managing magnetic nanoparticle aggregation and cellular uptake: a precondition for efficient stem-cell differentiation and MRI tracking. *Adv Healthc Mater* 2: 313-325. doi:10.1002/adhm.201200294. PubMed: 23184893.
  50. Bruno L, Levi V, Brunstein M, Despósito MA (2009) Transition to superdiffusive behavior in intracellular actin-based transport mediated by molecular motors. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 80: 011912. PubMed: 19658734.
  51. Andriola Silva AK, Di Corato R, Gazeau F, Pellegrino T, Wilhelm C (2012) Magnetophoresis at the nanoscale: Tracking the magnetic targeting efficiency of nanovectors. *Nanomedicine (Lond)* 7: 1713-1727. doi:10.2217/nnm.12.40. PubMed: 22709344.
  52. Herold C, Leduc C, Stock R, Diez S, Schwille P (2012) Long-range transport of giant vesicles along microtubule networks. *Chemphyschem* 13: 1001-1006. doi:10.1002/cphc.201100669. PubMed: 22213552.

### 4.3 Discussion

Parmi toutes les études réalisées sur la photothérapie, peu d'entre elles concernent l'impact sur le trafic intracellulaire. Nous avons réalisé des expériences à l'échelle de la cellule unique pour quantifier les effets de la photo-activation sur le trafic intracellulaire ainsi que sur les propriétés mécaniques du cytoplasme sur un même système. Les cellules ont été marquées simultanément avec des nanoparticules superparamagnétiques et un agent photosensible (m-THPC ou TPCS<sub>2a</sub>). Les endosomes magnétiques obtenus après incubation présentent deux avantages : ils nous offrent un bon contraste pour le suivi des endosomes afin de quantifier le trafic intracellulaire (mesures passives) et peuvent être manipulés par un couple magnétique afin de quantifier une viscosité effective du cytoplasme (mesures actives). Nous avons besoin des nanoparticules magnétiques pour effectuer les mesures actives. Les interactions chimiques entre les nanoparticules et les photosensibilisateurs peuvent influencer l'internalisation du photosensibilisateur. Nous avons donc préféré effectuer une co-internalisation du photosensibilisateur et des nanoparticules à la fois pour la fabrication des échantillons prévus pour la quantification du trafic intracellulaire et pour les mesures de viscosité effective. De cette façon, nous sommes sûrs d'avoir utilisé le même système pour effectuer les mesures passives et actives.

L'impact de la photo-activation sur le trafic intracellulaire a été quantifié en suivant les mouvements spontanés d'endosomes avant et après l'activation des molécules photosensibles. L'analyse des trajectoires en terme de déplacement quadratique moyen, a révélé une forte diminution du trafic intracellulaire après photo-activation. Le MSD des endosomes avant la perturbation est super-diffusif et reflète une activité normale des moteurs moléculaires. Après l'exposition du photosensibilisateur, le MSD des endosomes diminue (diminution de l'amplitude et de l'exposant) proportionnellement à la durée d'exposition et suivant le type de photosensibilisateur. En comparant l'effet des deux photosensibilisateurs, nous avons constaté qu'à dose équivalente (exposition de 5s), le m-THPC impactait le trafic intracellulaire de manière plus significative que le TPCS<sub>2a</sub>. Il faut exposer les cellules traitées au TPCS<sub>2a</sub> pendant 20s pour avoir un effet comparable à celui du m-THPC obtenu après 5s d'exposition. Les deux photosensibilisateurs ayant un rendement similaire en oxygènes singulets, la différence d'impact réside dans le fait que les deux photosensibilisateurs ont une localisation intracellulaire différente et que leur activation libère des oxygènes singulets ciblant différents endroits du cytoplasme. Pour les doses les plus fortes, c'est-à-dire 5s d'exposition pour le m-THPC et 20s pour le TPCS<sub>2a</sub>, le MSD devient sous-diffusif et reflète une forte inhibition du trafic intracellulaire. L'amplitude du MSD diminue d'un facteur 100 après ces conditions de traitement.

Pour comprendre pourquoi le trafic intracellulaire est si fortement inhibé, nous avons émis deux hypothèses. La première était qu'une modification directe des acteurs du trafic intracellulaire avait lieu pendant la photo-activation. Soit l'activité des moteurs est perturbée, soit le réseau de microtubules est modifié par la présence de radicaux libres. L'autre hypothèse concernait une modification des propriétés mécaniques du cytoplasme allant dans le sens d'une augmentation des forces de friction sur les endosomes en mouvement. Un article publié dans Nature Chemistry montre à l'aide de rotors moléculaires que la viscosité après PDT peut augmenter d'un facteur 6 [87]. Cependant le photosensibilisateur utilisé dans cette étude ne correspond pas à un de ceux que nous avons utilisé. Nous avons donc profité de la présence d'endosomes magnétiques dans les cellules pour faire des mesures actives à la même échelle que la taille des sondes passives. Les endosomes magnétiques peuvent facilement être organisés en chaînes d'endosomes magnétiques dont l'anisotropie nous permet de les manipuler par un couple magnétique visant à mesurer une viscosité effective. Lorsqu'on fait tourner le champ magnétique à vitesse constante, les chaînes d'endosomes magnétiques suivent

le champ à la même vitesse de rotation. Une fois le régime permanent établi, il est possible de relier le déphasage entre les positions angulaires de la chaîne et du champ magnétique avec une viscosité effective (pour une fréquence de rotation donnée) (voir partie 2.6.2 pour les détails). Pour s'affranchir des effets de fluidification, bien que les résultats du chapitre précédent (3) nous montrent qu'a priori il ne doit pas y en avoir, nous avons fait la mesure de déphasage sur la première rotation une fois le régime permanent établi (c'est-à-dire pendant la deuxième rotation). Nous avons constaté, que dans notre cas, la viscosité était augmentée au maximum, d'un facteur 2. Cette augmentation va bien dans le sens d'une augmentation des forces de frictions exercées sur les endosomes lorsqu'ils sont mis en mouvement par les moteurs moléculaires. Seulement elle n'est pas significative en comparaison à la baisse de trafic intracellulaire établie par les mesures passives, dont l'effet est 50 fois supérieur.

L'autre hypothèse concerne une modification de la structure des microtubules, qui sont essentiels au transport vésiculaire des endosomes. Les microtubules sont des filaments très instables et réputés pour être sensibles aux radicaux libres [88, 89]. Les oxygènes singulets libérés lors de la photo-activation peuvent participer à des réactions d'oxydations des protéines stabilisant les microtubules. Ces réactions peuvent conduire au phénomène de catastrophe, qui correspond à une dépolymérisation complète ou partielle mais néanmoins rapide des microtubules. De plus, les MSD mesurés dans des cellules dont les microtubules ont été dépolymérisés (avec du nocodazole), se rapprochent des comportements obtenus après photo-activation (à 5s pour le m-THPC et à 20s pour le TPCS<sub>2a</sub>). Afin de tester cette hypothèse, nous avons mis en place un système modèle minimal constitué d'un réseau de microtubules *in vitro* incubé avec du photosensibilisateur. Afin de mimer au mieux l'environnement cellulaire en présence des deux types de photosensibilisateurs, nous avons choisi deux conditions d'incubation des microtubules avec le photosensibilisateur. Dans le premier cas, nous avons incubé les microtubules avec une solution contenant du photosensibilisateur (m-THPC ou TPCS<sub>2a</sub>) dilué à la même concentration que dans les cellules. Dans ce cas, le photosensibilisateur est libre et peut diffuser dans la solution dans laquelle baignent les microtubules. Dans le deuxième cas, nous avons incubé les microtubules avec une solution contenant les endosomes extraits de cellules ayant été marquées avec le photosensibilisateur endosomal, le TPCS<sub>2a</sub>. Dans ce cas, le photosensibilisateur se trouve encapsulé dans les endosomes. Après 5s d'exposition du premier système (photosensibilisateur en solution), nous avons constaté que, quel que soit le photosensibilisateur, les microtubules étaient dépolymérisés rapidement et avec une dynamique de dépolymérisation similaire pour les deux photosensibilisateurs. Cette observation confirme le fait que les deux photosensibilisateurs ont un rendement similaire en oxygènes singulets. Nous avons également constaté que plus la concentration en photosensibilisateur est élevée, plus la dépolymérisation des microtubules est rapide (de quelques dizaine de secondes à quelques secondes). Après 5s d'exposition du deuxième système (photosensibilisateur endosomal), nous avons constaté que la dépolymérisation des microtubules était retardée par rapport à la première condition (à concentration en photosensibilisateur équivalente). La seule différence entre les deux systèmes réside dans la localisation du photosensibilisateur et donc sa distance par rapport aux microtubules. Dans le cas du deuxième système, les radicaux libres produits lors de la photo-activation doivent d'abord traverser la membrane des endosomes, avant de pouvoir diffuser et atteindre les microtubules. C'est pour cette même raison que le TPCS<sub>2a</sub> nécessite un temps d'exposition plus long pour avoir le même effet sur le trafic intracellulaire que le m-THPC. Les radicaux libres produits après 5s d'exposition n'ont pas une durée de vie suffisamment longue pour pouvoir à la fois perméabiliser les membranes des endosomes et dépolymériser les microtubules.

## 4.4 Conclusion et perspectives

Nous avons mis en place un système expérimental qui nous a permis, pour la première fois, d'étudier de manière quantitative et sur un même système l'impact de la photothérapie sur le trafic intracellulaire ainsi que sur la viscosité du cytoplasme. L'effet dominant concerne l'inhibition du trafic intracellulaire qui est diminué d'un facteur 100 après photo-activation. Les mesures actives nous ont appris, que contrairement à ce que l'on pouvait attendre, la composante dissipative n'augmente qu'au maximum d'un facteur 2. La comparaison des résultats obtenus par les mesures passives et actives, nous a poussée à considérer que la nature de l'effet observé n'était pas mécanique mais pouvait être dû à une modification structurelle du réseau de microtubules, essentiel au fonctionnement du transport vésiculaire. Cette hypothèse a été confirmée lors de l'étude d'un système modèle permettant d'observer l'impact de la photo-activation sur les microtubules, qui sont dépolymérisés rapidement suite à l'exposition du photosensibilisateur, avec une dynamique de dépolymérisation dépendante de la concentration en photosensibilisateur et de son conditionnement (en solution ou encapsulé dans des endosomes). La comparaison des deux photosensibilisateurs dont la localisation intracellulaire est différente, a mis en évidence le fait que l'impact sur les éléments cellulaires dépend fortement de la localisation du photosensibilisateur au moment de son activation et par conséquent de la distance entre les radicaux libres libérés par la photo-activation et leur cible. Dans notre cas, à dose égale, les cellules traitées avec le m-THPC montrent un impact plus fort que les cellules traitées au TPCS<sub>2a</sub>. Il semble donc que les microtubules soient une cible importante de la photothérapie. Leur dépolymérisation engendre non seulement une forte inhibition du trafic intracellulaire mais peut aussi avoir des conséquences sur d'autres phénomènes biologiques, comme par exemple la division cellulaire ou le transport d'organites.

Nous avons étudié la dépolymérisation de microtubules *in vitro* par photo-activation. Il serait également intéressant d'observer ce phénomène directement dans les cellules en marquant les microtubules par fluorescence, de façon à pouvoir observer comment la dose (concentration en photosensibilisateur, énergie de la photo-activation) module la dynamique de dépolymérisation dans le milieu intracellulaire.



# Vésiculation induite par des traitements anti-cancéreux

## Sommaire

---

<b>5.1 Introduction</b>	<b>100</b>
<b>5.2 Les traitements anticancéreux</b>	<b>101</b>
5.2.1 La photothérapie	101
5.2.2 La chimiothérapie	102
<b>5.3 La vésiculation : mise en évidence et quantification</b>	<b>102</b>
5.3.1 Par photothérapie	102
5.3.2 Par chimiothérapie	105
<b>5.4 Effet thérapeutique</b>	<b>108</b>
5.4.1 Viabilité cellulaire	108
5.4.2 Annexine V (apoptose)	110
5.4.3 Analyse protéomique de l'apoptose	110
5.4.4 Analyse génique du stress oxydant	113
<b>5.5 Origine des vésicules</b>	<b>117</b>
<b>5.6 Transfert des vésicules</b>	<b>119</b>
5.6.1 Vésicules obtenues après photothérapie	119
5.6.2 Vésicules obtenues après chimiothérapie	120
<b>5.7 Discussion</b>	<b>122</b>
<b>5.8 Conclusion et perspectives</b>	<b>124</b>

---

## 5.1 Introduction

Pendant l'étude de l'impact d'une perturbation photochimique sur le trafic intracellulaire, nous avons observé que parallèlement à une inhibition du trafic intracellulaire, la photo-activation déclenchait un trafic extracellulaire intense via l'exocytose de vésicules. Alors que le m-THPC ou FOSCAN est utilisé en thérapie anti-cancéreuse (thérapie photo-dynamique ou PDT), avec pour but d'induire la mort cellulaire, son activation provoquerait un effet secondaire conduisant à l'émission et la dissémination de matériel cellulaire provenant de cellules cancéreuses à travers l'organisme.

Cela fait maintenant plusieurs années que les microvésicules, font l'objet d'études et ont pu être identifiées comme étant des acteurs potentiels de la dissémination du cancer à travers l'organisme. Les microvésicules participent à la communication intercellulaire. Une cellule émettrice peut envoyer des information à une ou plusieurs cellules à travers l'émission de microvésicules. Ces compartiments délimités par une membrane peuvent contenir plusieurs types de biomolécules, comme par exemple des protéines, des organites, des ARN messagers ou des microADN [90]. Du fait de leur petite taille et de leur biocompatibilité, ces vésicules peuvent migrer dans tout l'organisme. Les microvésicules interviennent à plusieurs niveaux et peuvent avoir un effet néfaste sur les patients atteints d'un cancer : les microvésicules favorisent l'angiogenèse qui est vitale pour la survie et l'extension de tumeurs, elles pourraient être la cause d'une hypercoagulation et augmenteraient les risques de maladie thromboembolique [91]. Concernant l'émission de vésicules lors d'un traitement anticancéreux, il a été montré que des cellules traitées par doxorubicine expulsaient une partie de la drogue par les vésicules, réduisant ainsi la quantité intracellulaire d'agent thérapeutique [92].

Concernant la photothérapie (PDT), beaucoup d'études ont été réalisées sur la relation entre la dose de photosensibilisateur (concentration, énergie d'exposition) et l'effet thérapeutique, mais aucune étude ne concerne le triangle reliant la dose, l'effet thérapeutique et le nombre de vésicules émises.

Le but de cette étude a été de caractériser l'émission de vésicules induite par la photothérapie et de comparer cette vésiculation à celle provoquée par un traitement de chimiothérapie classique par doxorubicine. La première étape a été de quantifier l'émission de vésicules par rapport à la dose (concentration) en agent thérapeutique. Ensuite, nous avons déterminé l'origine des vésicules (membranaire et endosomal). Nous avons également fait des analyses protéomiques et génomiques ainsi que des tests de viabilité cellulaire pour déterminer l'impact des thérapies sur les fonctions cellulaires. Enfin, nous avons transféré les vésicules émises par des cellules cancéreuses sur des cellules endothéliales humaines (HUVEC pour "human umbilical vein endothelial cells"), pour voir quelles sont les conséquences de la présence de ces vésicules dans l'organisme et leur interaction avec d'autres cellules.

Cette étude est née de l'observation d'émission vésicules suite à la photothérapie. C'est un phénomène très impressionnant qui survient quelques minutes à peine après la photo-activation du m-THPC. L'émission de vésicules par chimiothérapie est moins impressionnante et plus lente mais présente tout de même un effet secondaire au traitement à ne pas négliger.

## 5.2 Les traitements anticancéreux

Les deux traitements anticancéreux peuvent être utilisés dans des cas de cancer de la prostate [93, 94]. C'est pourquoi nous avons choisi d'utiliser des cellules issues d'une lignée de cancer prostatique humain (PC3). Les mêmes cellules ont donc été soumises : soit à une photothérapie par activation du m-THPC (FOSCAN), soit à une chimiothérapie par traitement à la doxorubicine. Les modes d'action des deux traitements sont complètement différents. La photothérapie consiste à

activer une molécule photosensible, ce qui a pour conséquence une production massive d'oxygènes singulets, qui sont cytotoxiques. La doxorubicine est, elle, un intercalant de l'ADN et a pour but de ralentir les divisions cellulaires.

### 5.2.1 La photothérapie

Pour le traitement par photothérapie, les cellules ont été incubées à différentes concentrations, 0.02, 0.08, 0.2, 0.5, 2 et 10  $\mu\text{M}$  en m-THPC. Le traitement par photothérapie doit être activé par une énergie lumineuse. Nous avons choisi d'exposer les cellules pendant 5s à une puissance surfacique de  $1,5 \text{ W/cm}^2$ . Nous enregistrons systématiquement une image en fluorescence lors de l'exposition pour observer la localisation intracellulaire du photosensibilisateur ainsi que la corrélation drogue-intensité fluorescente (voir figure 5.1).

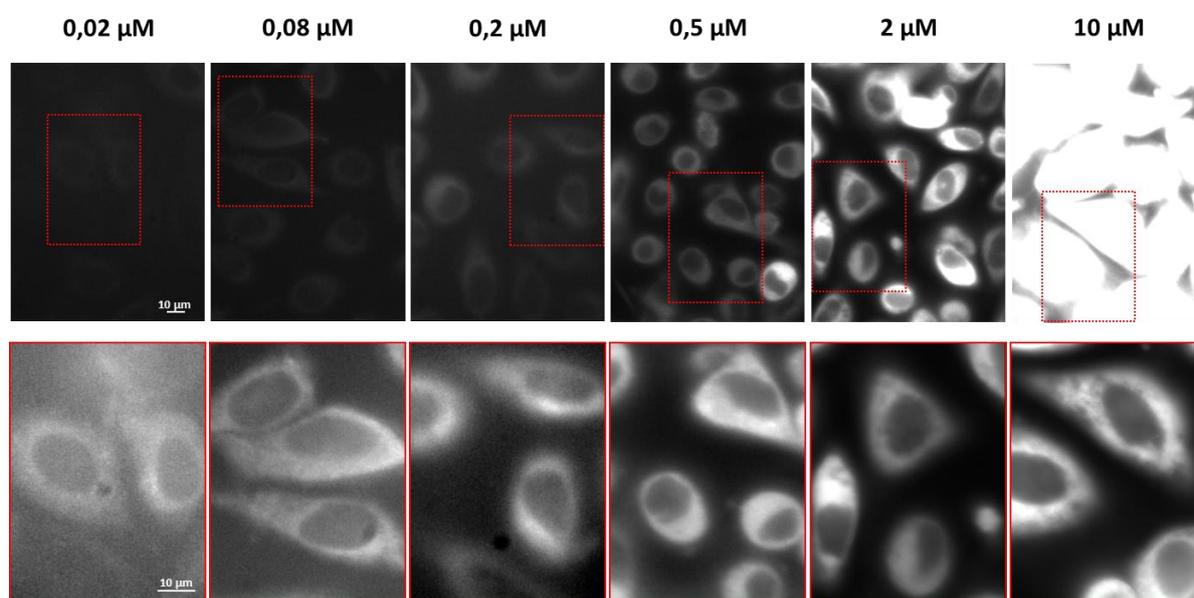


FIGURE 5.1 – Après 2h de marquage et une chasse de la nuit, le m-THPC est localisé de façon homogène dans le cytoplasme mais exclu du noyau. L'émission de fluorescence est proportionnelle à la concentration d'incubation.

La figure 5.1, nous indique qu'après 2h d'incubation et une chasse de la nuit, le m-THPC est distribué de façon homogène dans le cytoplasme (exclu du noyau). L'émission de fluorescence est proportionnelle à la concentration d'incubation.

### 5.2.2 La chimiothérapie

Le même type cellulaire utilisé pour la photo-thérapie a été traité par chimiothérapie avec de la doxorubicine à différentes concentrations : 0.1, 0.5, 2, 5, 10 et 50  $\mu\text{M}$ . Le traitement par chimiothérapie consiste simplement à incuber les cellules avec l'agent thérapeutique. Ce traitement ne nécessite pas d'activation et débute au moment de l'incubation.

A l'inverse du m-THPC, juste après l'incubation, la doxorubicine a une localisation majoritairement vésiculaire et nucléaire (figure 5.2). L'émission de fluorescence est, là aussi, proportionnelle à la concentration d'incubation.

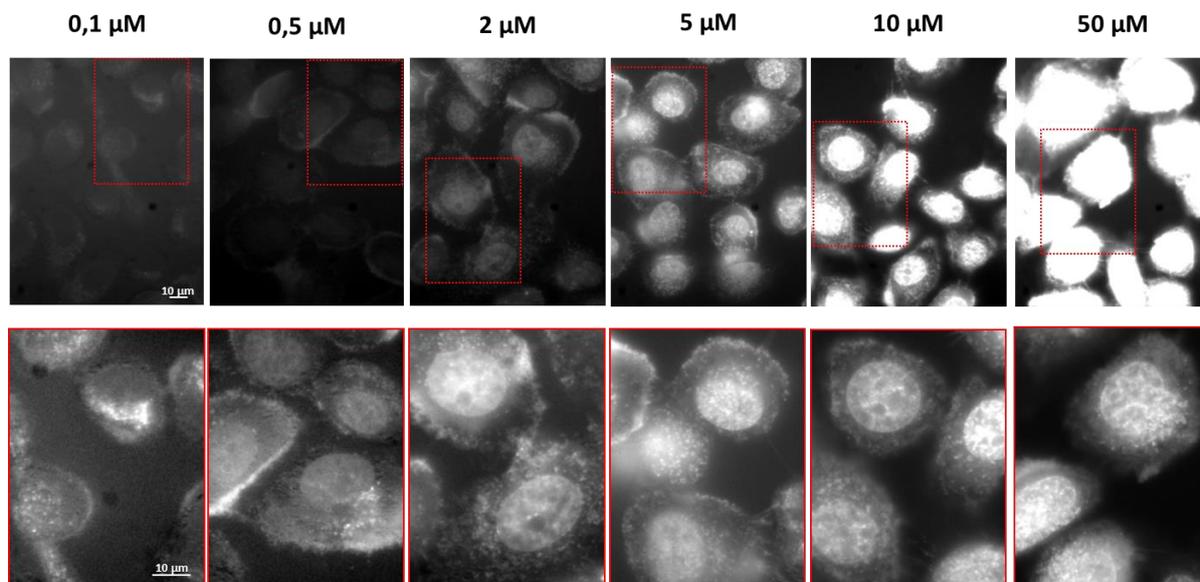


FIGURE 5.2 – Après 2h d’incubation, la doxorubicine est localisée dans les vésicules intracellulaires et dans le noyau. L’émission de fluorescence est proportionnelle à la concentration d’incubation.

### 5.3 La vésiculation : mise en évidence et quantification

Afin de comparer l’émission de vésicules induite par les deux types de traitements, les cellules sont cultivées dans des cuves identiques avec une confluence comparable. Les résultats de quantification des vésicules sont donnés en nombre de vésicules émises par ml.

#### 5.3.1 Par photothérapie

L’émission de vésicules par photothérapie est très rapide et débute dans les quelques minutes qui suivent la photo-activation. Nous avons décidé d’étudier la vésiculation pendant l’heure qui suit le traitement. Pour quantifier le nombre de vésicules émises, nous avons prélevé le milieu dans lequel sont cultivées les cellules traitées au m-THPC, 1h après la photo-activation.

Les images des cellules traitées par photo-thérapie (figure 5.3), nous montrent que la photothérapie induit un changement morphologique des cellules à peine 5 min après l’exposition. 1h après l’exposition, on peut voir, en particulier pour les concentration de 0.08 à 2  $\mu\text{M}$ , que le milieu de culture se trouble par l’apparition de nombreuses vésicules.

Nous avons réalisé des images de microscopie électronique de cellules marquées au m-THPC avant et après la photo-activation (figure 5.4). Avant l’exposition du photosensibilisateur, la membrane des PC3 montre de nombreux replis membranaires. 1h après l’exposition, de nombreuses vésicules se forment à la surface des cellules.

Nous avons marqué la membrane des PC3 avant le traitement par photo-thérapie avec du PKH de sorte que la membrane des vésicules émises par les cellules soit fluorescente. Le milieu de culture est récupéré pour le comptage (1h après la photo-activation). La quantité de vésicules émises n’est pas la même quelle que soit la concentration d’incubation. On voit une nette dépendance de la dose

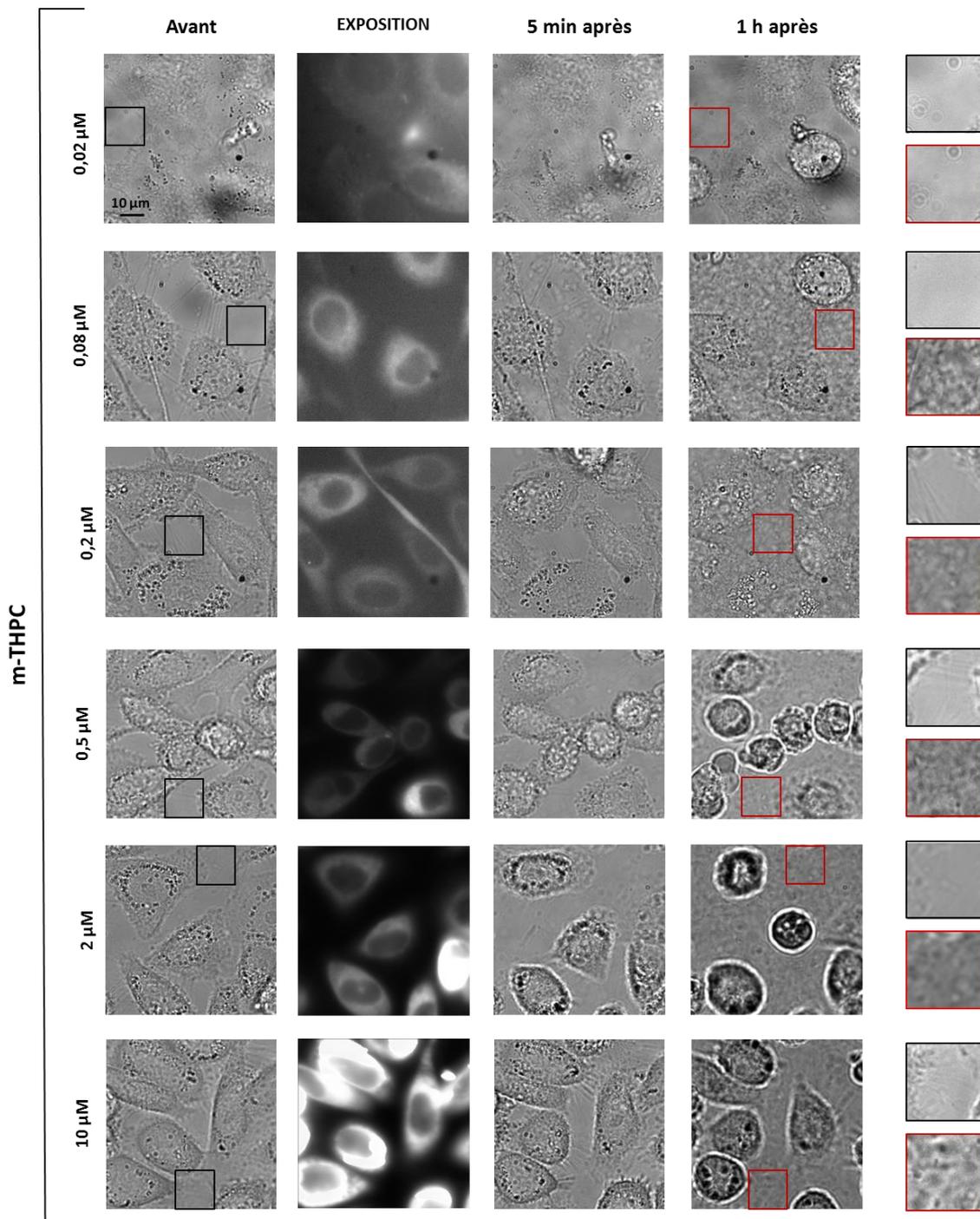


FIGURE 5.3 – PC3 traitées par photo-thérapie. Pour chaque condition une image a été prise avant l'exposition, pendant l'exposition, 5 min et 1h après l'exposition. A la concentration de 0.02 μM, aucune vésicule n'est visible même 1h après l'exposition. Par contre pour les autres conditions, le milieu de culture se trouble, en particulier pour les concentrations allant de 0.08 à 2 μM.

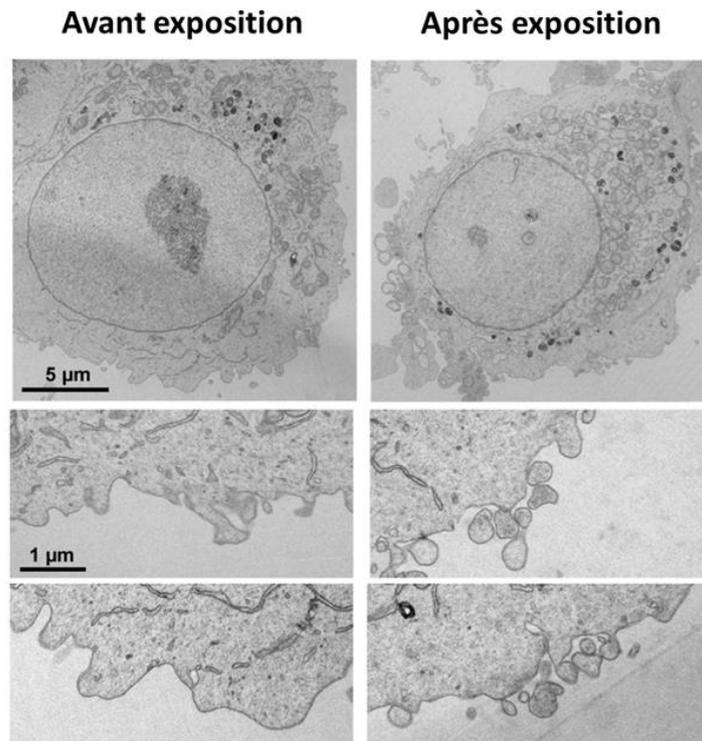


FIGURE 5.4 – Comparaison de cellules marquées au m-THPC avant et 1h après la photo-activation (microscopie électronique). Après l'exposition, on voit apparaître des vésicules qui se forment à la surface des cellules.

sur le nombre de vésicules émises (figure 5.5).

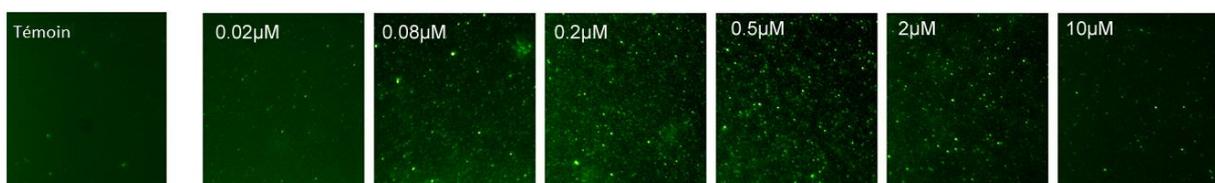


FIGURE 5.5 – Milieu de culture de cellules traitées au m-THPC et dont la membrane a été marquée en vert (PKH-67) récupéré 1h après la photo-activation. Le nombre de vésicules émises dépend de la concentration en m-THPC à laquelle les cellules ont été incubées.

Nous avons mesuré la quantité de vésicules émises par des cellules traitées par photo-thérapie 1h après la photo-activation. Les résultats en fonction de la dose de traitement sont donnés en millions de vésicules par mL (figure 5.6). De façon surprenante, la quantité de vésicules émises n'est pas proportionnelle à la concentration en agent thérapeutique. Mais un maximum de vésiculation est atteint pour une concentration intermédiaire et assez faible de 0.5  $\mu\text{M}$ .

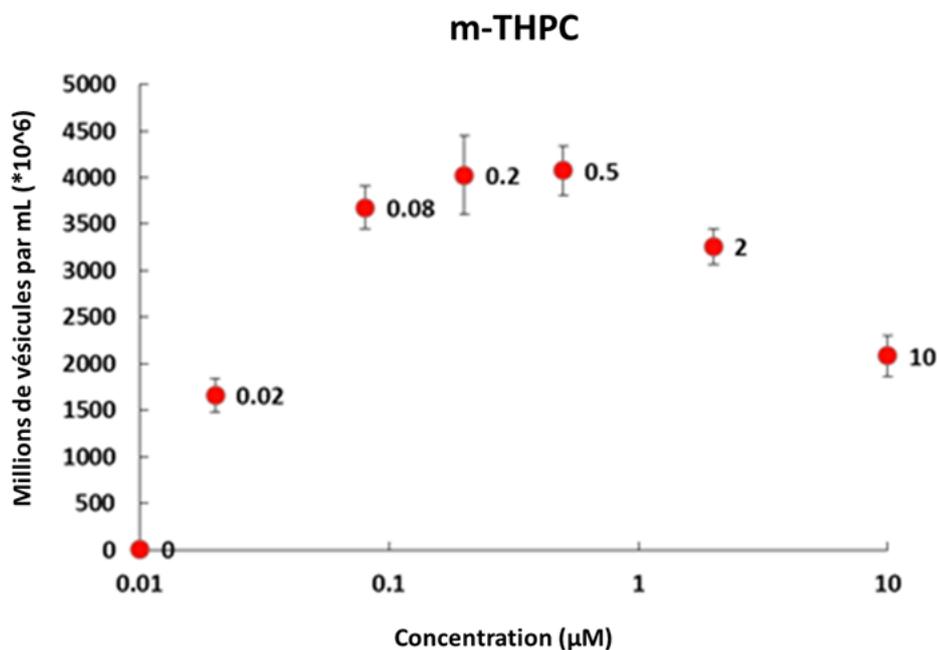


FIGURE 5.6 – Quantification du nombre de vésicules émises en fonction de la dose en photosensibilisateur. Le nombre de vésicules émises n'est pas proportionnel à la concentration en m-THPC mais est maximal pour une concentration assez faible de 0.5  $\mu\text{M}$ .

### 5.3.2 Par chimiothérapie

Dans le cas de la doxorubicine, le processus de vésiculation est plus lent et ne commence à apparaître que quelques heures après l'incubation. Pour les cellules traitées avec de la doxorubicine, nous avons donc décidé de prélever le milieu de culture 24h après le traitement. Nous avons fait des images en microscopie optique (figure 5.7) et électronique (figure 5.8).

L'émission de vésicules après un traitement par doxorubicine est moins importante que celle qui a lieu après une photo-thérapie. Des cellules traitées à 10  $\mu\text{M}$  de doxorubicine (voir figure 5.7) changent de morphologie après 24h, mais il est difficile de distinguer les vésicules. Par contre lorsque la membrane des cellules est marquée au PKH (vert) (voir figure 5.7), on peut voir, 24h après l'incubation, des vésicules vertes qui apparaissent dans le milieu. Les images de microscopie électronique (figure 5.8), nous confirment que 24h après un traitement à 2  $\mu\text{M}$  de doxorubicine, les cellules émettent des vésicules. Le traitement à 50  $\mu\text{M}$  est beaucoup plus agressif pour les cellules, les images de microscopie électronique nous montrent des cellules dont la structure n'est pas celle de cellules normales.

La vésiculation par traitement chimiothérapeutique est plus difficile à mettre en évidence sur les images, car elle est moins visible que celle par photo-thérapie et nécessite une durée beaucoup plus longue (24h). Néanmoins, nous avons quantifié le nombre de vésicules contenu dans le milieu de culture des cellules 24h après le traitement par doxorubicine (de la même façon que pour le m-THPC). Les résultats sont donnés figure 5.9. Ici aussi, la quantité de vésicules émises n'est pas proportionnelle à la concentration en doxorubicine. On atteint un maximum pour une dose

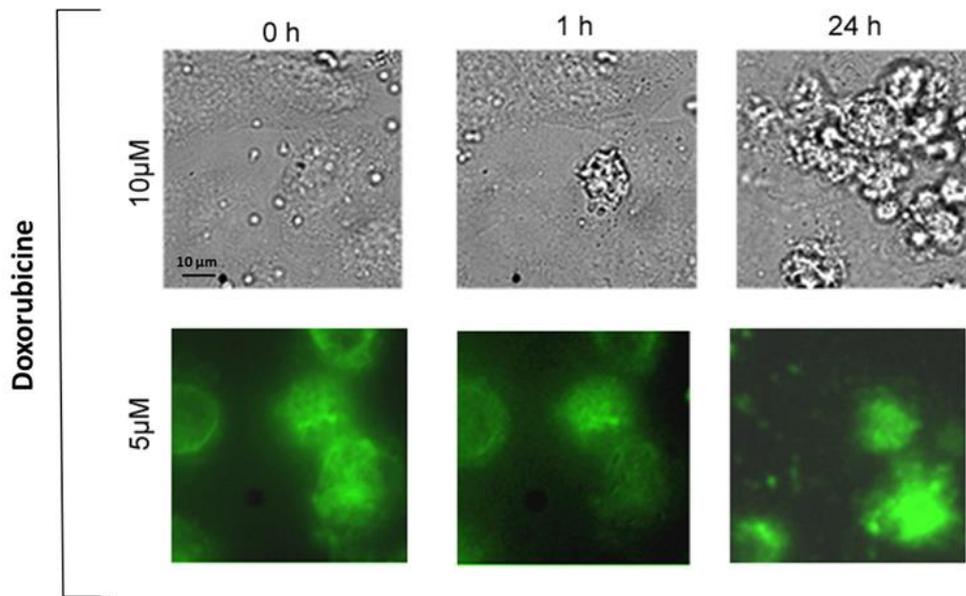


FIGURE 5.7 – Emission de vésicules suite à un traitement par doxorubicine à 5 ou 10  $\mu\text{M}$ . Les images ont été prises juste après l'incubation, 1h après et 24h après. Pour la condition à 5  $\mu\text{M}$ , la membrane des cellules traitées a été marquée au PKH. A 24h on voit apparaître des vésicules vertes dans le milieu.

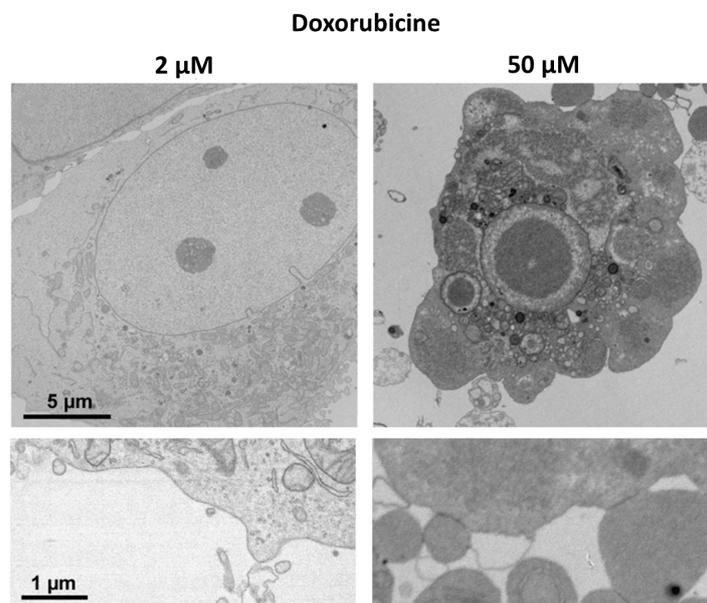


FIGURE 5.8 – Cellules traitées à la doxorubicine à 2 et 50  $\mu\text{M}$ , 24h après l'incubation (microscopie électronique). On peut voir quelques vésicules à la membrane des cellules incubées à 2  $\mu\text{M}$ . Les cellules incubées à 50  $\mu\text{M}$  semblent être explosées, donnant naissance à des débris cellulaires plutôt qu'à des vésicules.

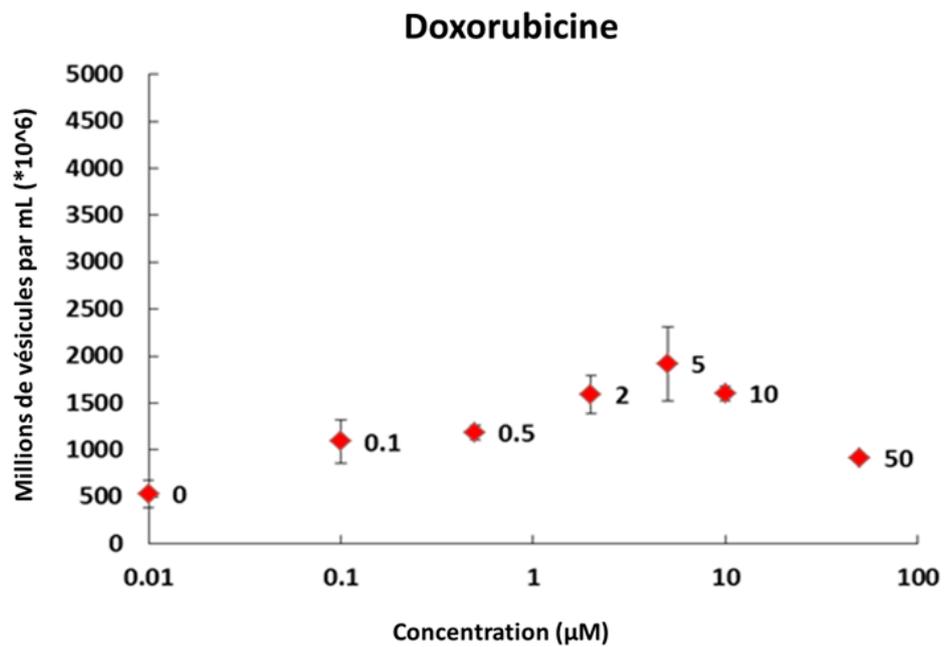


FIGURE 5.9 – Quantification du nombre de vésicules émises en fonction de la dose en agent chimiothérapeutique. Le nombre de vésicules émises n'est pas proportionnel à la concentration en doxorubicine mais est maximal pour une concentration intermédiaire de 5  $\mu\text{M}$ .

intermédiaire, qui correspond à une concentration plutôt faible de 5  $\mu\text{M}$ .

## 5.4 Effet thérapeutique

Pour les deux types de traitements, la vésiculation est maximale pour des doses faibles. Pour déterminer quels étaient les effets thérapeutiques de ces doses et pour toute la gamme de concentration dans laquelle nous nous sommes placés pour la quantification, nous avons réalisé différents tests : des tests d'activité métabolique (Alamar blue), qui permettent de mesurer la viabilité cellulaire; des tests d'apoptose, par visualisation directe (Annexine V) ou analyse indirecte. Cette dernière a été réalisée à la fois par l'analyse protéomique des voies de signalisation de l'apoptose, et par l'analyse des gènes du stress oxydant, une des voies possibles d'apoptose.

### 5.4.1 Viabilité cellulaire

Même si la vésiculation dans le cas du traitement par photo-thérapie est étudiée pendant l'heure qui suit le traitement, nous avons étudié l'aspect général des cellules sur 24h (figure 5.11) et réalisé des tests de viabilité cellulaire 24h après les 2 traitements (figure 5.10). Les images prises juste après les traitements (c'est-à-dire après l'exposition pour le m-THPC ou après 2h d'incubation avec la doxorubicine), ou après 8h ou 24h sont montrées figure 5.11.

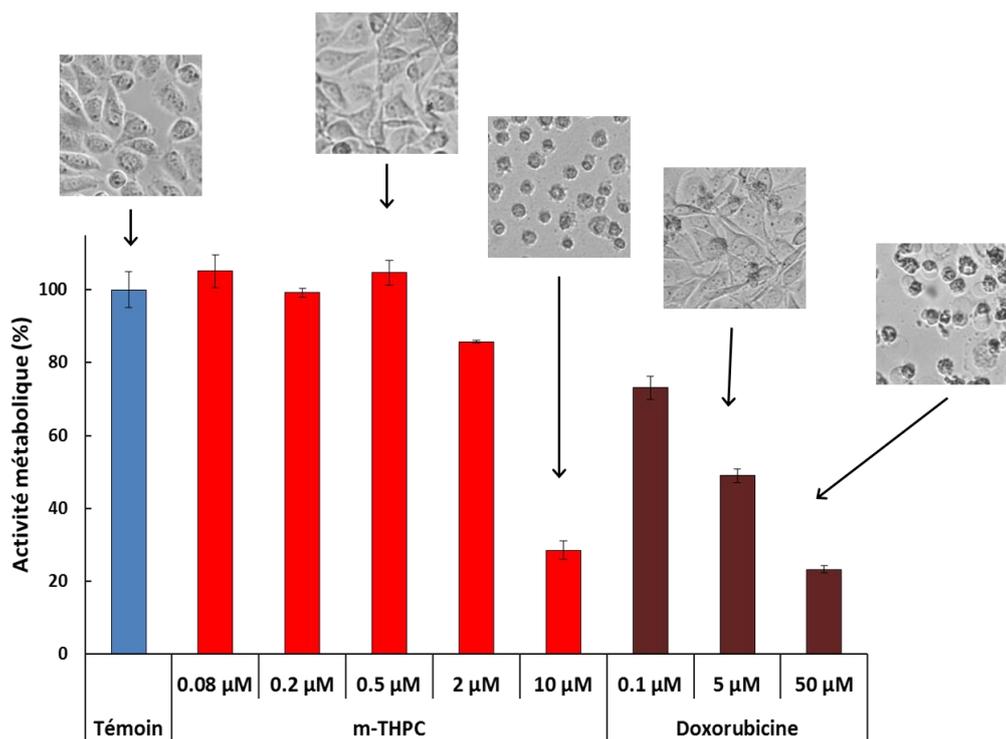


FIGURE 5.10 – Mesures de viabilité cellulaire avec le test d'Alamar. Pour le m-THPC, le traitement à des concentrations inférieures à 2  $\mu\text{M}$  n'affecte pas l'activité métabolique des cellules. A 2  $\mu\text{M}$ , la viabilité cellulaire est de 80% et diminue jusqu'à 30% pour une concentration en m-THPC de 10  $\mu\text{M}$ . Pour la doxorubicine, la viabilité cellulaire est inversement proportionnelle à la concentration d'incubation en doxorubicine.

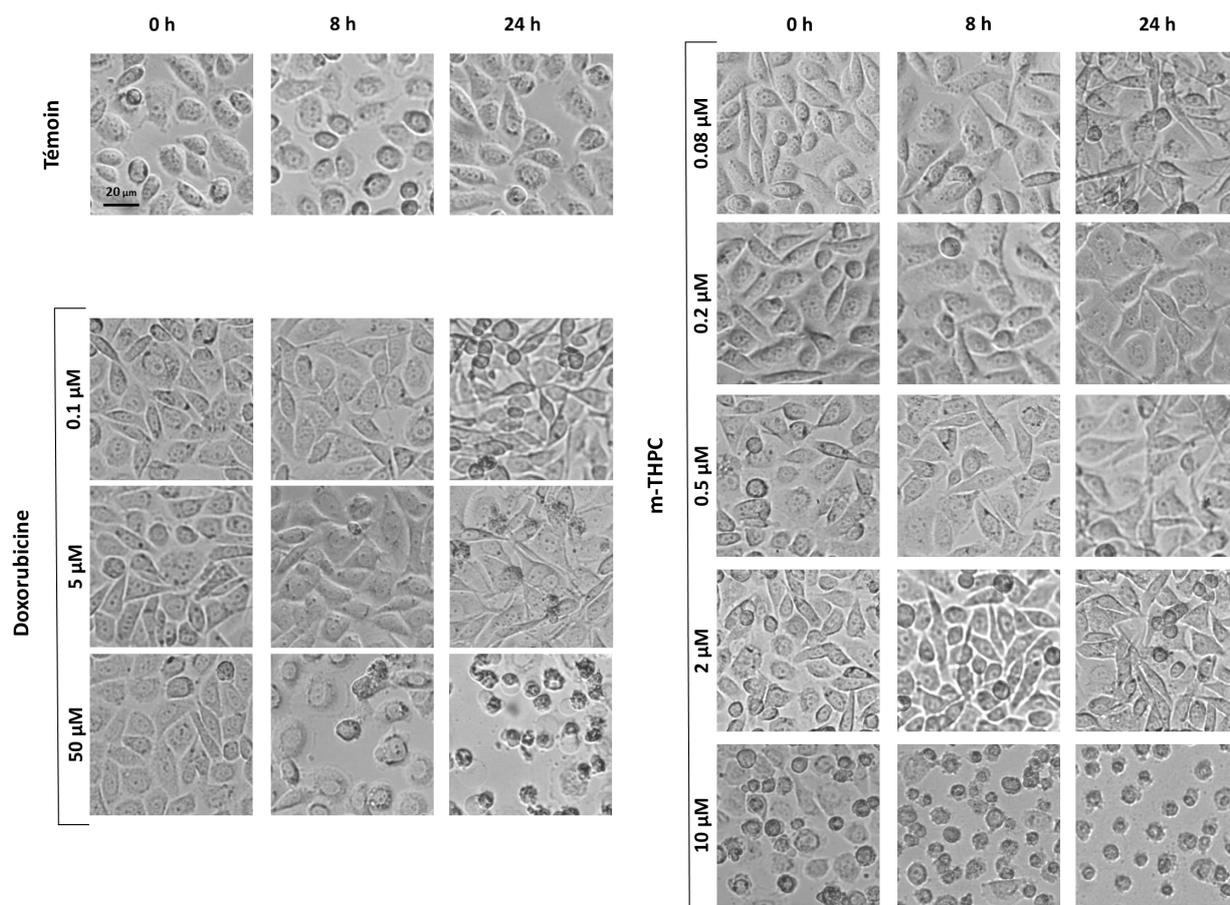


FIGURE 5.11 – Aspect des cellules après traitement. La morphologie des cellules reste inchangée, excepté pour les conditions fortes, c'est-à-dire 50  $\mu\text{M}$  pour la doxorubicine et 10  $\mu\text{M}$  pour le m-THPC.

Pour les conditions les plus fortes, c'est-à-dire 10  $\mu\text{M}$  pour le m-THPC et 50  $\mu\text{M}$  pour la doxorubicine, on observe que les cellules s'arrondissent dès 8h après le traitement par la doxorubicine et immédiatement après l'exposition pour les cellules traitées au m-THPC.

Une bonne corrélation entre l'aspect des cellules après 24h et les résultats du test d'Alamar Blue (figure 5.10) a été mise en évidence.

Dans le cas du m-THPC, l'activité métabolique des cellules traitées est intacte pour les concentrations inférieures à 2  $\mu\text{M}$ . A la concentration forte de 10  $\mu\text{M}$  la mortalité cellulaire est de plus de 70%. Il est intéressant de noter qu'à la concentration optimale pour la vésiculation, qui est de 0.5  $\mu\text{M}$  en m-THPC, l'effet thérapeutique sur les cellules est non existant.

Dans le cas de la doxorubicine, la mortalité cellulaire est proportionnelle à la concentration d'incubation. A la concentration optimale pour la vésiculation (5  $\mu\text{M}$ ), le taux de viabilité cellulaire est de 50%. Même à faible concentration la doxorubicine agit sur l'activité métabolique des cellules.

### 5.4.2 Annexine V (apoptose)

Dans le cas du traitement au m-THPC à la concentration de  $0.5 \mu\text{M}$ , nous avons observé que la morphologie des cellules était rapidement modifiée suite à la photo-activation. Quelques minutes après la photo-activation, les cellules s'arrondissent et semblent être en souffrance. Cependant cet effet est réversible, car à la fin de l'heure, elles ont une morphologie comparable à des cellules saines et leur activité métabolique n'est pas modifiée après 24h. La vésiculation peut être liée au phénomène d'apoptose. Nous avons donc voulu vérifier si les cellules traitées par photo-thérapie montraient des signes d'apoptose.

Pour ce faire, nous avons marqué les cellules avec de l'annexine V (figures 5.12 et 5.13), qui se lie aux phospholipides de la membrane lorsque les cellules sont dans un état apototique (forte affinité pour la phosphatidylsérine, qui se retrouve exposée sur la face externe de la membrane plasmique pendant les premières phases de l'apoptose).

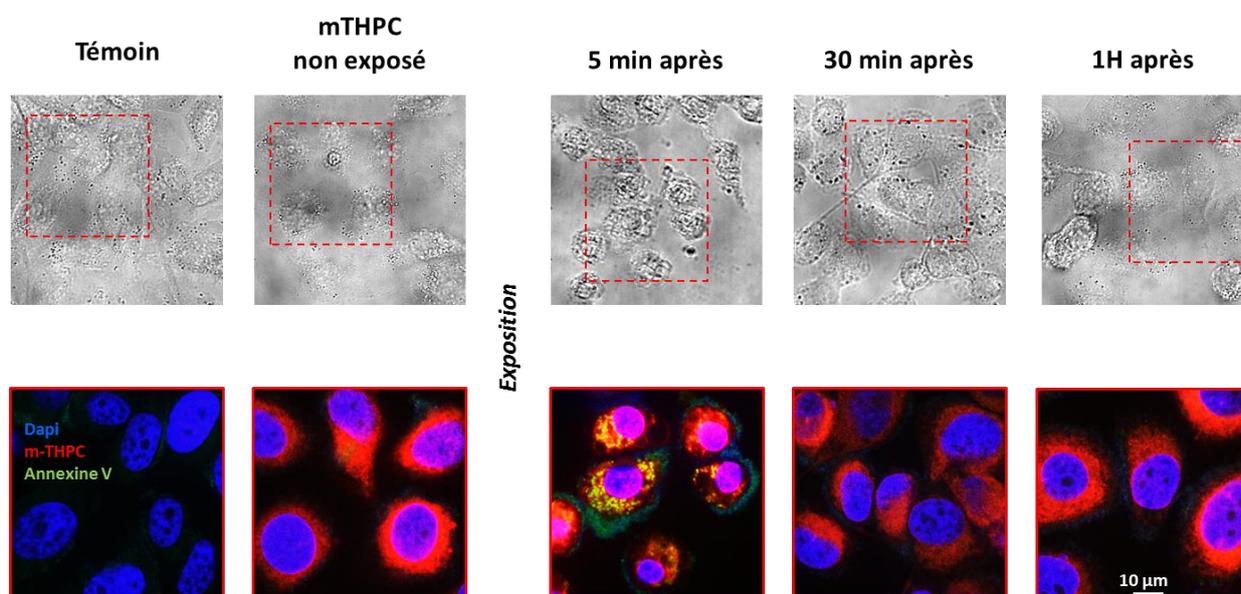


FIGURE 5.12 – Test à l'annexine V. Des cellules à différents stades (témoin, marquées ( $0.5 \mu\text{M}$ ) mais non exposées, exposées après 5 min, 30 min et 1h) ont été marquées à l'annexine V (vert). Le noyau a été marqué au Dapi (bleu). Le rouge est la couleur d'émission du m-THPC. Les cellules sont positives à l'annexine V seulement 5 min après l'exposition. A 5 min, les cellules sont rondes puis elles récupèrent progressivement, comme le montrent les images à 30 min et 1h.

5 min après l'exposition, les cellules sont arrondies et sont positives à l'annexine V, signature de l'initiation de l'apoptose. Ce changement de morphologie est accompagné par l'apparition de "blebs" membranaires, comme on peut le voir sur la figure 5.13. Mais ce phénomène semble être complètement réversible, car à 30 min et 1h les cellules ne sont plus annexine-positives et elles retrouvent une morphologie similaire au témoin ou aux cellules non-exposées.

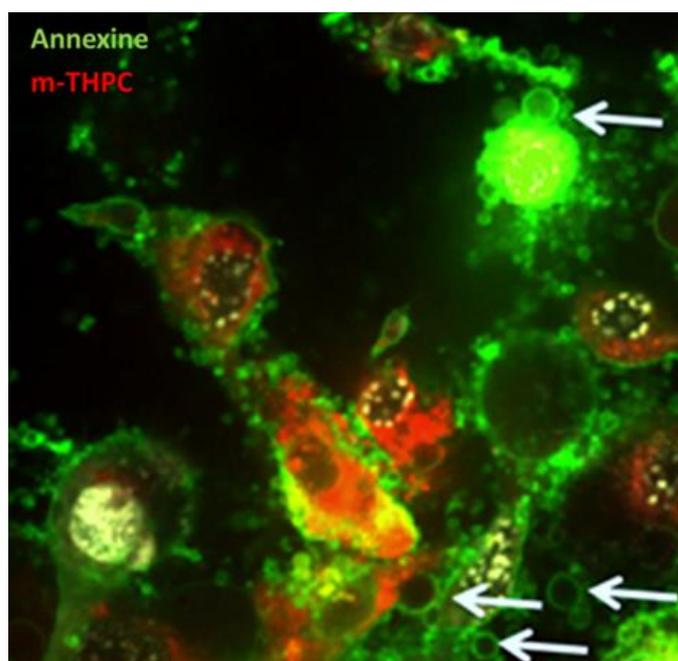


FIGURE 5.13 – Cellules traitées avec du m-THPC à 0.5  $\mu\text{M}$  juste après l'exposition. De nombreux "blebs" se forment à la surface des cellules de façon très rapide.

### 5.4.3 Analyse protéomique de l'apoptose

Pour quantifier le niveau d'expression des protéines impliquées dans l'apoptose après les différents traitements, nous avons utilisé un kit Proteome Profiler Array. Ce kit permet d'analyser d'un coup 35 protéines impliquées dans la voie de signalisation de l'apoptose. Le même test a été réalisé 5 min et 30 min après traitement. Les mesures ont été effectuées pour chaque temps avec des cellules non-traitées (témoin), incubées avec le m-THPC mais non exposées, traitées avec du m-THPC (0.5  $\mu\text{M}$ , photo-activé) ou traitées avec de la doxorubicine (5  $\mu\text{M}$ ). Le niveau de chaque protéine est calculé par rapport à celui mesuré dans le témoin (PC3 non traitées), qui représente le niveau de base (100%). Les 35 protéines dont l'expression a été mesurée, sont réparties dans trois différentes voies d'activation de l'apoptose. Un bref rappel de ces voies est donné ci-après.

#### Présentation générale des voies d'activation de l'apoptose

Le mécanisme de l'apoptose est gouverné par 3 voies d'activation :

- la voie intrinsèque, qui met en jeu la mitochondrie et les super-familles des Bcl (Bcl-2 et Bcl-x, anti-apoptotiques) et des Bax (Bax, Bad et Bid, pro-apoptotiques), qui lors d'un stress peuvent provoquer l'ouverture des super-pores de la mitochondrie et induire la libération du cytochrome c et de SMAC/Diablo. Ces protéines une fois libérées peuvent activer la cascade des caspases et conduire au clivage de la caspase-3 induisant l'apoptose de la cellule.
- la voie extrinsèque, qui implique des récepteurs appartenant à la famille des facteurs de nécrose tumorale (TNF) comme FADD et Fas ou TRAIL R2. Cette voie rejoint la voie intrinsèque au niveau de la cascade des caspases.
- la voie caspase-indépendante, qui implique l'activation des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS

pour "reactive oxygen species").

Ces 3 voies conduisent toutes à l'apoptose de la cellule, et même si elles sont bien différenciées, elles ne sont pas complètement indépendantes les unes des autres.

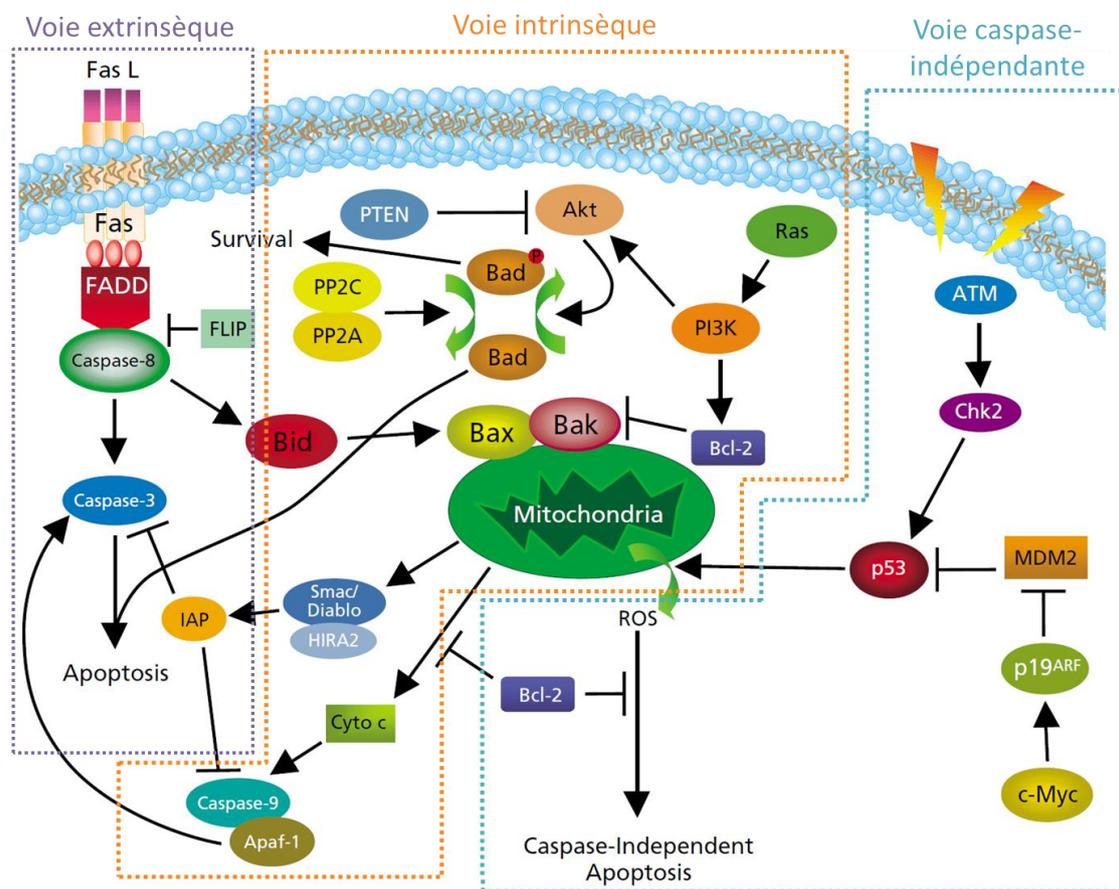


FIGURE 5.14 – Voie de signalisation de l'apoptose. Trois voies d'activation : la voie extrinsèque, la voie intrinsèque et la voie caspase-indépendante (issu de [95]).

## Résultats

Aucune variation significative d'expression protéique liée à l'apoptose n'a été observée dans les cellules 5 min après les traitements, excepté pour le traitement au m-THPC (photo-activé ou non) où le cytochrome c est augmenté d'un facteur 1.3. Cet effet dû à la PDT semble être transitoire car un retour au niveau de base est observé 30 min après le traitement.

Le m-THPC seul, sans photo-activation, n'a pas d'effet sur l'apoptose excepté sur la voie caspase-indépendante, pour laquelle on observe une légère augmentation du phospho-p53 (140%). Cette protéine pro-apoptotique est produite par la cellule en réponse à un stress cellulaire. Dans notre cas, c'est l'internalisation du m-THPC (sans photo-activation), qui déclenche le stress cellulaire.

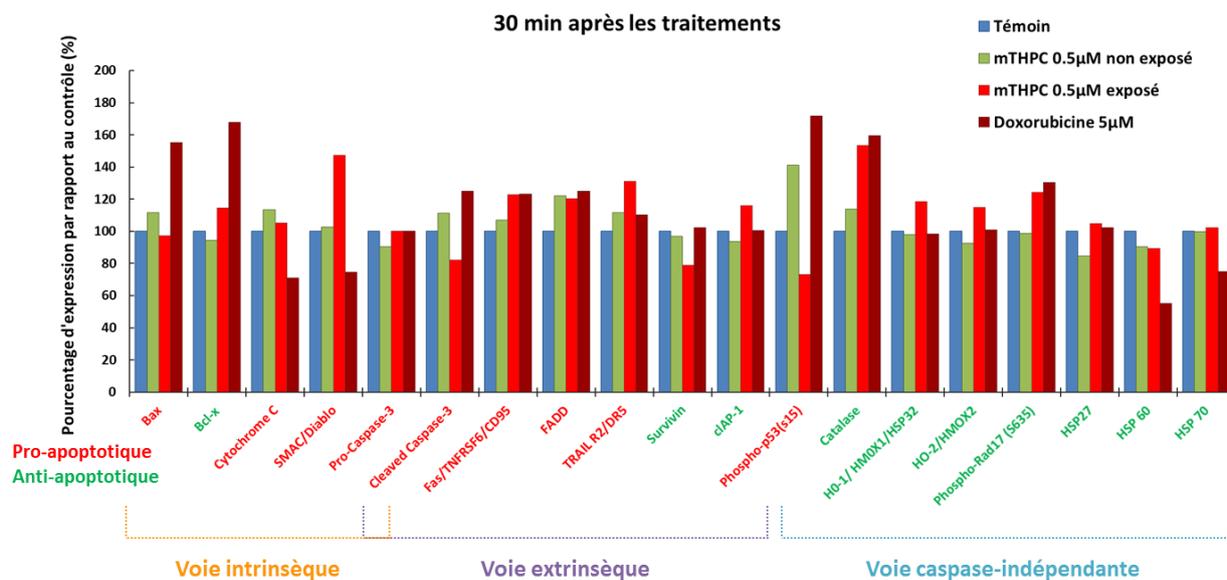


FIGURE 5.15 – Résultats des analyses protéomiques de l’apoptose 30 min après les traitements. Les protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques sont respectivement notées en rouge et en vert.

Les résultats de la figure 5.15, montrent que la photo-activation du m-THPC ne déclenche pas de réaction d’apoptose par la voie intrinsèque après 30 min. En effet, aucune variation n’est observée dans l’expression des protéines de la famille pro-apoptotique des Bax, malgré une augmentation de l’expression de SMAC/Diablo avec en parallèle une diminution de la survivine, protéine inhibitrice de l’apoptose (IAP). Cependant l’augmentation de SMAC/Diablo et la diminution de la survivine n’aboutissent pas au clivage de la caspase-3. Par la voie extrinsèque, on note des variations de certaines protéines, notamment l’augmentation de l’expression des récepteurs FADD, Fas et TRAIL-R2. Ces modifications devraient déclencher l’activation de la cascade des caspases et conduire au clivage de la caspase-3, cependant ce n’est pas le cas. Probablement que les variations observées sont trop faibles pour conduire à une apoptose, les cellules se retrouvent dans une apoptose réversible ne conduisant finalement pas à la mort cellulaire. Par la voie caspase-indépendante, on observe une diminution de l’expression de la phospho-p53 avec en parallèle une augmentation de l’expression de la catalase. La protéine pro-apoptotique phospho-p53 est produite lorsque les cellules subissent des agressions et induit l’apoptose des cellules par la voie des ROS. Alors que la catalase est une protéine anti-apoptotique aux propriétés anti-oxydantes, qui transforme les molécules de  $H_2O_2$ , très réactives, en molécules de  $O_2$  et de  $H_2O$ , inoffensives. Globalement la photo-thérapie induit une faible activation de l’apoptose par la voie extrinsèque, qui est contrée par une variation de plusieurs protéines de la voie caspase-indépendante par l’augmentation d’une protéine anti-apoptotique (catalase) et la diminution d’une protéine pro-apoptotique (phospho-p53). Les variations observées restant faibles, la PDT ne déclenche pas d’apoptose à cette dose (0.5  $\mu M$ ) et à ces temps d’observation (30 min après photo-activation).

Dans le cas de la doxorubicine, les résultats (figure 5.15) apparaissent incohérents. Le traitement semble déclencher un dérèglement à tous les niveaux, que ce soit dans la voie intrinsèque, extrinsèque ou la voie caspase-indépendante. En ce qui concerne la voie intrinsèque, le niveau

des protéines pro- (Bax) et anti-apoptotiques (Bcl) augmente dans les mêmes proportions, tandis que l'expression du cytochrome-C et de SMAC/diablo diminuent. Les variations observées dans la voie extrinsèque semble un peu plus cohérentes : on observe une augmentation des récepteurs FADD/Fas, avec une surexpression de la caspase-3 clivée, qui conduit à l'apoptose des cellules. Concernant la voie caspase-indépendante, nous avons observé une augmentation de la catalase - protéine anti-apoptotique -, ainsi qu'une augmentation de la phospho-p53 - protéine pro-apoptotique (activation de la production des ROS)-. Le traitement par doxorubicine semble donc déclencher un début d'apoptose 30 min après l'incubation, mais une durée de 30 min après le traitement est insuffisante pour montrer une apoptose complète.

La famille des protéines chaperonnes (HSP pour "heat shock proteins") est impliquée dans les réponses à des perturbations telles que des augmentations de la température mais aussi des variations de pH, de concentrations, etc... HSP 60 et 70 subissent des modifications avec les deux traitements : HSP 60 diminue dans les deux cas et HSP 70 diminue après traitement par la doxorubicine. Leur fonction est de protéger et de maintenir la régulation des protéines nécessaires à la survie des cellules. Lorsque ces protéines sont sous-exprimées, les traitements thérapeutiques ont tendance à impacter les cellules de manière plus significative [96]. Les diminutions observées sont donc plutôt positives vis-à-vis de l'effet thérapeutique des traitements.

L'ensemble de ces résultats montrent que la doxorubicine a un effet pro-apoptotique plus important que l'activation du m-THPC 30 min après les traitements. Cependant dans les deux cas, nous avons observé des variations d'expression protéique dans la voie caspase-indépendante, qui implique la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), directement liés au stress oxydant.

#### 5.4.4 Analyse génique du stress oxydant

Nous avons également regardé l'expression des gènes du stress oxydant avec un PCR Array. C'est une technique qui nous a permis d'évaluer rapidement l'expression de 84 gènes en relation avec la voie de signalisation du stress oxydant. Nous avons réalisé le test sur des cellules traitées de la même façon que celles pour l'analyse protéomique à 30 min, c'est-à-dire des cellules incubées avec du m-THPC (0.5  $\mu$ M), des cellules traitées au m-THPC (0.5  $\mu$ M, photo-activé) ou à la doxorubicine (5  $\mu$ M). L'expression de chaque gène est normalisée par rapport à des gènes de référence dont l'expression est inchangée. Le niveau d'expression est ensuite calculé par rapport au témoin (T- : cellules PC3 non traitées).

#### Présentation générale du stress oxydant

Dans une cellule saine les éléments anti-oxydants (rôle de protection) s'équilibrent avec les éléments pro-oxydants (rôle de dégradation). Lorsque cet équilibre est perturbé en faveur des espèces oxydantes, des phénomènes en cascades ont lieu soit pour rétablir l'équilibre et garantir la survie de la cellule, soit pour accentuer ce déséquilibre et conduire à la mort cellulaire. Toute cette machinerie est appelée stress oxydant. L'augmentation du nombre d'espèces oxydantes conduit à l'apparition de nombreuses espèces hautement réactives, telles que des radicaux libres ou des espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui sont potentiellement néfastes pour les cellules. Le rôle des anti-oxydants est alors de protéger la cellule contre les effets des radicaux libres en détoxifiant la cellule ou en réparant les dommages causés par les espèces réactives. On trouve en particulier 3 classes d'enzymes anti-oxydantes : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx).

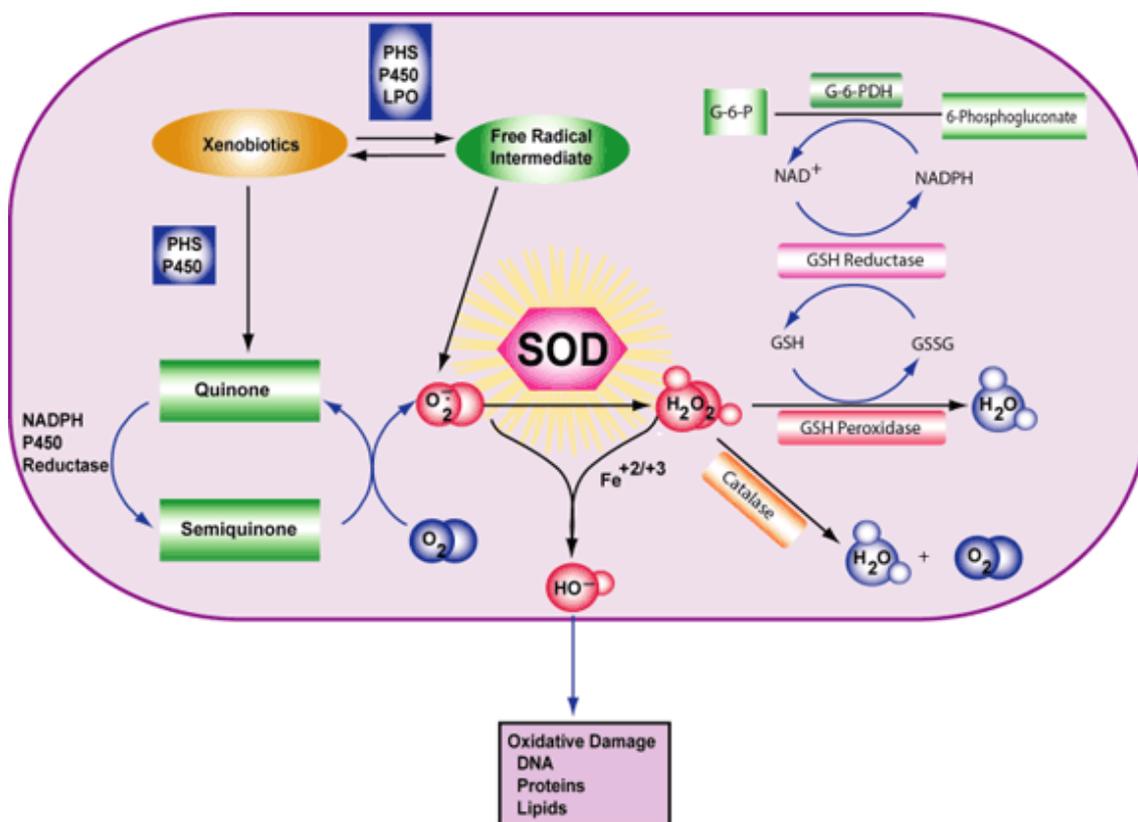


FIGURE 5.16 – Schéma du stress oxydant [97].

## Résultats

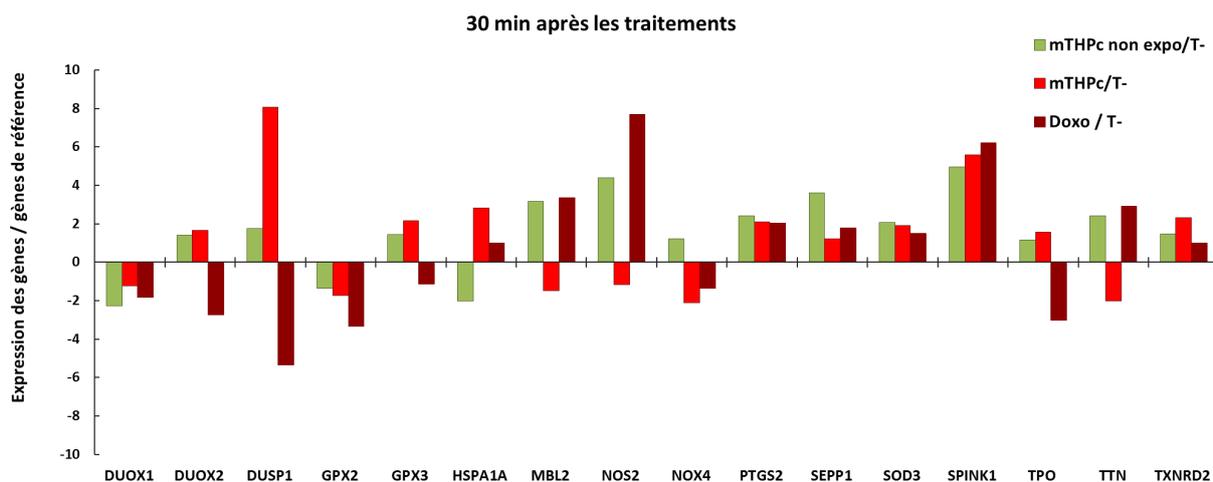


FIGURE 5.17 – Résultats des analyses génomiques du stress oxydant 30 min après les traitements.

Nous avons testé 84 gènes, mais seuls les gènes montrant une variation dans au moins une des conditions sont représentés figure 5.17. Les valeurs correspondent au rapport entre le taux d'expression mesuré dans la condition choisie (m-THPC non exposée, m-THPC ou doxorubicine) et celui mesuré avec le contrôle (T- : PC3 non traitées).

Dans le cas du m-THPC, DUSP1 est sur-exprimé (8X). C'est un gène connu pour être sous-exprimé dans les cas de cancers de la prostate [98]. De manière plus générale, il est exprimé en réponse à un stress oxydant et a pour rôle d'inactiver les MAPK qui induisent l'expression de nombreux médiateurs pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , interleukin 1 $\beta$ ). Dans le cas de la doxorubicine, il est nettement sous-exprimé, ce qui permet une libération des cytokines et une activation des phénomènes inflammatoires, qui induisent l'apoptose.

Plusieurs gènes comme des anti-oxydants interviennent dans le stress oxydant comme protecteurs de la cellule. Nous avons mesuré en particulier l'expression de 3 d'entre eux : MBL2, NOS2 et SEPP1. L'internalisation du m-THPC, perçu par la cellule comme un corps étranger, induit une réponse de protection par ces 3 gènes antioxydants. Contrairement à nos attentes, cette augmentation n'est plus observée lorsque le m-THPC est photo-activé. Une sur-expression de ces 3 gènes anti-oxydants est également observée dans les cellules traitées par la doxorubicine. Il existe d'autres gènes de défense exprimés par la cellule, comme GPX2/3 et HSPA1A. Globalement l'expression de la famille des GPX ne bouge pas, quel que soit le traitement excepté une légère sous-expression dans le cas du traitement par doxorubicine. Dans le cas du gène HSPA1A, impliqué dans la production de la HSP70 (heat shock protein), seule une légère sur-expression est observée lors de l'exposition du m-THPC.

A l'opposé, il existe des gènes impliqués dans la formation de radicaux libres oxygénés ou iodés, DUOX2 ou TPO respectivement, qui orientent les cellules vers l'apoptose. Le profil d'expression de ces deux gènes est identique : une sous-expression après le traitement à la doxorubicine.

SPINK1 est un gène un peu particulier, car il est un marqueur de certains cancers dont celui de la prostate. Il est en particulier sur-exprimé dans les cas des cancers agressifs [99, 100]. Quelque soit le traitement m-THPC non exposé, m-THPC ou doxorubicine, ce gène est sur-exprimé. Il semble que les traitements induisent une réponse de défense pour la survie de la cellule tumorale visant à contrer le traitement anti-cancéreux.

Aucune forte variation de l'expression des gènes de la voie de signalisation du stress oxydant n'est observée, excepté pour DUSP1 après la photo-activation du m-THPC. Il semblerait donc qu'aux temps court (30 min après les traitements) le stress oxydant ne soit pas la voie majoritaire d'apoptose. Peut-être qu'à 24h la réponse au stress oxydant serait plus importante.

## 5.5 Origine des vésicules

Nous avons voulu déterminer la provenance des vésicules afin de pouvoir émettre des hypothèses sur leur contenu. Nous avons élaboré un protocole nous permettant de savoir si les vésicules émises étaient produites à la membrane plasmique ou si elles correspondaient à une exocytose de matériel contenu dans le cytoplasme. Pour cela nous avons fait intervenir des nanoparticules magnétiques. Suivant la durée du marquage et la durée entre le marquage et la photo-activation, les nanoparticules ont différentes localisations. Juste après le marquage magnétique, les nanoparticules sont adsorbées à la membrane plasmique et n'ont pas encore été internalisées par les cellules. Après une dizaine d'heures, elles se retrouvent complètement internalisées et sont localisées dans les endosomes et les lysosomes. Nous avons exposé des cellules juste après le marquage magnétique (condition membranaire) ou une nuit après le marquage (condition intracellulaire).

Une heure après l'exposition, le milieu de culture est récupéré et nous avons déterminé, à l'aide d'une chambre de micromagnétophorèse, si les vésicules émises par les cellules étaient magnétiques ou non. Les images de la micromagnétophorèse (figure 5.18) nous informent que les vésicules émises par des cellules, où des nanoparticules ont une localisation membranaire, sont magnétiques. Il en est de même pour celles émises par des cellules où les nanoparticules sont dans des vésicules d'endocytose. Ceci met en évidence le fait que les vésicules contiennent du matériel intracellulaire provenant de cellules tumorales traitées, matériel qui peut être d'origine protéique ou génique (ADN, ARN). Un fait encore plus surprenant est que, quelle que soit l'origine des vésicules (intracellulaire ou membranaire), elles contiennent du photosensibilisateur. Cette exocytose de l'agent thérapeutique est négative vis-à-vis de la thérapie car elle permet aux cellules tumorales de diminuer la concentration intracellulaire en photosensibilisateur limitant ainsi les effets thérapeutiques.

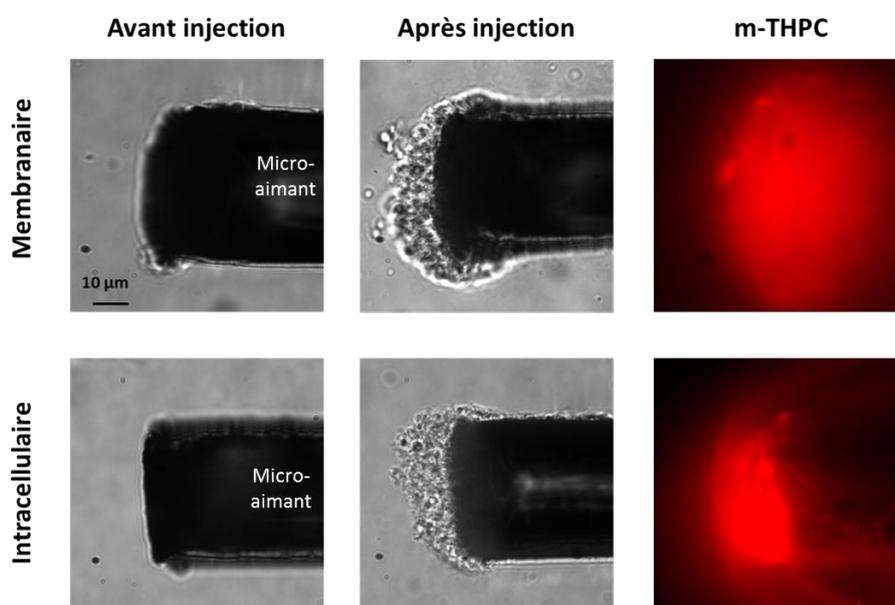


FIGURE 5.18 – Les vésicules émises suite à la photo-activation ( $0.5 \mu\text{M}$  de m-THPC) correspondent à la fois à des vésicules produites au niveau de la membrane plasmique et à des vésicules d'endocytose exocytées. Les images en fluorescence nous apprennent que les vésicules émises contiennent du photosensibilisateur.

Avec le même système nous avons préparé des échantillons pour réaliser des images de microscopie électronique. Pour préserver les vésicules des différents rinçages, nous avons placé un aimant en dessous de l'échantillon, de sorte que les vésicules magnétiques soient incluses avec les cellules dans la résine. Dans les cellules marquées en agent photosensible mais non exposées, des nanoparticules ont été endocytées et sont complètement internalisées. Dans les mêmes conditions et après photo-activation, on observe du matériel magnétique dans les vésicules exocytées.

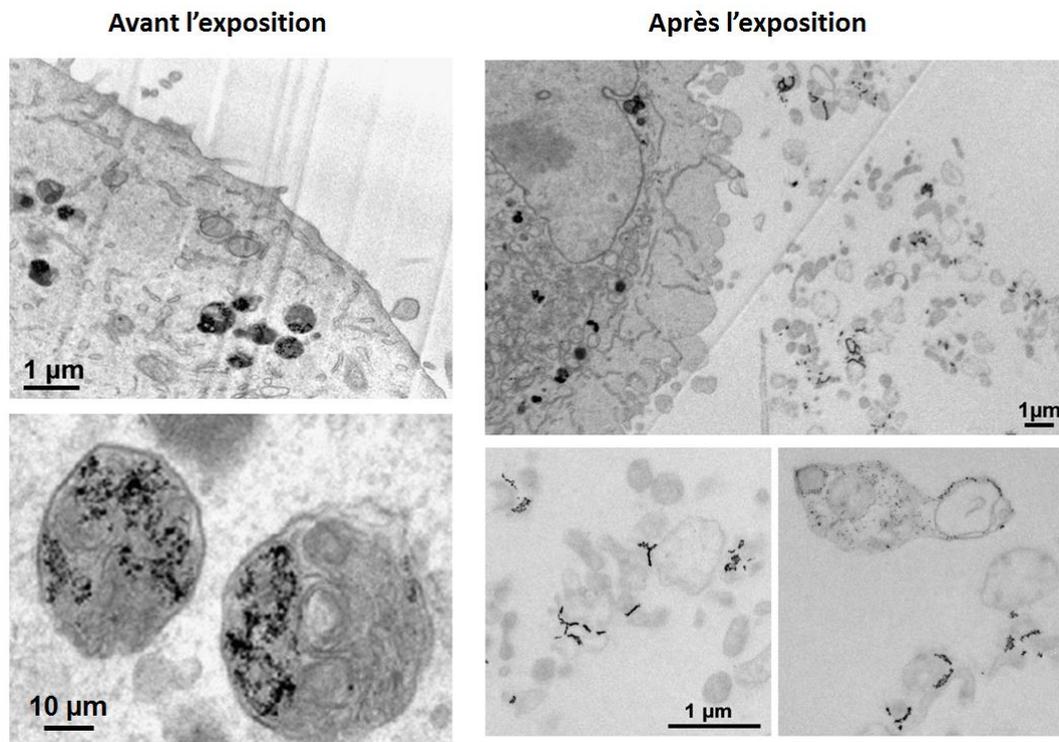


FIGURE 5.19 – Images de microscopie électronique. Localisation des nanoparticules magnétiques avant et après la photo-activation. Avant l'exposition, les nanoparticules magnétiques sont dans des vésicules d'endocytose. Après l'exposition, on retrouve du matériel magnétique en dehors des cellules.

Avant la photo-activation, les nanoparticules magnétiques sont contenues dans des vésicules d'endocytose (figure 5.19). Après la photo-activation, ces nanoparticules se retrouvent dans les vésicules exocytées par les cellules traitées. Cela confirme que la photo-activation induit l'exocytose de matériel intracellulaire.

## 5.6 Transfert des vésicules

Nous avons finalement voulu étudier la capacité des vésicules émises par des cellules tumorales à interagir avec des cellules non traitées et saines. Pour cette étude nous avons choisi des cellules endothéliales humaines (HUVEC). Nous avons induit la vésiculation à partir de cellules cancéreuses (PC3) par photothérapie ou par chimiothérapie. La membrane des PC3 a été marquée systématiquement avec du PKH (fluorescent) avant la vésiculation afin de suivre les vésicules pendant le transfert vers les HUVEC (voir schéma 5.20).

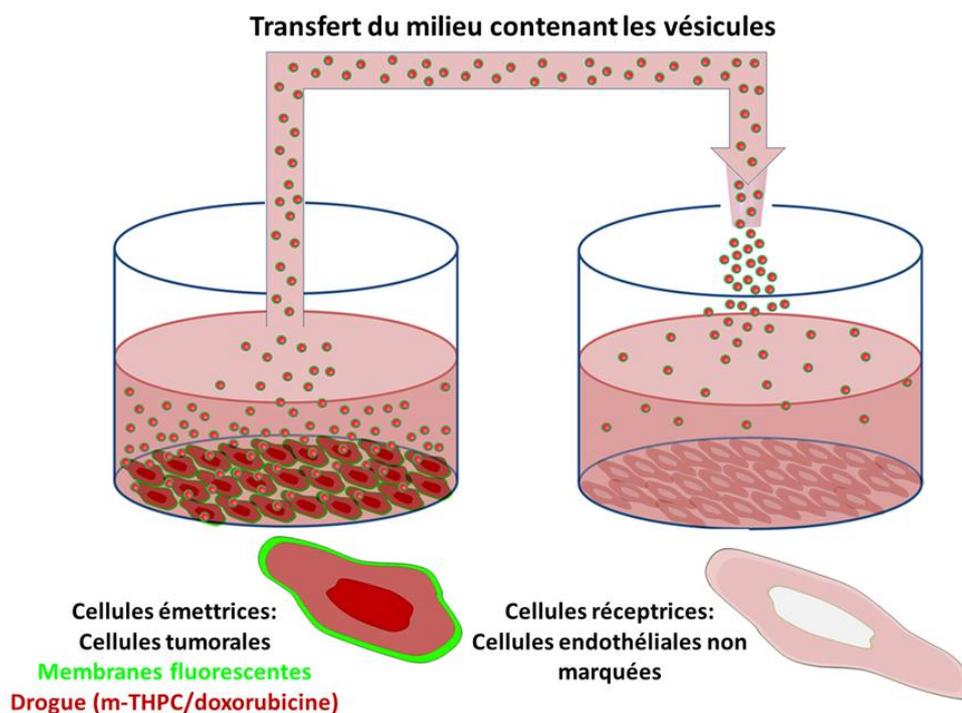


FIGURE 5.20 – Schématisation de l'expérience de transfert des vésicules émises par des cellules tumorales vers des cellules endothéliales saines. La membrane des cellules tumorales est marquée en fluorescence pour pouvoir suivre les vésicules pendant le transfert.

Les cellules endothéliales ont été incubées avec le milieu de culture provenant des cellules tumorales 1h après les traitements au m-THPC et 24h après les traitements à la doxorubicine. Ce milieu contient des vésicules dont la membrane est fluorescente. Des images en fluorescence ont été réalisées pour évaluer la quantité de vésicules transférées.

### 5.6.1 Vésicules obtenues après photothérapie

Les images en fluorescence des cellules endothéliales montrent que les vésicules issues des cellules tumorales sont en partie internalisées par les cellules saines après une incubation de 2h avec le milieu contenant les vésicules produites par les cellules tumorales. La concentration en vésicules transférées est proportionnelle à la concentration à laquelle les cellules tumorales ont été internalisées, comme nous l'avons montré dans la partie 5.3. Il n'est donc pas surprenant d'avoir plus de vésicules internalisées dans les cellules endothéliales lorsque la concentration à laquelle ont été incubées

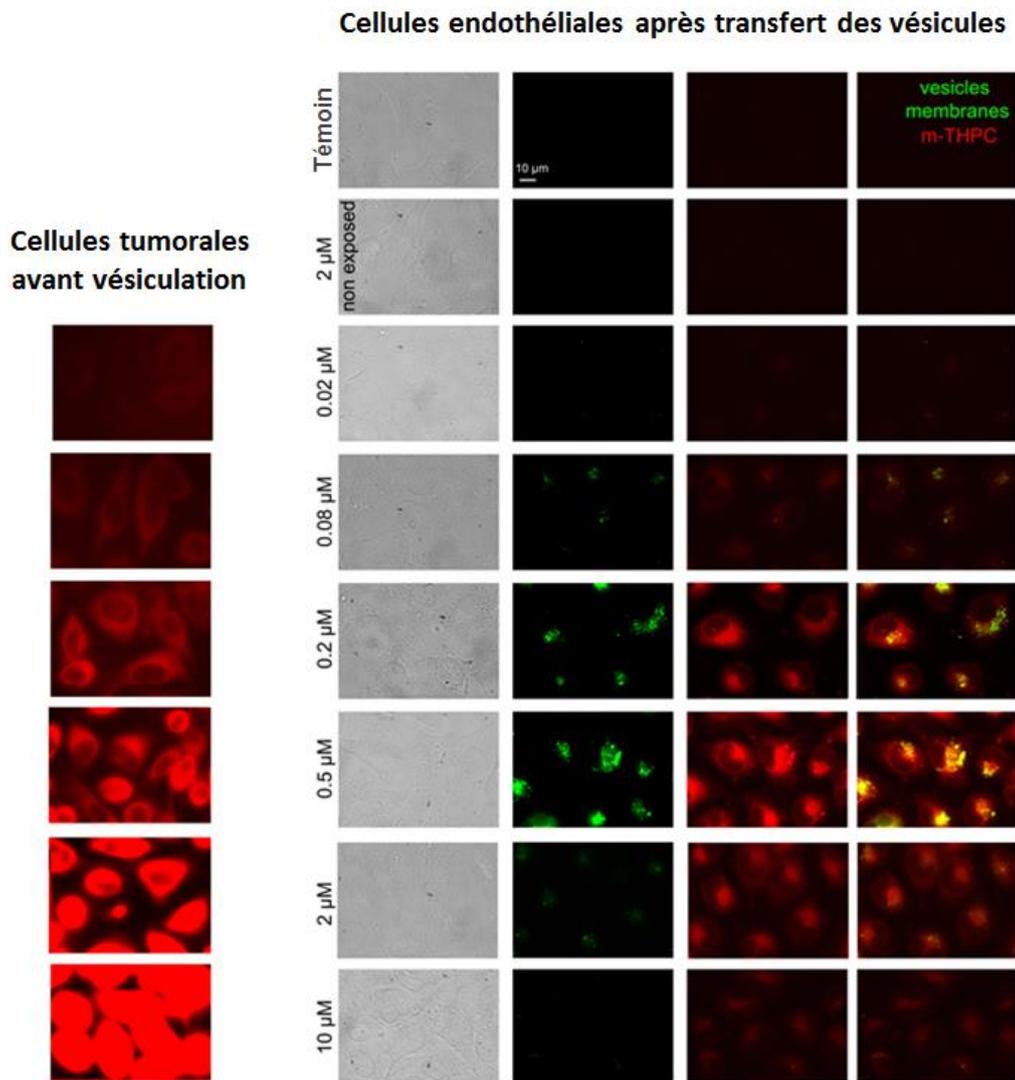


FIGURE 5.21 – Images de cellules endothéliales après une incubation pendant 2h avec le milieu contenant les vésicules émises par les cellules tumorales après photo-traitement (m-THPC). La membrane des vésicules est marquée en vert et la couleur rouge correspond à l'émission de fluorescence du m-THPC. Les concentrations indiquées correspondent aux concentrations d'incubation des cellules tumorales émettrices de vésicules.

les cellules tumorales est autour de  $0.5 \mu\text{M}$  ( $0.2 - 2 \mu\text{M}$ ). Par contre, ce qui est surprenant c'est que les vésicules ont véhiculé une partie de l'agent thérapeutique prévu pour traiter les cellules tumorales vers les cellules endothéliales. Les images en fluorescence rouge indiquent que pour les concentrations allant de  $0.2$  à  $2 \mu\text{M}$ , la quantité de m-THPC internalisée par le HUVEC, qui échappe aux cellules tumorales par les vésicules, est comparable à la concentration initiale dans les PC3.

### 5.6.2 Vésicules obtenues après chimiothérapie

Nous avons effectué le même type d'expérience avec des vésicules issues de cellules traitées par doxorubicine à différentes concentrations.

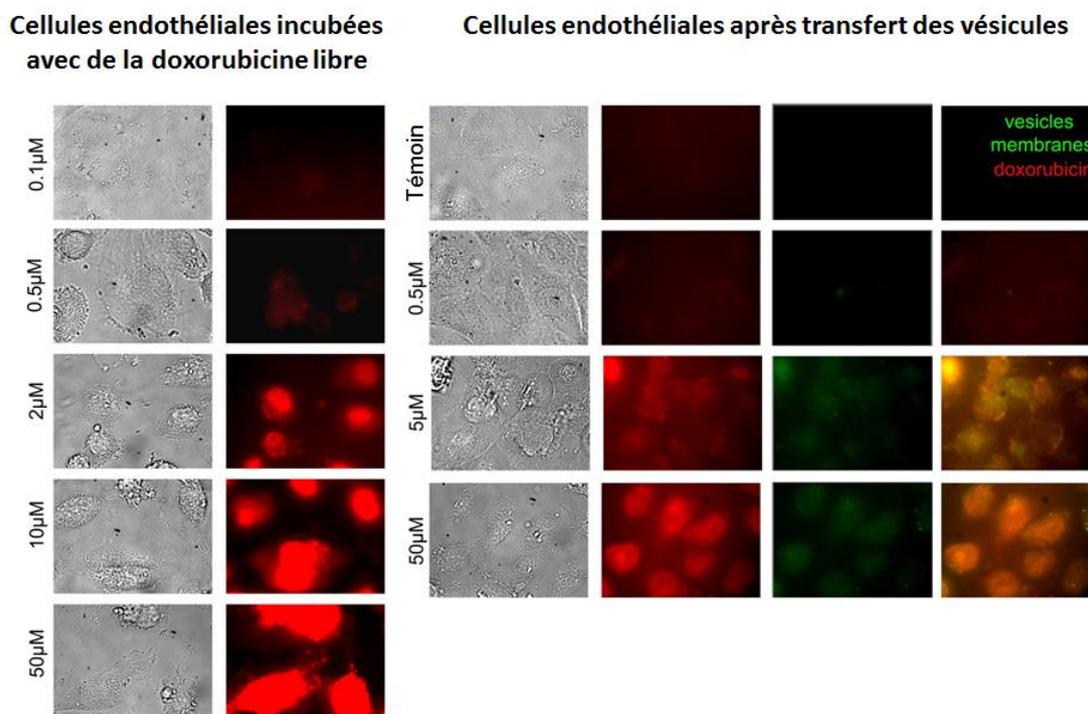


FIGURE 5.22 – Images de cellules endothéliales après incubation pendant 2h avec le milieu contenant des vésicules émises par les cellules tumorales après chimio-traitement (doxorubicine). La membrane des vésicules est marquée en vert et la couleur rouge correspond à l'émission de fluorescence de la doxorubicine. Les concentrations indiquées correspondent aux concentrations d'incubation des cellules tumorales émettrices de vésicules.

Les images en fluorescence de la figure 5.22, nous indiquent qu'il n'y a pas de vésicules transférées lorsque les vésicules proviennent de cellules tumorales incubées à des concentrations en doxorubicine de 0.5  $\mu\text{M}$ . A partir de 5  $\mu\text{M}$ , l'émission de fluorescence en vert témoigne qu'une partie des vésicules incubées est internalisée par les cellules endothéliales. On peut également noter que la quantité de doxorubicine transférée aux cellules endothéliales par les vésicules est comparable à celle entrée dans les cellules lorsque celles-ci sont traitées avec les mêmes concentrations en doxorubicine libre. Cela signifie qu'une partie de la doxorubicine échappe aux cellules tumorales lors de la vésiculation et qu'elle peut être internalisée par des cellules saines.

## 5.7 Discussion

Nous avons mis en évidence pour la première fois et de façon quantitative l'émission de vésicules après un traitement par photo-thérapie. Cette vésiculation massive intervient dans les quelques minutes à peine qui suivent la photo-activation. Nous avons voulu comparer cette émission de vésicules à celle induite par un traitement plus classique par chimio-thérapie. Le traitement par un agent chimiothérapeutique comme la doxorubicine est connu pour induire une vésiculation [92].

Des cellules issues d'une lignée de cancer prostatique humain ont été incubées soit avec un agent photosensible (m-THPC), soit avec un agent chimique (doxorubicine) à différentes concentrations. De manière surprenante, nous avons constaté que la vésiculation n'est pas proportionnelle à la concentration d'incubation, mais un maximum est atteint pour des concentrations intermédiaires et plutôt faibles, pour les deux traitements (0.5  $\mu\text{M}$  pour le m-THPC et 5  $\mu\text{M}$  pour la doxorubicine). Cependant, le nombre de vésicules émises par les cellules traitées par chimiothérapie après 24h n'est pas comparable à celui atteint par les cellules traitées par photo-thérapie après 1h. En effet, aux conditions optimales de vésiculation plus de 4000 millions de vésicules sont émises 1h après la photo-activation contre 2000 millions 24h après le traitement par doxorubicine. De plus, alors que la doxorubicine traite de la même façon toutes les cellules contenues dans la cuve ( $\text{O}=\text{0.84 cm}^2$ ), l'exposition du m-THPC pour le comptage ne se fait que sur une surface de 0.2  $\text{mm}^2$  au centre de la cuve. Pour les expériences d'effets thérapeutiques (viabilité cellulaire et analyse protéomique et génique), plusieurs expositions (au minimum 6/ $\text{cm}^2$ ) ont été réalisées afin d'être sûr de faire des mesures sur des cellules traitées. Cela renforce encore plus le message que la vésiculation par photo-thérapie est beaucoup plus massive par rapport à celle observée après chimiothérapie.

En ce qui concerne les effets thérapeutiques à ces concentrations, nous avons constaté que l'activité métabolique des cellules traitées par photo-thérapie à la condition optimale pour la vésiculation (0.5  $\mu\text{M}$ ), n'est pas impactée par le traitement. La viabilité cellulaire est de 100%, 24h après le traitement. Ce qui n'est pas le cas pour des cellules traitées à plus forte concentration (10  $\mu\text{M}$ ), qui montrent un taux de mortalité supérieur à 70%. Pour le traitement par chimiothérapie, les cellules produisant le plus de vésicules sont plus impactées. A la concentration de 5  $\mu\text{M}$  en doxorubicine, la viabilité cellulaire est environ de 50%.

L'apoptose est un phénomène de mort cellulaire qui peut être réversible [101]. D'autres mécanismes de mort cellulaire ne sont cependant pas à écarter dans le cas du traitement par photo-thérapie, comme la nécrose [77] ou l'autophagie [102, 103]. L'idée ici n'était pas de trouver par quel moyen la PDT tue les cellules mais plutôt de voir s'il y a un lien entre le profil de mort cellulaire et la vésiculation. Il a été montré que l'état apoptotique des cellules était lié à un changement de morphologie [104] et pouvait conduire à de l'exocytose [105]. C'est pourquoi nous avons voulu voir comment évoluait l'expression des protéines impliquées dans les mécanismes de l'apoptose dans des cellules traitées par photo-thérapie et par chimiothérapie aux conditions optimales pour la vésiculation.

Les analyses protéomiques 30 min après la photo-activation du m-THPC montrent que dans les conditions de traitement choisies, la photo-thérapie semble conduire à un état apoptotique par la voie extrinsèque. Cependant cet état semble réversible car la signalisation ne conduit pas au clivage de caspase-3, qui est une étape clé vers l'apoptose. Cette observation est en accord avec les tests de viabilité cellulaire et avec les images de microscopie montrant des cellules marquées à l'annexine V : les cellules sont annexine-positives autour de 5 min après l'exposition alors qu'elles ne le sont plus 30 min après. Nous n'avons pas retrouvé ces mêmes observations concernant la protéomique dans la

littérature. Un article en particulier mentionne une apoptose impliquant le clivage de la caspase-3 [81] après une PDT au m-THPC. Cependant les conditions de traitement décrites dans cet article sont différentes de celles que nous avons appliquées : les cellules sont incubées à une concentration proche de la notre mais pendant 18h alors qu'ici l'incubation dure 2h. De plus, la photo-activation est réalisée avec une puissance inférieure à celle que nous avons utilisée d'un facteur  $10^3$  et les tests protéomiques ont été réalisés 24h après l'exposition des cellules, alors que nous présentons des mesures qui ont été réalisées 30 min après la photo-activation.

Dans le cas du traitement chimiothérapeutique par doxorubicine, les analyses protéomiques mettent en évidence une apoptose non réversible par la voie extrinsèque avec clivage de la caspase-3. Ceci est en accord avec le test d'Alamar qui montre que les cellules traitées à  $5 \mu\text{M}$  de doxorubicine meurent avec un pourcentage de 50%.

Dans les deux traitements, nous avons observé une augmentation de l'expression des protéines de la voie caspase-indépendante, impliquée dans l'apparition des espèces réactives de l'oxygène (ROS). C'est pourquoi nous avons complété les analyses protéomiques par des analyses géniques en nous concentrant sur le stress oxydant. Nous avons observé que les deux traitements induisaient un léger stress oxydant accompagné des faibles variations à la fois des gènes anti-oxydantes et des gènes qui favorisent l'apparition des ROS. Mais aucune variation d'expression génétique très significative n'est à noter, excepté une sur-expression de DUSP1 dans le cas de la photo-activation du m-THPC.

Nous avons ensuite poursuivi l'étude en cherchant à déterminer d'où provenait le contenu des vésicules. Est-ce que ce sont des vésicules produites à partir de la membrane des cellules et contenant du milieu extracellulaire ou est-ce que le contenu des vésicules est d'origine intracellulaire ? Pour ce faire nous avons mis en place un système utilisant des nanoparticules magnétiques comme sonde de localisation. Nous avons fait en sorte que, dans un premier système, les nanoparticules magnétiques soient localisées à la membrane, tandis que dans un second système elles ont été internalisées par les cellules et se retrouvent encapsulées dans les endosomes/lysosomes. Après vésiculation, nous avons trouvé du matériel magnétique dans les vésicules émises par les deux systèmes. Ce résultat est également illustré par des images de microscopie électronique montrant que les nanoparticules magnétiques se trouvent effectivement encapsulées dans des vésicules intracellulaire avant l'exposition et qu'elles finissent par sortir des cellules sous forme de vésicules, lors de la photo-activation. Ce résultat montre que les vésicules émises après photo-thérapie peuvent provenir du cœur des cellules cancéreuses traitées et par voie de conséquence, potentiellement contenir des oncogènes.

La dernière étape de cette étude concerne le transfert des vésicules produites par des cellules tumorales après traitement anticancéreux sur des cellules endothéliales saines. Nous avons vu que le nombre de vésicules transférées dépendaient de la concentration d'incubation des cellules cancéreuses. Ceci n'est pas surprenant, car le nombre de vésicules transférées dépend du nombre de vésicules produites et comme nous l'avons vu dans la première partie, ce nombre dépend de la concentration d'incubation des agents thérapeutiques. Mais ce qui est plus étonnant est que les vésicules ont emporté avec elles une partie de l'agent thérapeutique. Cela signifie non seulement que les cellules tumorales échappent en partie au traitement, mais en plus que ce transfert via les vésicules peut avoir un effet nocif sur des cellules saines. Cette observation est très négative vis-à-vis des traitements anticancéreux, en particulier pour la doxorubicine, qui contrairement au m-THPC ne nécessite pas d'activation extérieure pour agir.

## 5.8 Conclusion et perspectives

La doxorubicine est utilisée en clinique depuis plus de 30 ans. Malheureusement elle est connue pour être très nocive pour les tissus sains et en particulier pour les cellules cardiaques [106]. L'enjeu dans ce type de thérapie est de pouvoir traiter des patients en faisant un compromis entre une dose la plus faible possible pour une efficacité la plus forte. Seulement, dans cette étude, nous avons établi qu'une dose faible en agent thérapeutique accentue l'effet secondaire d'émission de vésicules, tout en ne mettant pas complètement en cause la viabilité des cellules cancéreuses. De plus, en transférant les vésicules émises par des cellules cancéreuses sur des cellules épithéliales saines, nous avons observé que les vésicules étaient capables de véhiculer l'agent thérapeutique. Cette observation met en avant une diminution de l'effet thérapeutique escompté dans les cellules tumorales avec en parallèle, un effet secondaire néfaste sur les cellules saines par le transfert d'agent thérapeutique via l'émission de vésicules induite par le traitement.

Une vésiculation encore plus massive a été observée suite à un traitement par photo-thérapie. Une heure seulement après la photo-activation, jusqu'à 10 000 vésicules sont émises par des cellules de cancer de la prostate. De plus à la dose à laquelle la vésiculation est la plus forte, aucun effet thérapeutique significatif n'a été observé sur les cellules. Cette vésiculation est un effet secondaire non négligeable du traitement thérapeutique, car ces vésicules permettent aux cellules d'expulser une partie de l'agent thérapeutique diminuant ainsi leur effet thérapeutique sur les cellules tumorales. Sans oublier que ces vésicules résultent d'une exocytose du milieu intracellulaire et peuvent contenir des oncogènes sous forme d'ARNm ou de microADN [90], potentiellement dangereux pour le reste de l'organisme.

Les changements morphologiques observés juste après photo-activation (arrondissement des cellules, blebs) sont très rapides. Depuis quelques années, certains chercheurs pensent qu'il pourrait y avoir un lien entre la tension de membrane et l'exocytose [107]. L'apparition des blebs juste après la photo-activation, indique qu'il y a effectivement des modifications de la tension de membrane (du moins localement). La tension de membrane est directement liée à la structure du cortex d'actine, qui maintient la membrane sous tension. Il serait intéressant de regarder si la photo-activation a un effet sur les microfilaments d'actine, par exemple en induisant une dépolymérisation.

# Chapitre 6

## Systeme modèle de transport vésiculaire

### Sommaire

---

<b>6.1</b>	<b>Introduction</b>	<b>126</b>
<b>6.2</b>	<b>Analyses des protocoles</b>	<b>126</b>
6.2.1	Les microtubules	126
6.2.2	Les endosomes	127
6.2.3	L'énergie chimique	127
6.2.4	Préparation des lamelles	127
6.2.5	Remarques générales	127
<b>6.3</b>	<b>Observations et conclusions</b>	<b>128</b>

---

## 6.1 Introduction

Le transport vésiculaire est très dépendant du système dans lequel il a lieu et notamment des propriétés mécaniques complexes du cytoplasme. Pour s'affranchir de tout ce qui n'est pas nécessaire à ce phénomène mais qui le module, nous avons voulu mettre en place un système modèle minimal contenant uniquement un réseau de microtubules et des endosomes magnétiques extraits de cellules, qui peuvent se déplacer le long de ces microtubules.

Ce type de système offre plusieurs avantages, dont celui de pouvoir contrôler la composition du milieu et ses propriétés mécaniques. Le fait d'avoir des endosomes magnétiques, nous offre la possibilité de pouvoir les manipuler dans l'espace via des champs ou des couples magnétiques plus facilement que dans une cellule (les forces visco-élastiques étant plus faibles).

Les enjeux de disposer d'un tel système sont de pouvoir mesurer la vitesse de déplacement des endosomes, la directionnalité, la processivité, le caractère plus ou moins diffusif des déplacements ainsi que la force d'arrêt.

Nous avons rencontré beaucoup de difficultés lors de la mise en place du système modèle. Malheureusement nous n'avons pas réussi à réaliser assez d'expériences fructueuses pour présenter des résultats. Néanmoins, nous voulons discuter, dans ce chapitre, des différents protocoles qui ont été testés et des idées que nous avons eues pour les améliorer. Le but est de fabriquer des microtubules polymérisés *in vitro* sur lesquels on dépose des endosomes naturels et fonctionnels. Ces derniers sont rendus magnétiques dans les cellules avant de les extraire. Ils sont ensuite disposés sur un réseau quasi-2D de microtubules. Une dernière étape consiste à mettre à disposition de l'énergie chimique, indispensable aux moteurs dont sont équipés les endosomes, pour fonctionner et les mettre en mouvement.

Les difficultés dans le fait de mettre en place un tel système sont de disposer d'un réseau de microtubules stables et fonctionnels et simultanément d'avoir des endosomes dont les moteurs ont conservé leur fonctionnalité. Le problème majeur est que ce qui est bon pour les microtubules ne l'est pas forcément pour les endosomes et vice versa. Il est donc important d'avoir tous les composants nécessaires pour chaque élément du système mais dans des proportions limitées, afin d'éviter les effets négatifs sur les autres constituant et de ne pas déstabiliser le système.

## 6.2 Analyses des protocoles

Chacune des étapes de la mise en place de ce système modèle sont importantes. Voici quelques indications étape par étape. L'ensemble de ces protocoles est décrit dans la partie 8.2.

### 6.2.1 Les microtubules

Le but est d'avoir un réseau de microtubules stables et fonctionnels. Nous avons testé 3 protocoles différents : microtubules doublement stabilisés au Taxol/GMPCC et microtubules stabilisés (protocole issu de [74]) au Taxol (protocoles long et court) (protocole court inspiré de [108]). Celui qui nous a semblé le plus efficace étant celui qui permet d'avoir des microtubules stabilisés au taxol auquel nous avons ajouté du DTT (protocole détaillé dans la partie 8.2.4). Les microtubules obtenus à partir de ce protocole sont très stables et nous avons pu observer des mouvements actifs avec ce type de microtubules.

Une chose importante est la température. Elle doit être à 37°C lors de la polymérisation des microtubules et autour de 22°C (température ambiante) pour leur conservation. Une fois les microtubules polymérisés, il faut faire attention à ne pas les refroidir, au risque de les dépolymériser.

Certains préfèrent utiliser de la tubuline purifiée mais d'autres pensent qu'en purifiant la tubuline

soi-même de nombreuses protéines liées à la tubuline sont également extraites et peuvent gêner l'attachement des moteurs aux microtubules. Nous avons préféré utilisé de la tubuline commerciale (Tebu-bio).

Pour pouvoir observer les microtubules sous un microscope optique une partie de la tubuline utilisée est fluorescente (rhodamine, rouge). Cependant la proportion de tubuline rhodamine ne doit pas être trop élevée, au risque de diminuer la fonctionnalité des microtubules et d'augmenter les risques de catastrophe. En effet, la rhodamine joue en quelque sorte un rôle de photosensibilisateur par le relargage de radicaux libres lorsqu'elle est exposée à une source lumineuse. La présence de radicaux libres, qui sont des espèces oxydantes, a tendance à favoriser la dépolymérisation des microtubules. Un ratio compris entre 1/5 et 1/10 (tubuline rhodamine/tubuline) semble être convenable.

Pour avoir des microtubules stables, nous ajoutons, dans toutes les solutions qui sont au contact des microtubules (même dans la solution contenant les endosomes), du taxol (10  $\mu$ M) et un anti-oxydant sous forme de DTT (1 mM). Attention à ne pas mettre trop de DTT qui pourrait avoir un effet négatif sur les moteurs. Tous les rinçages qui précèdent l'incubation des endosomes sont fait avec du tampon BRB contenant du taxol et du DTT.

### 6.2.2 Les endosomes

L'idée est d'extraire des endosomes naturels de cellules en se servant de nanoparticules magnétiques.

Toutes les étapes de l'extraction se font dans une solution tamponnée (tampon HB) contenant un cocktail de protéines inhibitrices (PIC, qui évite la dégradation des moteurs protéiques) et un anti-oxydant (DTT).

La plupart des protocoles d'extraction d'endosomes, comporte une étape d'ultra-centrifugation. Le protocole que nous utilisons ici a l'avantage de ne pas utiliser de centrifugations trop rapides, qui ont tendance à dénaturer les moteurs moléculaires, qui perdent alors leur fonctionnalité.

Des cellules (MSC, HeLa) ont été marquées magnétiquement. La plupart de temps nous avons fait une chasse de la nuit pour avoir plutôt des endosomes tardifs et des lysosomes, comme dans les études de trafic intracellulaire (chapitres 3 et 4). Cependant, nous pensons que ce n'est pas forcément une bonne chose, car les vésicules d'endocytose auquel nous avons accès avec un tri magnétique ne sont pas toutes équivalentes. Nos observations nous laissent penser que les endosomes précoces sont plus "mobiles" ou peut-être moins fragiles que les endosomes tardifs ou les lysosomes. En effet, nous avons testé des endosomes à différents stades (endosomes précoces, endosomes tardifs ou lysosomes) et issus de différents types cellulaires et la seule configuration qui a fonctionné était avec des endosomes précoces issus de HeLa. Les cellules sont ensuite décollées puis lavées plusieurs fois dans le tampon d'extraction. La solution contenant les cellules est ensuite aspirée à l'aide d'une seringue. Les cellules sont "cassées" mécaniquement en faisant plusieurs aller-retour de la solution dans une aiguille (23G). Le nombre d'allers-retours est important. Il vaut mieux ne pas en faire assez et avoir encore quelques cellules entières, plutôt que d'en faire trop et de commencer à casser les noyaux. Le contenu des noyaux (chromatine) est visqueux et peut polluer la solution contenant les endosomes. Un fois les noyaux séparés du reste par une dernière centrifugation (à vitesse modérée), les endosomes magnétiques sont isolés grâce à un aimant.

Toutes les étapes de l'extraction doivent absolument être effectuées à basse température ( $<4^{\circ}\text{C}$ ) pour éviter une dégradation des moteurs. Les endosomes, une fois extraits, sont à conserver dans de l'azote liquide (plonger directement, sans étape intermédiaire de congélation). Nous avons observé des mouvements vésiculaires dirigés avec des endosomes conservés pendant 1 mois dans l'azote liquide.

### 6.2.3 L'énergie chimique

Les moteurs ont besoin d'énergie chimique pour fonctionner. L'ATP est une bonne source d'énergie.

Le protocole initial (issu de [28]) stipulait de mettre à la fois de l'ATP et un système permettant de recycler l'ATP. Les moteurs ayant une durée de vie limitée dans un système *in vitro* (quelques minutes), si la concentration d'ATP est autour de 1 mM, il n'est pas nécessaire de mettre en plus un régénérateur d'ATP (qui ajoute encore des molécules dans la solution). Certaines personnes utilisent du cytosol extrait de cellules, mais l'idée ici était d'avoir un système vraiment minimal et contrôlé.

### 6.2.4 Préparation des lamelles

L'idéal est de manipuler des petits volumes. C'est pourquoi nous avons utilisé des chambres délimitées par deux lamelles séparées par de fines bandes de parafilm. Au début nous utilisions de la bande collante double face. Mais la colle peut se dissoudre dans la solution et être négative pour le système, alors que le parafilm est plutôt neutre.

Certains protocoles proposent de traiter la surface avec de la poly-lysine, d'autres sont pour l'utilisation de lamelles "sales". Après avoir essayé ces deux systèmes, nous avons opté pour des lamelles silanisées et un traitement avec de l'anti- $\beta$ -tubuline (Sigma) de sorte que les microtubules soient bien fixés à la surface. Il y a plusieurs étapes de rinçage pendant lesquels les microtubules risquent d'être détachés. Nous avons suivi le protocole de silanisation ainsi que le traitement à l'anti-tubuline décrits dans cette référence : [108].

### 6.2.5 Remarques générales

Lors de la préparation des solutions, il faut absolument utiliser de l'eau milliQ (nano-pure) et pas de l'eau de culture ou de l'eau distillée, pour limiter au maximum la présence d'ions inutiles. Le pH doit être testé systématiquement et doit idéalement être de 7. Au cas où il doit être ajusté, il vaut mieux utiliser du KOH (pas du NaOH) et du HCl.

Il faut éviter les étapes de décongélation/recongélation, qui ont tendance à dégrader les différents constituants. Il vaut mieux aliquoter les solutions en petits volumes et jeter chaque aliquot décongelé. Sachant qu'en plus, l'aliquotage de toutes les solutions pouvant être préparées à l'avance est un gain de temps et allège grandement le protocole.

## 6.3 Observations et conclusions

Reconstituer le trafic vésiculaire d'endosomes purifiés à partir d'un système *in vitro* est très délicat. Il faut à la fois disposer de microtubules stables et fonctionnels et d'endosomes dont les moteurs sont actifs après l'extraction.

Nous avons testé de nombreux protocoles dans des conditions différentes. La plupart de ces essais étaient négatifs. Cependant, nous avons observé occasionnellement des mouvements dirigés. Par exemple, nous avons pu voir un mouvement d'aller et venue sur plusieurs  $\mu\text{m}$  et d'une durée de 2 min (voir trajectoire figure...)

Mais malgré un grand nombre de tentatives, nous n'avons pas réussi à reproduire de façon systématique ces conditions expérimentales. Néanmoins, ces essais nous ont permis d'identifier les points les plus importants, afin de simplifier au maximum ces protocoles.

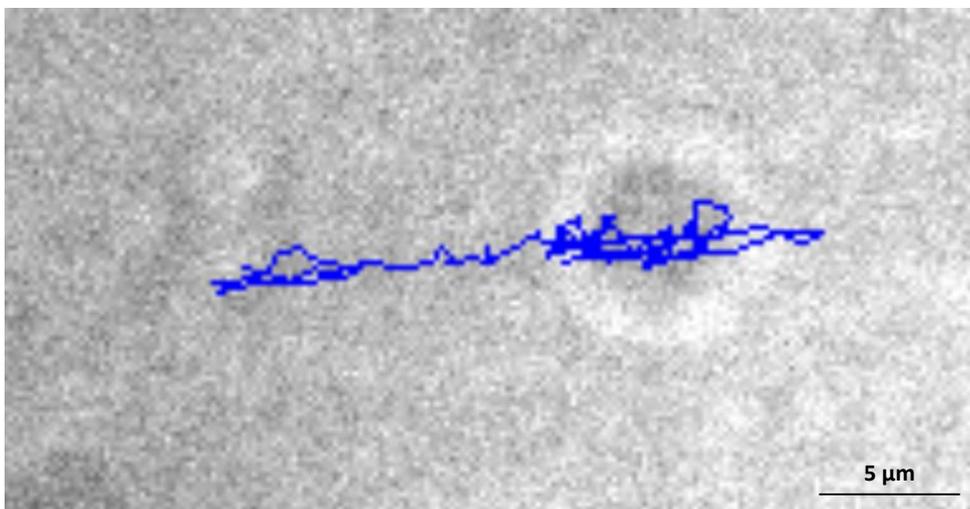


FIGURE 6.1 – Trajectoire d'un endosome extrait de cellules (HeLa) le long d'un microtubule (*in vitro*).



## Conclusion générale

Le trafic intracellulaire est un phénomène actif essentiel pour le bon fonctionnement de chacune des cellules d'un organisme. L'étude de ses mécanismes de fonctionnement et de régulation est l'un des sujets d'étude les plus actifs de la recherche dans le domaine de la biologie cellulaire.

Les travaux effectués durant cette thèse avait pour but de tester, à l'échelle de la cellule unique, la résistance du trafic intracellulaire à deux différentes perturbations : une perturbation mécanique et une perturbation photo-chimique. La perturbation mécanique consiste à cisailer mécaniquement le cytoplasme par la rotation de chaîne d'endosomes magnétiques. La perturbation photo-chimique est induite par la photo-activation de molécules photosensibles (m-THPC et TPCS<sub>2a</sub>), internalisées au préalable par les cellules.

Le principe, commun à ces deux types de perturbations, était de quantifier, par des mesures passives de suivi de particules, le trafic intracellulaire d'endosomes magnétiques ou de chaînes d'endosomes avant la perturbation et de comparer ces mesures à celles effectuées après la perturbation. Des mesures de microrhéologie active ont également été réalisées dans les deux cas, pour quantifier l'impact de ces perturbations sur les propriétés viscoélastiques du cytoplasme.

Les analyses des trajectoires des sondes ont mis en évidence un impact plutôt faible, mais néanmoins significatif, d'une perturbation mécanique sur le trafic intracellulaire. Dans cette partie, nous avons utilisé, pour sonder le transport vésiculaire des chaînes d'endosomes magnétiques. La perturbation mécanique a été appliquée au cytoplasme par la rotation de ces mêmes chaînes. Nous avons observé une diminution à la fois de l'exposant et de l'amplitude du déplacement quadratique des sondes, correspondant à une diminution des phénomènes de mouvement dirigé ainsi que de la processivité des sondes, après la perturbation. Des analyses complémentaires dont l'analyse des mesures actives n'ont mis aucune modification de la structure ou des propriétés mécaniques du cytoplasme en évidence. Ceci implique que les modifications observées sur les mesures passives sont dues à un impact direct sur le fonctionnement du trafic intracellulaire par l'inactivation d'une partie des moteurs moléculaires (comportement collectif) ou par une baisse de leur activité (comportement individuel). Cependant cette diminution du trafic intracellulaire induite par une perturbation mécanique ne correspond pas à une inactivation complète, montrant que ce phénomène de transport est résistant à ce type de perturbation (telle que nous l'avons appliquée). Cette robustesse du trafic intracellulaire n'a pas été retrouvée lors de l'application d'une perturbation photo-chimique. En effet, la confrontation des mesures passives et actives ont montré que le trafic intracellulaire était fortement diminuée (facteur 100) alors que la viscosité n'augmentait que d'un facteur 2, impliquant un dysfonctionnement interne au trafic intracellulaire (modifications des moteurs et/ou du cytosquelette). Les expériences *in vitro* sur réseau de microtubules ont montré qu'une dépoly-

mérisation rapide des microtubules était induite par la photo-activation, empêchant ainsi le trafic intracellulaire de fonctionner après la perturbation.

Parallèlement à cette inhibition du trafic intracellulaire, nous avons observé une augmentation du trafic extracellulaire, par l'émission de vésicules, notamment lors de la photo-activation du m-THPC (ou FOSCAN) utilisé en thérapie anticancéreuse (PDT). Cette émission massive et rapide est induite systématiquement quelques minutes seulement après la photo-activation. Nous avons caractérisé cette émission de vésicules que nous avons comparé à celle induite par un traitement anticancéreux plus classique, par chimiothérapie. Nous avons estimé le nombre de vésicules émises une heure après le traitement phototherapeutique à plus de 10 000 vésicules par cellule. L'émission de vésicules induite par un traitement chimiothérapeutique est plus lente et moins massive mais témoigne néanmoins d'un effet secondaire non-négligeable engendré par ces deux types de traitements anticancéreux. Nous avons pu établir qu'une partie des vésicules provenait du cœur de la cellule et contenait entre autres une partie de l'agent thérapeutique, partie qui échappe aux cellules tumorales avec pour conséquence une diminution des effets thérapeutiques. De plus, si ces vésicules sont capables d'interagir avec des cellules saines, celles-ci pourraient à leur tour subir les effets des traitements. D'autre part, il n'est pas impossible que ces vésicules soient un intermédiaire de transport d'oncogènes, pouvant alors favoriser l'apparition de métastases.

# Chapitre 8

## Annexes

### Sommaire

---

<b>8.1</b>	<b>Expression du couple magnétique</b>	<b>134</b>
<b>8.2</b>	<b>Protocoles détaillés : Système modèle <i>in vitro</i></b>	<b>136</b>
8.2.1	Préparation des tampons	136
8.2.2	Silanisation des lamelles	137
8.2.3	Extraction des endosomes	138
8.2.4	Polymérisation des microtubules	139
8.2.5	Préparation des échantillons pour étudier l'impact de la photothérapie sur les microtubules	140
8.2.6	Préparation des échantillons pour la reconstitution du transport vésiculaire <i>in vitro</i>	141
<b>8.3</b>	<b>Préparation d'échantillon pour la microscopie électronique (sur monocouche)</b>	<b>144</b>
<b>8.4</b>	<b>Proteome et Gene Array</b>	<b>145</b>
8.4.1	Proteome Profiler Human Apoptosis Array Kit	145
8.4.2	Human Oxidative Stress Profiler PCR Array	145

---

## 8.1 Expression du couple magnétique

Certaines étapes de ce calcul sont proposées dans [64]. Ici, on ne considère que les interactions dipolaires et les forces hydrodynamiques dominant par rapport aux fluctuations thermiques. Le couple magnétique appliqué à une chaîne d'endosomes magnétiques découle des forces d'interactions entre les endosomes. Si on écrit les forces d'interaction entre les endosomes  $i$  et  $j$ , suivant l'axe longitudinal ( $\vec{u}_r$ ) et transversal ( $\vec{u}_\theta$ ) à la chaîne, on a d'une part :

$$F_{ij}^r = -\frac{3\mu_0}{4\pi} \frac{m_i m_j}{r_{i,j}^4} [2 \cos(-\varphi) \cos(-\varphi) - \sin(-\varphi) \sin(-\varphi)] \quad (8.1)$$

$$= -\frac{3\mu_0}{4\pi} \frac{m^2}{r_{i,j}^4} [2 \cos^2(\varphi) - \sin^2(\varphi)] \quad (8.2)$$

$$= -\frac{3\mu_0}{4\pi} \frac{m^2}{r_{i,j}^4} [3 \cos^2(\varphi) - 1] \quad (8.3)$$

et d'autre part

$$F_{ij}^\theta = -\frac{3\mu_0}{4\pi} \frac{m_i m_j}{r_{i,j}^4} \sin(-\varphi - \varphi) \quad (8.4)$$

$$= \frac{3\mu_0}{4\pi} \frac{m^2}{r_{i,j}^4} \sin(2\varphi) \quad (8.5)$$

avec  $r_{i,j} = |\vec{r}_i - \vec{r}_j| = d|i - j|$  correspond à la distance entre les endosomes  $i$  et  $j$ ,  $m_i$  et  $m_j$  correspondent respectivement aux moments magnétiques des endosomes  $i$  et  $j$  et  $\varphi$  correspond à la différence de position angulaire entre le champ magnétique et la chaîne.

Soit une chaîne constituée de  $N_e \approx 2N'$  (si  $N_e$  est impair  $N_e = 2N' + 1$  et si  $N_e$  est pair  $N_e = 2N'$ ) endosomes de diamètre  $d$ . Le couple magnétique appliqué sur la chaîne résulte de la somme des forces transversales appliquées à chaque endosome. Si on coupe la chaîne en deux (au milieu), on obtient deux parties de  $N'$  endosomes et le couple magnétique exercé sur chaque partie est le même. La contribution du  $i^{\text{ème}}$  endosome dépend de sa distance au centre de la chaîne  $r_i = d|i|$  (supposé comme étant le centre de rotation) et de la résultante des forces d'interactions avec ses voisins  $F_i^\theta$ . On a donc :

$$\Gamma_m = 2 \sum_{i=1}^{N'} F_i^\theta r_i \quad (8.6)$$

$$= \frac{3\mu_0 m^2}{4\pi} \sin(2\varphi) \sum_{i=1}^{N'} 2r_i \left[ \sum_{j=-N}^{i-1} \frac{1}{r_{i,j}^4} + \sum_{j=i+1}^{N'} \frac{1}{r_{i,j}^4} \right] \quad (8.7)$$

$$= \frac{3\mu_0 m^2}{4\pi} \sin(2\varphi) \sum_{i=1}^{N'} 2r_i \sum_{\substack{j=-N' \\ j \neq i}}^{N'} \frac{1}{r_{i,j}^4} \quad (8.8)$$

Si on se limite aux proches voisins, on a :

$$\sum_{j=-N'}^{N'} \frac{1}{r_{i,j}^4} = \frac{1}{r_{i,i+1}} + \frac{1}{r_{i,i-1}} \quad (8.9)$$

$$= \frac{1}{(d|i-i-1|)^4} + \frac{1}{(d|i-i+1|)^4} \quad (8.10)$$

$$= \frac{2}{d^4} \quad (8.11)$$

et :

$$\sum_{i=1}^{N'} 2r_i \sum_{\substack{j=-N' \\ j \neq i}}^{N'} \frac{1}{r_{i,j}^4} = 2 \frac{2}{d^4} \sum_{i=1}^{N'} d * i \quad (8.12)$$

$$= \frac{4}{d^3} \frac{N'(N'+1)}{2} \quad (8.13)$$

$$\approx \frac{2N'^2}{d^3} \quad (8.14)$$

$$\approx \frac{N_e^2}{2d^3} \quad (8.15)$$

D'où

$$\Gamma_m = \frac{3\mu_0 m^2}{4\pi} \sin(2\varphi) \sum_{i=1}^{N'} 2r_i \sum_{\substack{j=-N' \\ j \neq i}}^{N'} \frac{1}{r_{i,j}^4} \quad (8.16)$$

$$= \frac{3\mu_0 m^2}{4\pi} \sin(2\varphi) * \frac{N_e^2}{2d^3} \quad (8.17)$$

$$= \frac{3\mu_0 m^2 N_e^2 \sin(2\varphi)}{4\pi d^3} \frac{1}{2} \quad (8.18)$$

## 8.2 Protocoles détaillés : Système modèle *in vitro*

### 8.2.1 Préparation des tampons

La plupart du temps, les solutions peuvent être préparées à l'avance à une concentration supérieure.

#### Tampon BRB

C'est le tampon pour préparer les microtubules. Le BRB10X peut être préparé à l'avance et aliquoté pour être conservé à -20°C.

<b>BRB 10X</b>	[ ] <sub>stock</sub>	[ ] <sub>finale</sub>
PIPES		800 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 M	10 mM
EGTA	0.5 M	10 mM
eau milliQ		

#### BRB+Glycérol+GTP

Cette solution est utilisée pour le stockage de la tubuline. Elle peut être aliquotée et conservée à -20°C.

<b>[BRB+Gly+GTP]</b>	[ ] <sub>stock</sub>	[ ] <sub>finale</sub>
BRB	10X	1X
Glycérol	98%	10% (v/v)
GTP	100 mM	1 mM
eau milliQ		

#### Tampon HB

C'est le tampon pour les endosomes. Le HB 5X peut être aliquoté et conservé à -20°C.

<b>HB 5X</b>	[ ] <sub>stock</sub>	[ ] <sub>finale</sub>
Sucrose		1,25 mM
Imidazole	3 M	15 mM
eau milliQ		

#### Tampon Caséine

Cette solution est utilisée pour la préparation des échantillons ("énergie"). Elle peut être aliquotée et conservée à -20°C.

<b>Caséine 100X</b>	[ ] <sub>stock</sub>	[ ] <sub>finale</sub>
Caséine		15 mg/mL
Imidazole	3 M	0.5 M
eau milliQ		

### Pré-scavenger

Cette solution est utilisée pour la préparation des échantillons ("énergie"). Elle peut être aliquotée et conservée à -20°C.

Pré-scavenger	[ ] <sub>stock</sub>	[ ] <sub>finale</sub>
Glucose		31.25 mg/mL
$\beta$ -mercaptoéthanol		0.125 M
eau milliQ		

### Autre solution

D'autres solutions peuvent également être préparées à l'avance puis aliquotées pour être conservées à -20°C :

- ATP à 100 mM dans MgCl<sub>2</sub> 1 M.
- Glucose oxydase à 10 mg/ml dans eau milliQ.
- Catalase 2 mg/ml dans de l'eau.

### 8.2.2 Silanisation des lamelles

Nous avons utilisé des lamelles 22\*22 mm et 26\*50 mm pour créer des chambres de 2-3 mm de large séparées par des fines bandes de parafilm. La hauteur des chambres étant très petite, les différentes solutions pénètrent par capillarité. Ce système permet de manipuler de petits volumes ( $\approx 10 \mu\text{L}$ ). Le protocole est celui décrit dans [108] (sans l'étape au Piranha).

#### Liste des produits

Trichloroéthylène (TCE)  
 Dichlorodiméthylsilane (DDS)  
 KOH  
 Ethanol  
 Acétone  
 Méthanol

#### Protocole

La silanisation des lamelles se fait par plusieurs bains successifs :

- 1 - Plonger les lamelles dans un détergent doux pour le verre. Placer le tout au sonicateur pendant 15 min.
- 2 - Rincer pendant 1 min dans de l'eau milliQ.
- 3 - Incuber 10 min dans de l'acétone.
- 4 - Incuber 10 min dans de l'éthanol 70%.
- 5 - Rincer pendant 1 min dans de l'eau milliQ.
- 6 - Incuber 15 min dans du KOH 0.1 M.
- 7 - Rincer pendant 1 min dans de l'eau milliQ.
- 8 - Sécher complètement les lamelles avec un gaz inerte (ex : azote).
- 9 - Incuber 1h dans du Trichloroéthylène/Dichlorodiméthylsilane (TCE/DDS) (0.05% de DDS dans TCE)

- 10 - Incuber 5 min dans du méthanol.
- 11 - Incuber 10-15 min dans un deuxième bain de méthanol.
- 12 - Incuber 20-30 min dans un troisième bain de méthanol.
- 13 - Sécher les lamelles sans les frotter.

### Remarques

- Il faut vraiment sécher complètement les lamelles avant de les plonger dans le TCE/DDS.
- Lors du mélange du DDS dans le TCE, utiliser une seringue en verre et mélanger sous la surface du TCE (le DDS précipite en présence d'eau, l'humidité de l'air étant suffisante).
- Les lamelles sont hydrophobes pendant environ 2 semaines.
- Pour fabriquer les chambres, superposer 2 lamelles (22\*22 mm et 26\*50 mm) séparées par des bandes de parafilm (largeur : 1-2 mm). Pour sceller les chambres, poser le tout quelques secondes sur une plaque chauffée à 100°C.

### 8.2.3 Extraction des endosomes

Le protocole d'extraction des endosomes est le même que ce soit dans le cadre de l'impact de la photo-activation sur le trafic intracellulaire, pour la reproduction du transport vésiculaire ou dans le but de mesurer les propriétés physiques des endosomes. Les parties entre crochets ([...]) sont spécifiques aux expériences liées au photosensibilisateur.

#### Liste des produits

Trypsine  
 Tampon HB  
 DTT (DL-Dithiothreitol)  
 PIC (protease inhibitor cocktail)  
 [HB+PIC+DTT] (à préparer le jour même)

[HB+PIC+DTT]	[ ] <sub>stock</sub>	[ ] <sub>finale</sub>
HB	5X	1X
PIC		1/1000
DTT	1 M	1 mM
eau milliQ		

#### Protocole

Dans une flasque à confluence, incuber les cellules avec 2 mM de maghémite, 5 mM de citrate [et 5µM de TPCS<sub>2a</sub>] dans du RPMI pendant 30 min [/2h] à 37°C [et à l'abri de la lumière]. A la fin de l'incubation, rincer 3 fois les cellules avec du RPMI et les remettre en culture dans du DMEM complet frais pour une chasse d'une heure [/de la nuit].

Après la chasse, rincer et incuber les cellules avec 1 ml de trypsine pendant 3 min à 37°C afin de les décoller.

Ajouter 4 ml de DMEM complet et centrifuger le tout à 250 g pendant 5 min à 4°C.

Resuspendre le culot dans 5 mL de [HB+PIC+DTT] et centrifuger à 250 g pendant 5 min à 4°C

(premier rinçage).

Resuspendre le culot dans 5 mL de [HB+PIC+DTT] et centrifuger à 250 g pendant 5 min à 4°C (deuxième rinçage).

Resuspendre dans 1 mL de [HB+PIC+DTT].

Utiliser une seringue + aiguille 23 G pour faire un aller/retour dans du [HB+PIC+DTT].

Cisailler la solution contenant les cellules en faisant environ 10 aller/retour (jusqu'à ce que les cellules soient lysées mais pas les noyaux).

Centrifuger le lysat à 700 g pendant 6 min à 4°C (pour séparer les noyaux du reste).

Prélever le surnageant post-nucléaire (lysats sans noyau) avec une seringue (aiguille 19G par exemple), pré-enlever le piston de la seringue et la placer contre la tranche d'un aimant pendant minimum 1h à 4°C.

Enlever le piston et laisser couler la phase non-magnétique.

Remettre le piston et évacuer la dernière goutte de phase non magnétique.

Récupérer la phase magnétique.

La solution peut être diluée dans du tampon [HB+PIC+DTT]. Les endosomes magnétiques peuvent être conservés dans de l'azote liquide directement après extraction.

#### 8.2.4 Polymérisation des microtubules

Ce protocole est inspiré de celui décrit dans cette référence [108], auquel nous avons ajouté du DTT.

##### Liste des produits

[BRB+Glycérol+GTP]

Tubuline rhodamine

Tubuline

Tampon BRB

Taxol

DTT

GTP

MgCl<sub>2</sub>

DMSO

[BRB+Taxol+DTT] (à préparer le jour même)

[BRB+Taxol+DTT]	[ ] <sub>stock</sub>	[ ] <sub>finale</sub>
BRB	10X	1X
Taxol	1 mM	10 µM
DTT	1 M	1 mM
eau milliQ		

##### Aliquotage et conservation de la tubuline

La tubuline et la tubuline rhodamine peuvent être conservées soit sous forme de poudre à 4°C, soit en solution à -80°C.

Diluer la tubuline à 10 mg/mL dans du [BRB+glycérol+GTP]. Préparer des aliquots de 5µL (1µL de tubuline rhodamine et 4µL de tubuline). Tremper les eppendorfs dans de l'azote liquide (snap freeze) et les conserver à -80°C.

### Protocole de polymérisation de microtubules

Préparer la solution de polymérisation MTS-poly de la façon suivante :

MTs-poly		[ ] <sub>stock</sub>	[ ] <sub>finale</sub>
6 $\mu\text{L}$	DMSO	100%	
5 $\mu\text{L}$	MgCl <sub>2</sub>	1 M	25 mM
5 $\mu\text{L}$	GTP	100 mM	1 mM
9 $\mu\text{L}$	BRB	1X	
<b>25 <math>\mu\text{L}</math></b>	V <sub>final</sub>		

Faire chauffer un falcon de 5mL d'eau dans l'incubateur (à 37°C). Dans un eppendorf de 500 $\mu\text{L}$ , mélanger 5 $\mu\text{L}$  de MT-poly avec 5 $\mu\text{L}$  de tubuline rhodamie/tubuline (1/5). Vortexer brièvement la solution. Placer l'eppendorf dans le falcon à 37°C dans l'incubateur. Incuber pendant 30 min. A la fin de l'incubation, ajouter 250 $\mu\text{L}$  de [BRB+Taxol+DTT].

### Remarques

- Les microtubules doivent être conservés à température ambiante (une température basse provoque la dépolymérisation des microtubules) et à l'abri de la lumière (à cause de la rhodamine).
- Ils peuvent être utilisés pendant 2 semaines.
- Pour enlever la tubuline non polymérisée et éviter d'avoir un fond rouge diffus, les microtubules peuvent être centrifugés à 15 000g pendant 15 min à température ambiante.
- Le [BRB+Taxol+DTT] ajouté à la fin ne doit pas être froid, au risque de dépolymériser les microtubules.

## 8.2.5 Préparation des échantillons pour étudier l'impact de la photothérapie sur les microtubules

### Liste des produits

BRB  
 [BRB+Taxol+DTT]  
 anti-*beta*-tubuline  
 Pluronic  
 Triton X100  
 m-THPC  
 TPCS<sub>2a</sub>

### Protocole

- 1 - Rincer la chambre avec du BRB 1X.
- 2 - Incuber 5 min avec l'anti- $\beta$ -tubuline.
- 3 - Passiver pendant 10 min avec du Pluronic (1% dans BRB 1X).
- 4 - Rincer avec du BRB 1X plusieurs fois (au moins 3 passages). Faire le dernier rinçage avec du [BRB+Taxol+DTT].
- 5 - Incuber les microtubules 15 min.
- 6 - Rincer avec du [BRB+Taxol+DTT].

- 7 - Ajouter la solution contenant du photosensibilisateur :  
 soit m-THPC en solution dans du [BRB+Taxol+DTT] avec 0.3% de triton X100 (v/v),  
 soit TPCS<sub>2a</sub> en solution dans du [BRB+Taxol+DTT],  
 soit endosomes contenant du TPCS<sub>2a</sub>.
- 8 - Exposer l'échantillon pendant 5s à une puissance surfacique de 1,5 W/cm<sup>2</sup>.

### Remarques

- Dans la solution contenant du m-THPC, le triton empêche l'agrégation du m-THPC qui précipite dans le tampon BRB.
- Ne pas ajouter de solution "froide" sur les microtubules.
- Protéger l'échantillon de la lumière pour éviter d'exciter le photosensibilisateur avant l'expérience.

### 8.2.6 Préparation des échantillons pour la reconstitution du transport vésiculaire *in vitro*

#### Liste des produits

Tampon BRB

[BRB+Taxol+DTT] (A préparer le jour même)

anti-*beta*-tubuline

Pluronic

Tampon HB

Pré-scavenger

Taxol

DTT

EGTA

ATP

Tampon Caséine

Glucose oxydase

Scavenger (A préparer toutes les heures)

Solutions A1, A2, B1 et B2 (A1, A2, B1, à préparer le jour même, B2 à préparer toutes les heures)

Scavenger 10X	[ ] <sub>stock</sub>	[ ] <sub>finale</sub>	
16 µL	Pré-scavenger		
2 µL	Catalase	2 mg/mL	0.2 mg/mL
2 µL	Glucose oxydase	10 mg/mL	1 mg/mL
<b>20 µL</b>	<b>V<sub>final</sub></b>		

A1	[ ] <sub>stock</sub>	[ ] <sub>finale</sub>	
100 µL	tampon HB	5X	2X
5 µL	Caséine	100X	2X
1 µL	EGTA	0.5 M	2 mM
5 µL	Taxol	1 mM	10 µM
0.5 µL	DTT	1 M	1 mM
138.5 µL	eau milliQ		
<b>250 µL</b>	<b>V<sub>final</sub></b>		

<b>B1</b>	[ ] <sub>stock</sub>	[ ] <sub>finale</sub>	
200 $\mu\text{L}$	tampon HB	5X	1X
10 $\mu\text{L}$	Caséine	100X	1X
2 $\mu\text{L}$	EGTA	0.5 M	1 mM
10 $\mu\text{L}$	Taxol	1 mM	12 $\mu\text{M}$
1 $\mu\text{L}$	DTT	1 M	1.2 mM
617 $\mu\text{L}$	eau milliQ		
<b>840 <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>V<sub>final</sub></b>		

<b>A2</b>	[ ] <sub>stock</sub>	[ ] <sub>finale</sub>	
10 $\mu\text{L}$	solution A1	2X	1X
10 $\mu\text{L}$	endosomes		
<b>20 <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>V<sub>final</sub></b>		

<b>B2</b>	[ ] <sub>stock</sub>	[ ] <sub>finale</sub>	
44 $\mu\text{L}$	solution B1	1.2X	1X
5 $\mu\text{L}$	Scavenger	10X	1X
1 $\mu\text{L}$	ATP	100 mM	2 mM
<b>50 <math>\mu\text{L}</math></b>	<b>V<sub>final</sub></b>		

### Protocole

- 1 - Rincer la chambre avec du BRB 1X.
- 2 - Incuber 5 min avec l'anti- $\beta$ -tubuline.
- 3 - Passiver pendant 10 min avec du Pluronic (1% dans BRB 1X).
- 4 - Rincer avec du BRB 1X plusieurs fois (au moins 3 passages). Faire le dernier rinçage avec du [BRB+Taxol+DTT].
- 5 - Incuber les microtubules 15 min.
- 6 - Rincer avec du [BRB+Taxol+DTT].
- 7 - Incuber la solution contenant les endosomes (solution A2) pendant 8 min.
- 8 - Injecter la solution contenant l'énergie pour les moteurs (solution B2)

### Remarques

- Les lamelles étant silanisées, le premier passage est parfois difficile. Déposer une goutte à l'entrée de la lamelle et tapoter doucement la tranche de la lamelle sur une surface dure pour faire "entrer" la goutte.
- Ne pas ajouter de solution froide sur les microtubules.
- Protéger l'échantillon de la lumière pour éviter d'exciter la rhodamine.
- Une fois que la solution B2 est injectée, il faut rapidement observer le système, car les moteurs moléculaires ont une durée de vie limitée (<30 min).

## 8.3 Préparation d'échantillon pour la microscopie électronique (sur monocouche)

### Fixation

Incuber 1h à température ambiante dans du glutaraldéhyde 2% en tampon Cacodylate de Na 0.1 M (pH  $\approx$  7.2s)

### Rinçage

Incuber de quelques heures à température ambiante à une nuit à 4 °C dans du Cacodylate de Na 0.1 M

### Post-fixation

Incuber 1h à température ambiante dans du tétroxyde d'osmium à 1% + 1.5% de ferrocyanure de potassium dans du tampon cacodylate de Na 0.1 M

### Déshydratation

Incuber 5 min dans de l'éthanol à 30%  
Incuber 5 min dans de l'éthanol à 50%  
Incuber 5 min dans de l'éthanol à 70%  
Incuber 5 min dans de l'éthanol à 90%  
Incuber 3\*10 min dans de l'éthanol à 100%

### Inclusion dans l'Epon

#### →Imprégnation

- incuber pendant 1h à température ambiante avec éthanol 100% / Epon sans accélérateur (1/1)
- incuber 1h à température ambiante avec EPON + DMAE

#### →Inclusion

Retirer la résine, remplir les capsules avec EPON + DMAE et les retourner rapidement sur l'échantillon.

#### →Polymérisation

La polymérisation se fait à 60°C pendant 48 à 72h.

### Remarques

- Ne pas utiliser des cuves en verre qui risquent de se casser lors du décollement des capsules.
- La résine (EPON) est très visqueuse. Pour la prélever, couper les cônes et pipeter plusieurs fois (attention le volume max de la pipette diminue) pour "mouiller" les parois et avoir le bon volume.
- Le protocole peut être interrompu pendant une semaine entre le "rinçage" et l'étape "post-fixation".

## 8.4 Proteome et Gene Array

### 8.4.1 Proteome Profiler Human Apoptosis Array Kit

Les protéines de l'apoptose dont le niveau relatif a été évalué avec le kit Proteome Profiler Array (R&D Systems) sont listées dans la figure 8.1.

Bad	TRAIL R1/DR4	PON2
Bax	TRAIL R2/DR5	p21/CIP1/CDNK1A
Bcl-2	FADD	p27/Kip1
Bcl-x	Fas/TNFSF6	Phospho-p53 (S15)
Pro-Caspase-3	HIF-1 alpha	Phospho-p53 (S46)
Cleaved Caspase-3	HO-1/HMOX1/HSP32	Phospho-p53 (S392)
Catalase	HO-2/HMOX2	Phospho-Rad17 (S635)
cIAP-1	HSP27	SMAC/Diablo
cIAP-2	HSP60	Survivin
Claspin	HSP70	TNF RI/TNFRSF1A
Clusterin	HTRA2/Omi	XIAP
Cytochrome c	Livin	

FIGURE 8.1 – Liste des protéines testées dans le kit Proteome Profiler Human Apoptosis Array (R&D Systems).

### 8.4.2 Human Oxidative Stress Profiler PCR Array

Les gènes du stress oxydant dont le niveau relatif d'expression a été évalué avec la technique de PCR Array (Qiagen) sont listés figure ci-dessous.

Gene Table			
Position	Symbol	Description	Gene Name
A01	ALB	Albumin	DKFZp779N1935, PRO0883, PRO0903, PRO1341
A02	ALOX12	Arachidonate 12-lipoxygenase	12-LOX, 12S-LOX, LOG12
A03	AOX1	Aldehyde oxidase 1	AO, AOH1
A04	APOE	Apolipoprotein E	AD2, LDLCQ5, LPG, MGC1571
A05	ATOX1	ATX1 antioxidant protein 1 homolog (yeast)	ATX1, HAH1, MGC138453, MGC138455
A06	BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	NIP3
A07	CAT	Catalase	MGC138422, MGC138424
A08	CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5	D17S136E, MGC17164, RANTES, SCYA5, SISd, TCP228
A09	CCS	Copper chaperone for superoxide dismutase	MGC138260
A10	CYBB	Cytochrome b-245, beta polypeptide	CGD, GP91-1, GP91-PHOX, GP91PHOX, NOX2, p91-PHOX
A11	CYGB	Cytoglobin	HGB, STAP
A12	DHCR24	24-dehydrocholesterol reductase	DCE, KIAA0018, Nbla03646, SELADIN1, seladin-1
B01	DUOX1	Dual oxidase 1	LNOX1, MGC138840, MGC138841, NOXEF1, THOX1
B02	DUOX2	Dual oxidase 2	LNOX2, NOXEF2, P138-TOX, TDH6, THOX2
B03	DUSP1	Dual specificity phosphatase 1	CL100, HVH1, MKP-1, MKP1, PTPN10
B04	EPHX2	Epoxide hydrolase 2, cytoplasmic	CEH, SEH
B05	EPX	Eosinophil peroxidase	EPO, EPP, EPX-PEN
B06	FOXM1	Forkhead box M1	FKHL16, FOXM1B, HFH-11, HFH11, HNF-3, INS-1, MPHOSPH2, MPP-2, MPP2, PIG29, TGT3, TRIDENT
B07	FTH1	Ferritin, heavy polypeptide 1	FHC, FTH, FTHL6, MGC104426, PIG15, PLIF
B08	GCLC	Glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit	GCL, GCS, GLCL, GLCLC
B09	GPX1	Glutathione peroxidase 1	GSHPX1, MGC14399, MGC88245
B10	GPX2	Glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)	GI-GPx, GPRP, GSHPX-GI, GSHPx-2
B11	GPX3	Glutathione peroxidase 3 (plasma)	GPx-P, GSHPx-3, GSHPx-P

B12	GPX4	Glutathione peroxidase 4 (phospholipid hydroperoxidase)	MCSP, PHGPx, snGPx, snPHGPx
C01	GPX5	Glutathione peroxidase 5 (epididymal androgen-related protein)	-
C02	GSR	Glutathione reductase	MGC78522
C03	GSS	Glutathione synthetase	GSHS, MGC14098
C04	GSTP1	Glutathione S-transferase pi 1	DFN7, FAEES3, GST3, GSTP, PI
C05	GSTZ1	Glutathione transferase zeta 1	GSTZ1-1, MAAI, MAI, MGC2029
C06	HSPA1A	Heat shock 70kDa protein 1A	FLJ54303, FLJ54370, FLJ54392, FLJ54408, FLJ75127, HSP70-1, HSP70-1A, HSP70I, HSP72, HSPA1, HSPA1B
C07	KRT1	Keratin 1	CK1, EHK, EHK1, EPPK, K1, KRT1A, NEPPK
C08	LPO	Lactoperoxidase	MGC129990, MGC129991, SPO
C09	MB	Myoglobin	MGC13548, PVALB
C10	MBL2	Mannose-binding lectin (protein C) 2, soluble	COLEC1, HSMBPC, MBL, MBP, MBP-C, MBP1, MGC116832, MGC116833
C11	MPO	Myeloperoxidase	-
C12	MPV17	MpV17 mitochondrial inner membrane protein	MTDPS6, SYM1
D01	MSRA	Methionine sulfoxide reductase A	PMSR
D02	MT3	Metallothionein 3	GIF, GIFB, GRIF
D03	NCF1	Neutrophil cytosolic factor 1	FLJ79451, NCF1A, NOXO2, SH3PXD1A, p47phox
D04	NCF2	Neutrophil cytosolic factor 2	FLJ93058, NCF-2, NOXA2, P67-PHOX, P67PHOX
D05	NOS2	Nitric oxide synthase 2, inducible	HEP-NOS, INOS, NOS, NOS2A
D06	NOX4	NADPH oxidase 4	KOX, KOX-1, RENOX
D07	NOX5	NADPH oxidase, EF-hand calcium binding domain 5	MGC149776, MGC149777
D08	NUDT1	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 1	MTH1
D09	PDLIM1	PDZ and LIM domain 1	CLIM1, CLP-36, CLP36, hCLIM1
D10	PRDX1	Peroxiredoxin 1	MSP23, NKEFA, PAG, PAGA, PAGB, PRX1, PRXI, TDPX2

D11	PRDX2	Peroxiredoxin 2	MGC4104, NKEFB, PRP, PRX2, PRXII, TDPX1, TPX1, TSA
D12	PRDX3	Peroxiredoxin 3	AOP-1, AOP1, MER5, MGC104387, MGC24293, PRO1748, SP-22
E01	PRDX4	Peroxiredoxin 4	AOE37-2, PRX-4
E02	PRDX5	Peroxiredoxin 5	ACR1, AOEB166, B166, MGC117264, MGC142283, MGC142285, PLP, PMP20, PRDX6, PRXV
E03	PRDX6	Peroxiredoxin 6	1-Cys, AOP2, KIAA0106, MGC46173, NSGPx, PRX, aiPLA2, p29
E04	PRNP	Prion protein	ASCR, CD230, CJD, GSS, MGC26679, PRIP, PrP, PrP27-30, PrP33-35C, PrPc, prion
E05	PTGS1	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	COX1, COX3, PCOX1, PGG, HS, PGHS-1, PGHS1, PHS1, PTGHS
E06	PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	COX-2, COX2, GRIPGHS, PGG, HS, PGHS-2, PHS-2, hCox-2
E07	RNF7	Ring finger protein 7	CKBBP1, ROC2, SAG
E08	SELS	Selenoprotein S	ADO15, MGC104346, MGC2553, SBB18, SEPS1, VIMP
E09	SEPP1	Selenoprotein P, plasma, 1	SELP, SeP
E10	SFTPD	Surfactant protein D	COLEC7, PSP-D, SFTP4, SP-D
E11	SIRT2	Sirtuin 2	FLJ35621, FLJ37491, SIR2, SIR2L, SIR2L2
E12	SOD1	Superoxide dismutase 1, soluble	ALS, ALS1, IPOA, SOD, hSod1, homodimer
F01	SOD2	Superoxide dismutase 2, mitochondrial	IPOB, MNSOD, MVCD6
F02	SOD3	Superoxide dismutase 3, extracellular	EC-SOD, MGC20077
F03	SQSTM1	Sequestosome 1	A170, OSIL, PDB3, ZIP3, p60, p62, p62B
F04	SRXN1	Sulfiredoxin 1	C20orf139, FLJ43353, Npn3, SRX1, YKL086W, dJ850E9.2
F05	TPO	Thyroid peroxidase	MSA, TDH2A, TPX



# Bibliographie

- [1] Organelle stains selection guide | life technologies.
- [2] Hui Chen, Barbara W Bernstein, and James R Bamberg. Regulating actin-filament dynamics in vivo. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(1) :19–23, January 2000.
- [3] Adeela Kamal and Lawrence SB Goldstein. Connecting vesicle transport to the cytoskeleton. *Current Opinion in Cell Biology*, 12(4) :503–508, August 2000.
- [4] Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, and Keith Roberts. *Molecular Biology of the Cell 4th edition*. National Center for Biotechnology Information's Bookshelf, January 2002.
- [5] BSCB : : The british society for cell biology : : www.bscb.org.
- [6] Deborah J Frank, Tatsuhiko Noguchi, and Kathryn G Miller. Myosin VI : a structural role in actin organization important for protein and organelle localization and trafficking. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(2) :189–194, April 2004.
- [7] John W. Murray and Allan W. Wolkoff. Roles of the cytoskeleton and motor proteins in endocytic sorting. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(11) :1385–1403, November 2003.
- [8] Steven P. Gross, Michael Vershinin, and George T. Shubeita. Cargo transport : Two motors are sometimes better than one. *Current Biology*, 17(12) :R478–R486, June 2007.
- [9] Ronald D Vale. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell*, 112(4) :467–480, February 2003.
- [10] James A. Spudich. The myosin swinging cross-bridge model. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(5) :387–392, May 2001.
- [11] Ahmet Yildiz, Joseph N. Forkey, Sean A. McKinney, Taekjip Ha, Yale E. Goldman, and Paul R. Selvin. Myosin v walks hand-over-hand : Single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science*, 300(5628) :2061–2065, June 2003. PMID : 12791999.
- [12] Charles L Asbury. Kinesin : world's tiniest biped. *Current Opinion in Cell Biology*, 17(1) :89–97, February 2005.
- [13] Manfred Schliwa. Kinesin : walking or limping? *Nature Cell Biology*, 5(12) :1043–1044, December 2003.
- [14] Ahmet Yildiz, Michio Tomishige, Ronald D. Vale, and Paul R. Selvin. Kinesin walks hand-over-hand. *Science*, 303(5658) :676–678, January 2004. PMID : 14684828.
- [15] Wei Hua, Johnson Chung, and Jeff Gelles. Distinguishing inchworm and hand-over-hand processive kinesin movement by neck rotation measurements. *Science*, 295(5556) :844–848, January 2002. PMID : 11823639.

- [16] Zeynep Ökten and Manfred Schliwa. Molecular motors : A step dissected. *Nature*, 450(7170) :625–626, November 2007.
- [17] Ronald D. Vale and Ronald A. Milligan. The way things move : Looking under the hood of molecular motor proteins. *Science*, 288(5463) :88–95, July 2000. PMID : 10753125.
- [18] Toshio Ando, Takayuki Uchihashi, and Noriyuki Kodera. High-speed AFM and applications to biomolecular systems. *Annual Review of Biophysics*, 42(1) :393–414, 2013. PMID : 23541159.
- [19] Roop Mallik, Brian C. Carter, Stephanie A. Lex, Stephen J. King, and Steven P. Gross. Cytoplasmic dynein functions as a gear in response to load. *Nature*, 427(6975) :649–652, February 2004.
- [20] H. G. Zot, S. K. Doberstein, and T. D. Pollard. Myosin-i moves actin filaments on a phospholipid substrate : implications for membrane targeting. *The Journal of Cell Biology*, 116(2) :367–376, January 1992. PMID : 1530945.
- [21] Ronald S. Rock, Sarah E. Rice, Amber L. Wells, Thomas J. Purcell, James A. Spudich, and H. Lee Sweeney. Myosin VI is a processive motor with a large step size. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(24) :13655–13659, November 2001. PMID : 11707568.
- [22] M. Yusuf Ali, Hailong Lu, Carol S. Bookwalter, David M. Warshaw, and Kathleen M. Trybus. Myosin v and kinesin act as tethers to enhance each others' processivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(12) :4691–4696, March 2008. PMID : 18347333.
- [23] Sébastien Huet, Erdem Karatekin, Viet Samuel Tran, Isabelle Fanget, Sophie Cribier, and Jean-Pierre Henry. Analysis of transient behavior in complex trajectories : Application to secretory vesicle dynamics. *Biophysical Journal*, 91(9) :3542–3559, November 2006.
- [24] Damien Robert, Thi-Hanh Nguyen, François Gallet, and Claire Wilhelm. In vivo determination of fluctuating forces during endosome trafficking using a combination of active and passive microrheology. *PLoS ONE*, 5(4) :e10046, April 2010.
- [25] Delphine Arcizet, Börn Meier, Erich Sackmann, Joachim O. Rädler, and Doris Heinrich. Temporal analysis of active and passive transport in living cells. *Physical Review Letters*, 101(24) :248103, December 2008.
- [26] 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*, 103(27) :10259–10264, May 2006. PMID : 16793927.
- [27] Soichiro Yamada, Denis Wirtz, and Scot C. Kuo. Mechanics of living cells measured by laser tracking microrheology. *Biophysical Journal*, 78(4) :1736–1747, April 2000.
- [28] 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.
- [29] Adam G. Hendricks, Yale E. Goldman, and Erika L. F. Holzbaur. Chapter fourteen - reconstituting the motility of isolated intracellular cargoes. In Ronald D. Vale, editor, *Methods in Enzymology*, volume Volume 540 of *Reconstituting the Cytoskeleton*, pages 249–262. Academic Press, 2014.
- [30] Alfredo G. Fort, John W. Murray, Nadine Dandachi, Michael W. Davidson, Rolf Dermietzel, Allan W. Wolkoff, and David C. Spray. In vitro motility of liver connexin vesicles along microtubules utilizes kinesin motors. *Journal of Biological Chemistry*, 286(26) :22875–22885, January 2011. PMID : 21536677.

- [31] John W. Murray, Eustratios Bananis, and Allan W. Wolkoff. Reconstitution of ATP-dependent movement of endocytic vesicles along microtubules in vitro : An oscillatory bi-directional process. *Molecular Biology of the Cell*, 11(2) :419–433, January 2000. PMID : 10679004.
- [32] Eustratios Bananis, Sangeeta Nath, Kristie Gordon, Peter Satir, Richard J. Stockert, John W. Murray, and Allan W. Wolkoff. Microtubule-dependent movement of late endocytic vesicles in vitro : Requirements for dynein and kinesin. *Molecular Biology of the Cell*, 15(8) :3688–3697, January 2004. PMID : 15181154.
- [33] Robert Brown. XXVII. a brief account of microscopical observations made in the months of june, july and august 1827, on the particles contained in the pollen of plants; and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies. *Philosophical Magazine Series 2*, 4(21) :161–173, 1828.
- [34] A. Ebnet, R. Godemann, K. Stamer, S. Illenberger, B. Trinczek, E.-M. Mandelkow, and E. Mandelkow. Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum : Implications for alzheimer’s disease. *The Journal of Cell Biology*, 143(3) :777–794, February 1998. PMID : 9813097.
- [35] BILLINGSLEY M and KINCAID R. Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau protein : effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration, May 1997.
- [36] Roshni R. Singaraja, Shinji Hadano, Martina Metzler, Scott Givan, Cheryl L. Wellington, Simon Warby, Anat Yanai, Claire-Anne Gutekunst, Blair R. Leavitt, Hong Yi, Keith Fichter, Lu Gan, Krista McCutcheon, Vikramjit Chopra, Jennifer Michel, Steven M. Hersch, Joh-E. Ikeda, and Michael R. Hayden. HIP14, a novel ankyrin domain-containing protein, links huntingtin to intracellular trafficking and endocytosis. *Human Molecular Genetics*, 11(23) :2815–2828, January 2002. PMID : 12393793.
- [37] Xiao-Jiang Li and Shi-Hua Li. HAP1 and intracellular trafficking. *Trends in Pharmacological Sciences*, 26(1) :1–3, January 2005.
- [38] Roland Naef and Ueli Suter. Impaired intracellular trafficking is a common disease mechanism ofPMP22Point mutations in peripheral neuropathies. *Neurobiology of Disease*, 6(1) :1–14, February 1999.
- [39] Martial Balland, Nicolas Desprat, Delphine Icard, Sophie Féréol, Atef Asnacios, Julien Browaes, Sylvie Hénon, and François Gallet. Power laws in microrheology experiments on living cells : Comparative analysis and modeling. *Physical Review E*, 74(2) :021911, August 2006.
- [40] Alfred Heilbronn. *Eine neue Methode zur Bestimmung der Viskosität lebender Protoplasten*. 1922.
- [41] Pablo Fernández, Lutz Heymann, Albrecht Ott, Nuri Aksel, and Pramod A. Pullarkat. Shear rheology of a cell monolayer. *New Journal of Physics*, 9(11) :419, November 2007.
- [42] Ramsey A. Foty, Gabor Forgacs, Cathie M. Pfleger, and Malcolm S. Steinberg. Liquid properties of embryonic tissues : Measurement of interfacial tensions. *Physical Review Letters*, 72(14) :2298–2301, April 1994.
- [43] 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*, 106(41) :17271–17275, October 2009. PMID : 19805170.

- [44] N. Desprat, A. Guioy, and A. Asnacios. Microplates-based rheometer for a single living cell. *Review of Scientific Instruments*, 77(5) :055111, May 2006.
- [45] Jochen Guck, Revathi Ananthakrishnan, Hamid Mahmood, Tess J. Moon, C. Casey Cunningham, and Josef Käs. The optical stretcher : A novel laser tool to micromanipulate cells. *Biophysical Journal*, 81(2) :767–784, August 2001.
- [46] Robert M Hochmuth. Micropipette aspiration of living cells. *Journal of Biomechanics*, 33(1) :15–22, January 2000.
- [47] Farshid Guilak, John R. Tedrow, and Rainer Burgkart. Viscoelastic properties of the cell nucleus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 269(3) :781–786, March 2000.
- [48] Monica Tanase, Nicolas Biais, and Michael Sheetz. Magnetic tweezers in cell biology. In Yu Li Wang and Dennis E. Discher, editor, *Methods in Cell Biology*, volume Volume 83 of *Cell Mechanics*, pages 473–493. Academic Press, 2007.
- [49] Myriam Allieux-Guérin, Delphine Icard-Arcizet, Christiane Durieux, Sylvie Hénon, François Gallet, Jean-Claude Mevel, Marie-Jo Masse, Marc Tramier, and Maïté Coppey-Moisan. Spatiotemporal analysis of cell response to a rigidity gradient : A quantitative study using multiple optical tweezers. *Biophysical Journal*, 96(1) :238–247, January 2009.
- [50] P. Bohec, F. Gallet, C. Maes, S. Safaverdi, P. Visco, and F. van Wijland. Probing active forces via a fluctuation-dissipation relation : Application to living cells. *EPL (Europhysics Letters)*, 102(5) :50005, June 2013.
- [51] Tatyana G. Kuznetsova, Maria N. Starodubtseva, Nicolai I. Yegorenkov, Sergey A. Chizhik, and Renat I. Zhdanov. Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron*, 38(8) :824–833, December 2007.
- [52] Jordi Alcaraz, Lara Buscemi, Mireia Grabulosa, Xavier Trepas, Ben Fabry, Ramon Farré, and Daniel Navajas. Microrheology of human lung epithelial cells measured by atomic force microscopy. *Biophysical Journal*, 84(3) :2071–2079, March 2003.
- [53] D. Isabey, S. Féréol, A. Caluch, R. Fodil, B. Louis, and G. Pelle. Force distribution on multiple bonds controls the kinetics of adhesion in stretched cells. *Journal of Biomechanics*, 46(2) :307–313, January 2013.
- [54] Andreas R. Bausch, Winfried Möller, and Erich Sackmann. Measurement of local viscoelasticity and forces in living cells by magnetic tweezers. *Biophysical Journal*, 76(1) :573–579, January 1999.
- [55] Damien Robert, Kelly Aubertin, Jean-Claude Bacri, and Claire Wilhelm. Magnetic nanomanipulations inside living cells compared with passive tracking of nanoprobe to get consensus for intracellular mechanics. *Physical Review E*, 85(1) :011905, January 2012.
- [56] Claire Wilhelm. Out-of-equilibrium microrheology inside living cells. *Physical Review Letters*, 101(2) :028101, July 2008.
- [57] Loudjy Chevy, Rémy Colin, Bérengère Abou, and Jean-François Berret. Intracellular microrheology probed by micron-sized wires. *Biomaterials*, 34(27) :6299–6305, September 2013.
- [58] C. Wilhelm, F. Gazeau, and J.-C. Bacri. Rotational magnetic endosome microrheology : Viscoelastic architecture inside living cells. *Physical Review E*, 67(6) :061908, June 2003.
- [59] Marina K. Kuimova, Gokhan Yahioğlu, James A. Levitt, and Klaus Suhling. Molecular rotor measures viscosity of live cells via fluorescence lifetime imaging. *Journal of the American Chemical Society*, 130(21) :6672–6673, May 2008.

- [60] <http://imechanica.org/files/images/Fig1.jpg>.
- [61] C. Wilhelm, C. Billotey, J. Roger, J.N. Pons, J.-C. Bacri, and F. Gazeau. Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. *Biomaterials*, 24(6) :1001–1011, March 2003.
- [62] 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*, 7(11) :1713–1727, November 2012.
- [63] C. Wilhelm, J. Browaeys, A. Ponton, and J.-C. Bacri. Rotational magnetic particles micro-rheology : The maxwellian case. *Physical Review E*, 67(1) :011504, January 2003.
- [64] Sonia Melle, Gerald G. Fuller, and Miguel A. Rubio. Structure and dynamics of magnetorheological fluids in rotating magnetic fields. *Physical Review E*, 61(4) :4111–4117, April 2000.
- [65] J. Y. Chen, N. K. Mak, C. M. N. Yow, M. C. Fung, L. C. Chiu, W. N. Leung, and N. H. Cheung. The binding characteristics and intracellular localization of temoporfin (mTHPC) in myeloid leukemia cells : Phototoxicity and mitochondrial damage. *Photochemistry and Photobiology*, 72(4) :541–547, 2000.
- [66] Dennis E. J. G. J. Dolmans, Dai Fukumura, and Rakesh K. Jain. Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cancer*, 3(5) :380–387, May 2003.
- [67] Ana P. Castano, Tatiana N. Demidova, and Michael R. Hamblin. Mechanisms in photodynamic therapy : part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1(4) :279–293, December 2004.
- [68] Kristian Berg, Solveig Nordstrand, Pål Kristian Selbo, Diem Thuy Thi Tran, Even Angell-Petersen, and Anders Høgset. Disulfonated tetraphenyl chlorin (TPCS2a), a novel photosensitizer developed for clinical utilization of photochemical internalization. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 10(10) :1637, 2011.
- [69] M. d C. Pazos and H. B. Nader. Effect of photodynamic therapy on the extracellular matrix and associated components. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40(8) :1025–1035, August 2007.
- [70] Home - united states biological.
- [71] Plugins - ocardoso.
- [72] Sabrina Marion, Nancy Guillen, Jean-Claude Bacri, and Claire Wilhelm. Acto-myosin cytoskeleton dependent viscosity and shear-thinning behavior of the amoeba cytoplasm. *European Biophysics Journal*, 34(3) :262–272, May 2005.
- [73] Christoph Herold, Cécile Leduc, Robert Stock, Stefan Diez, and Petra Schwille. Long-range transport of giant vesicles along microtubule networks. *ChemPhysChem*, 13(4) :1001–1006, 2012.
- [74] Vladimir Varga, Cecile Leduc, Volker Bormuth, Stefan Diez, and Jonathon Howard. Kinesin-8 motors act cooperatively to mediate length-dependent microtubule depolymerization. *Cell*, 138(6) :1174–1183, September 2009.
- [75] Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates - springer.
- [76] Ana P. Castano, Tatiana N. Demidova, and Michael R. Hamblin. Mechanisms in photodynamic therapy : Part three—Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2(2) :91–106, June 2005.

- [77] Sophie Marchal, Anas Fadloun, Estelle Maugain, Marie-Ange D'Hallewin, François Guillemin, and Lina Bezdetnaya. Necrotic and apoptotic features of cell death in response to foscan® photosensitization of HT29 monolayer and multicell spheroids. *Biochemical Pharmacology*, 69(8) :1167–1176, April 2005.
- [78] Thomas J. Dougherty, Charles J. Gomer, Barbara W. Henderson, Giulio Jori, David Kessel, Mladen Korbelik, Johan Moan, and Qian Peng. Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 90(12) :889–905, June 1998. PMID : 9637138.
- [79] Thérapie photodynamique (TPD).
- [80] M.-H. Teiten, L. Bezdetnaya, P. Morlière, R. Santus, and F. Guillemin. Endoplasmic reticulum and golgi apparatus are the preferential sites of foscan® localisation in cultured tumour cells. *British Journal of Cancer*, 88(1) :146–152, February 2003.
- [81] I. Mickė, D. Dabkevičienė, V. Kirvelienė, and B. Juodka. Caspase-3 but not caspase-8 is activated by mTHPC-PDT and m-THPC-PDT / doxorubicin in murine hepatoma MH22 cells. *BIOLOGIJA*, (1) :51–54, 2005.
- [82] C.M.N Yow, J.Y Chen, N.K Mak, N.H Cheung, and A.W.N Leung. Cellular uptake, sub-cellular localization and photodamaging effect of temoporfin (mTHPC) in nasopharyngeal carcinoma cells : comparison with hematoporphyrin derivative. *Cancer Letters*, 157(2) :123–131, September 2000.
- [83] Kristian Berg and Johan Moan. Lysosomes and microtubules as targets for photochemotherapy of cancer. *Photochemistry and Photobiology*, 65(3) :403–409, March 1997.
- [84] J. C. Stockert, Angeles Juarranz, Angeles Villanueva, and Magdalena Cañete. Photodynamic damage to HeLa cell microtubules induced by thiazine dyes. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 39(1-2) :167–169, November 1996.
- [85] Tiancheng Liu, Lisa Y. Wu, and Clifford E. Berkman. Prostate-specific membrane antigen-targeted photodynamic therapy induces rapid cytoskeletal disruption. *Cancer Letters*, 296(1) :106–112, October 2010.
- [86] Christopher Lee, Samuel S. Wu, and Lan Bo Chen. Photosensitization by 3,3'-dihexyloxacarboxyanine iodide : Specific disruption of microtubules and inactivation of organelle motility. *Cancer Research*, 55(10) :2063–2069, May 1995. PMID : 7743503.
- [87] Marina K. Kuimova, Stanley W. Botchway, Anthony W. Parker, Milan Balaz, Hazel A. Collins, Harry L. Anderson, Klaus Suhling, and Peter R. Ogilby. Imaging intracellular viscosity of a single cell during photoinduced cell death. *Nature Chemistry*, 1(1) :69–73, April 2009.
- [88] Bojana Žegura, Tamara T Lah, and Metka Filipič. The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage. *Toxicology*, 200(1) :59–68, July 2004.
- [89] Wen-Xing Ding, Han-Ming Shen, and Choon-Nam Ong. Critical role of reactive oxygen species formation in microcystin-induced cytoskeleton disruption in primary cultured hepatocytes. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 64(6) :507–519, 2001. PMID : 11732701.
- [90] Giovanni Camussi, Maria C. Deregibus, Stefania Bruno, Vincenzo Cantaluppi, and Luigi Biancone. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney International*, 78(9) :838–848, November 2010.
- [91] Vandhana Muralidharan-Chari, James W. Clancy, Alanna Sedgwick, and Crislyn D'Souza-Schorey. Microvesicles : mediators of extracellular communication during cancer progression. *Journal of Cell Science*, 123(10) :1603–1611, May 2010. PMID : 20445011.

- [92] Kerby Shedden, Xue Tao Xie, Parthapratim Chandaroy, Young Tae Chang, and Gustavo R. Rosania. Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells association with gene expression and chemosensitivity profiles. *Cancer Research*, 63(15) :4331–4337, January 2003. PMID : 12907600.
- [93] Ron R. Allison and Claudio H. Sibata. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers : A clinical review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 7(2) :61–75, June 2010.
- [94] Jan Vaage, Emilio Barberá-Guillem, Robert Abra, Anthony Huang, and Peter Working. Tissue distribution and therapeutic effect of intravenous free or encapsulated liposomal doxorubicin on human prostate carcinoma xenografts. *Cancer*, 73(5) :1478–1484, March 1994.
- [95] Apoptosis inducers - apoptosis and cell cycle | sigma-aldrich.
- [96] Cristina Zanini, Giuliana Giribaldi, Giorgia Mandili, Franco Carta, Nicoletta Crescenzo, Brigitte Bisaro, Alessandra Doria, Luiselda Foglia, Luca Cordero Di Montezemolo, Fabio Timeus, and Franco Turrini. Inhibition of heat shock proteins (HSP) expression by quercetin and differential doxorubicin sensitization in neuroblastoma and ewing’s sarcoma cell lines. *Journal of Neurochemistry*, 103(4) :1344–1354, November 2007.
- [97] Enzyme explorer product application index for superoxide dismutase | sigma-aldrich.
- [98] D. M. Owens and S. M. Keyse. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene*, 26(22) :3203–3213, 2007.
- [99] Masaki Ohmuraya and Ken-ichi Yamamura. The roles of serine protease inhibitor kazal type 1 (SPINK1) in pancreatic diseases. *Experimental Animals*, 60(5) :433–444, 2011.
- [100] Mark A. Rubin, Christopher A. Maher, and Arul M. Chinnaiyan. Common gene rearrangements in prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 29(27) :3659–3668, September 2011. PMID : 21859993.
- [101] Adrienne K. Hammill, Jonathan W. Uhr, and Richard H. Scheuermann. Annexin v staining due to loss of membrane asymmetry can be reversible and precede commitment to apoptotic death. *Experimental Cell Research*, 251(1) :16–21, August 1999.
- [102] Aurélie François, Sophie Marchal, François Guillemin, and Lina Bezdetsnaya. mTHPC-based photodynamic therapy induction of autophagy and apoptosis in cultured cells in relation to mitochondria and endoplasmic reticulum stress. *International Journal of Oncology*, August 2011.
- [103] David Kessel and John J. Reiners. Apoptosis and autophagy after mitochondrial or endoplasmic reticulum photodamage†. *Photochemistry and Photobiology*, 83(5) :1024–1028, September 2007.
- [104] Susan Elmore. Apoptosis : A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4) :495–516, January 2007. PMID : 17562483.
- [105] Mihail Hristov, Wolfgang Erl, Stefan Linder, and Peter C. Weber. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood*, 104(9) :2761–2766, January 2004. PMID : 15242875.
- [106] Oktay Tacar, Pornsak Sriamornsak, and Crispin R. Dass. Doxorubicin : an update on anti-cancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 65(2) :157–170, 2013.
- [107] J. Dai and M. P. Sheetz. Regulation of endocytosis, exocytosis, and shape by membrane tension. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 60 :567–571, January 1995. PMID : 8824429.

- [108] Till Korten, Bert Nitzsche, Chris Gell, Felix Ruhnnow, Cécile Leduc, and Stefan Diez. Fluorescence imaging of single kinesin motors on immobilized microtubules. volume Chapitre 7.



## Résumé

Le trafic intracellulaire est un phénomène naturel essentiel au bon fonctionnement de la cellule. Il permet le transport des molécules biologiques vers leur destination, le renouvellement des membranes des différents compartiments, et il participe à la communication entre le milieu intracellulaire et le milieu extracellulaire. A l'intérieur des cellules, le cytoplasme est un milieu viscoélastique, dans lequel les phénomènes de diffusion libre sont lents. Le trafic intracellulaire fait intervenir des moteurs moléculaires, qui sont capables de convertir de l'énergie chimique en énergie mécanique, afin d'offrir au contenu des vésicules un transport efficace le long des filaments du cytosquelette. Nous proposons deux façons de perturber le trafic intracellulaire afin de mieux comprendre son fonctionnement. La première perturbation est de type mécanique : des endosomes (vésicules de stockage) sont rendus magnétiques par l'internalisation de nanoparticules magnétiques dans des cellules souches mésenchymateuses (MSC), de façon à pouvoir être manipulés mécaniquement. Nous observons le déplacement spontané d'une chaîne d'endosomes magnétiques (2-4 endosomes par chaîne) avant et après un cisaillement effectué grâce à un champ magnétique rotationnel. Nous avons quantifié une légère diminution du trafic intracellulaire après la rotation des chaînes sans observer de modification des propriétés viscoélastiques du cytoplasme. La deuxième perturbation est d'origine photochimique et consiste à exciter une molécule photosensible, qui a été au préalable internalisée dans des cellules cancéreuses (PC3). L'activation de ces molécules trouve des applications en thérapie anticancéreuse. Nous avons observé une forte diminution du trafic intracellulaire après la photo-activation avec en parallèle une faible augmentation de la viscosité. Ceci témoigne d'un impact direct sur les acteurs du trafic intracellulaire. De plus, des observations sur système modèle (microtubules + endosomes) ont montré un accroissement de la fréquence des catastrophes des microtubules suite à la photo-activation. Cette étude à l'échelle de la cellule unique, nous a permis de mettre en évidence un second effet de la photothérapie : l'émission rapide et massive de vésicules extracellulaires.

---

## Summary

The cell cytoplasm is crowded with membrane-delimited compartments, permanently communicating with each other. Such communication is permitted by active transport, also called intracellular trafficking, of vesicles along the cytoskeleton (actin filaments, microtubules), and mediated by molecular motors. In order to perturbate this intracellular trafficking, two different ways to apply controlled physical stresses have been performed. The first perturbation is a mechanical one : we used magnetic endosomes to probe and stress the cell body. To obtain them we internalized magnetic nanoparticles into mesenchymal stem cells (MSC) through the natural endocytosis pathway. These endosomes align into chains in the presence of a magnetic field. The mechanical perturbation then consists in applying a rotational magnetic field on these chains. When comparing the activity before and after a shear stress, we observed a decrease in the intracellular activity. The second perturbation has a photochemical origin, through the excitation of an internalized photosensitizer molecule (m-THPC or TPCS2a). By combining measurements of local cytoplasmic viscosity and intracellular activity, we found that photo-activation induced only a slight increase in viscosity while a massive slowing down of trafficking was observed. These effects are correlated with depolymerization of the microtubule network. The experiments demonstrate that these two photochemical agents have different intracellular impacts. Eventually, we studied a second effect of the photochemical perturbation which is the massive and rapid emission of extracellular vesicles.