



HAL
open science

Outils pour l'imagerie moléculaire

Françoise Geffroy

► **To cite this version:**

Françoise Geffroy. Outils pour l'imagerie moléculaire. Biologie cellulaire. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASL048 . tel-04165525

HAL Id: tel-04165525

<https://theses.hal.science/tel-04165525>

Submitted on 19 Jul 2023

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.

Outils pour l'imagerie Moléculaire

Tools for Molecular Imaging

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 568, signalisations et réseaux intégratifs en biologie (Biosigne)
Spécialité de doctorat : Biologie Moléculaire et Cellulaire
Graduate School : Life Sciences and Health. Référent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Molecular Imaging Research Center** (Université Paris-Saclay, CEA), sous la direction de **Mehdi KABANI**, Chargé de recherches CNRS, le co-encadrement de **Sébastien MERIAUX**, Directeur de recherche CEA, **NeuroSpin**

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 15 juin 2023, par

Françoise GEFROY

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Aloïse MABONDZO Directeur de recherche, CEA Saclay	Président
Sophie PINEL Chargée de recherche, HDR, Université de Lorraine	Rapportrice et Examinatrice
Hélène CASTEL Directrice de recherche, Université de Normandie	Rapportrice et Examinatrice
Nadine PEYRIERAS Directrice de recherche, Université Paris 13	Examinatrice
Sandra PREVERAL Chercheur, CEA Cadarache	Examinatrice

Titre : Outils pour l'imagerie Moléculaire

Mots clés : Magnetosomes, Imagerie Moleculaire, Culture Cellulaire 3D, Transparisation

Résumé : Cette thèse en Validation des Acquis de l'Expérience (VAE) reprend l'ensemble de mon parcours professionnel, puis mon travail au sein de NeuroSpin. Le sujet qui me tient particulièrement à cœur est l'utilisation de magnétosomes comme agents de contraste pour l'imagerie moléculaire par IRM et leur fonctionnalisation pour devenir des outils diagnostiques voire thérapeutiques. Deux chapitres, décrivant les projets Mefisto et Orano dans lesquels je suis impliquée, sont consacrés à cette thématique de recherche. Le projet Mefisto concerne l'étude du glioblastome, une tumeur cérébrale de grade IV, projet pour lequel les magnétosomes sont fonctionnalisés avec un peptide RGD ciblant les intégrines $\alpha\beta3$, surexprimées par les cellules tumorales et les cellules endothéliales des vaisseaux tumoraux. Le projet Orano concerne quant à lui l'étude du cancer du sein pour laquelle les

magnétosomes sont fonctionnalisés avec un anticorps Trastuzumab ciblant le récepteur HER2. Dans ces deux chapitres, je présente l'ensemble de mes contributions méthodologiques pour étudier les interactions entre les magnétosomes et leurs cibles, depuis les cultures cellulaires jusqu'aux coupes histologiques, en passant par l'induction des modèles animaux pour les acquisitions IRM in vivo. Dans les deux chapitres suivants, je présente les développements méthodologiques dont je poursuis la réalisation au sein de NeuroSpin après les avoir initiés. Un chapitre concerne la culture cellulaire en 3 dimensions avec la mise en place de protocoles pour générer des sphéroïdes mono et bi-cellulaires. Le dernier chapitre concerne les méthodes de transparisation des organes, afin de pouvoir réaliser des études d'histologie en 3 dimensions.

Title : Tools for molecular imaging

Keywords : Magnetosomes, Molecular Imaging, 3D Cell Culture, Clearing

Abstract : This thesis in Validation of Acquired Experience (VAE) covers my entire professional career and my work at NeuroSpin. The subject I am particularly interested in is the use of magnetosomes as contrast agents for molecular imaging by MRI and their functionalization to become diagnostic and therapeutic tools. Two chapters, describing the Mefisto and Orano projects in which I am involved, are devoted to this research theme. The Mefisto project concerns the study of glioblastoma, a grade IV brain tumor, for which magnetosomes are functionalized with an RGD peptide targeting $\alpha\beta3$ integrins, overexpressed by tumor cells and endothelial cells of tumor vessels. The Orano project concerns the study of breast cancer for which

magnetosomes are functionalized with a Trastuzumab antibody targeting the HER2 receptor. In these two chapters, I present all my methodological contributions to study the interactions between magnetosomes and their targets, from cell cultures to histological sections, through the induction of animal models for in vivo MRI acquisitions. In the next two chapters, I present the methodological developments that I am pursuing at NeuroSpin after having initiated them. One chapter deals with cell culture in 3 dimensions with the implementation of protocols to generate single and double cell spheroids. The last chapter concerns the methods of transparentization of organs, in order to be able to carry out histology studies in 3 dimensions.



Outils d'imagerie moléculaire

Françoise Geffroy

Thèse de doctorat soutenue le 15 juin 2023 à Saclay

Membres du Jury :

Dr. Aloïse Mabondzo	Directeur de recherche, CEA Saclay	Président
Dr. Hélène Castel	Directrice de recherche, Université de Rouen Normandie	Rapportrice
Dr. Sophie Pinel	Chargée de recherche, HDR, Université de Lorraine	Rapportrice
Dr. Sandra Preveral	Chercheur, CEA Cadarache	Examinatrice
Dr. Nadine Peyreiras	Directeur de recherche, Université Paris Saclay	Examinatrice
Dr. Sébastien Mériaux	Directeur de recherche, CEA Saclay	Encadrant de thèse
Dr Mehdi Kabani	Chargé de recherche, CNRS Fontenay aux Roses	Directeur de thèse

Remerciements

- Je souhaite remercier de tout coeur les personnes qui m'ont soutenu pour cette thèse :
- Cyril Poupon et Sébastien Mériaux pour mon passage Annexe I, prélude à ce doctorat.
 - Sébastien Mériaux pour m'avoir incité à réaliser cette thèse de doctorat.
 - Mehdi Kabani pour avoir accepté sans réserve d'être mon directeur de thèse.
 - Mme Pinel et Mme Castel les rapportrices de ma thèse, Mme Peyrieras, Mme Preveral et Mr Mabondzo les examinateurs.
 - Mme Blondeau, la directrice de la VAE à l'Université Paris-Saclay, pour son aide lors du changement d'école doctorale.
 - Dr Nüsse, directeur de l'école doctorale pour avoir validé mon dossier, Mr Surdi le gestionnaire pour son aide lors du changement d'école doctorale.
 - Mes collègues chercheurs toujours si pleins d'idées : Luisa Ciobanu, Fawzi Boumezbeur, Davide Boido, Timo Van Kerkoele ...
 - Tous mes anciens étudiants, si stimulants ... mention spéciale à Allegra, Iléana et Olivier, Laura, Solène, Alfredo, Julien, Céline et Benjamin.
 - Tous mes nouveaux étudiants, si surprenants ...
 - Tous mes collègues du support sans qui le travail serait bien plus compliqué, mention spéciale à Denis Fournier et Maryline Hévin.
 - Tous mes collègues du café du matin, toujours pris dans la bonne humeur
 - Mon collègue et ami Erwan Selingue, pour sa bonne volonté et sa confiance
 - Ma collègue et amie Ioana Ungureanu pour son soutien moral.
 - Tous les membres de ma famille et ceux de mes amis désireux de venir le jour de la soutenance, bien que de l'avis général, ils n'y comprennent rien.
 - Tous les membres de ma famille et ceux de mes amis qui ne peuvent pas venir mais pas uniquement parce qu'ils n'y comprennent rien.
 - Ma filleule Justine pour la confiance qu'elle m'accorde et pour toujours penser que je vais réaliser ce que je veux, ses parents pour leur soutien indéfectible.
 - Maman et Pascale, Danielle et Dominique, mes sœurs. Mes pensées vont également à mon père et à GMJ.

Cette rédaction de thèse a été rendu possible par le meilleur anti-stress qui soit :

Arsouille la Fripouille !



Parcours Professionnel

Ce manuscrit présente ma thèse en Validation des Acquis de l'Expérience (VAE), expérience que j'ai accumulée au cours de ma carrière, depuis 1991 jusqu'à aujourd'hui. Ma carrière s'est déroulée tout d'abord dans l'industrie, dans plusieurs entreprises, puis au Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives (CEA), à NeuroSpin, où j'occupe actuellement le poste d'ingénieur-chercheur.

Le fil conducteur de ma vie professionnelle a été de mettre au point des méthodes et des techniques expérimentales, que j'ai appliquées sur de très nombreuses thématiques, que ce soit la pharmacologie générale, l'immunologie, la pharmacologie cardio-vasculaire, l'oncologie, la culture cellulaire ou l'histologie. Je me suis formée sur ces thèmes variés, par la bibliographie et en suivant des cours, durant toutes ces années, en partageant parfois l'expérience de quelques collègues plus expérimentés. J'ai aussi eu l'occasion de former à mon tour de jeunes collègues et des étudiants dont j'ai été responsable.

Titulaire d'un Diplôme Universitaire de Technologie (DUT, niveau baccalauréat +2) en analyses biologiques, j'ai débuté ma carrière professionnelle en 1992, dans une société de recherche contractuelle (CRO, pour Contract Research Organization), le CERB, située près de Bourges. Une CRO est une entreprise qui fournit des services dans le domaine de la recherche biomédicale pour l'industrie pharmaceutique ou biotechnologique. En l'occurrence, durant mes 3 années au CERB, j'ai réalisé la mise en place d'un catalogue d'études en pharmacologie générale, comprenant 80 tests différents pour proposer un panel varié de méthodes d'investigation à nos clients. Les thématiques étudiées étaient extrêmement variées. Les tests développés permettaient d'étudier le comportement, la douleur, la pharmacologie digestive, la pharmacologie respiratoire, la thrombose, la coagulation et l'inflammation. Les tests étaient classiques (test d'Irwin, test de coagulation, test de transit intestinal...) ou plus récents (bronchospasme, télémétrie...). Les nombreux modèles animaux utilisés pour réaliser ces tests (rongeurs, lagomorphes, cobayes, furets) m'ont permis d'acquérir une solide expérience en expérimentation animale.

J'ai intégré la société L. Lafon en 1995, sur un poste en pharmacologie cardio-vasculaire. À cette occasion, j'ai pu participer au développement de candidats médicaments sur trois thématiques principales (anti-thrombotiques, anti-agrégants plaquettaires et anti-coagulants), sur des modèles *in vivo* et *in vitro*. J'ai acquis des compétences en chirurgie cardio-vasculaire et j'ai même mis au point un modèle de cœur isolé. Suite à l'acquisition d'un appareil de cytométrie en flux, j'ai été en charge de développer des tests à l'aide de cette technologie, dont je suis devenue la référente pour le laboratoire.

Après quelques années, l'entreprise a été cédée à une société américaine, Cephalon, qui ne souhaitait pas poursuivre les thématiques de recherche cardio-vasculaire et qui a dissous le groupe en 2003. À ma demande, j'ai poursuivi mes activités en cytométrie en flux dans une nouvelle unité, le département d'Oncologie. J'ai acquis dans ce nouveau poste des compétences en cancérologie (côlon, peau), en culture cellulaire et en protéomique.

Ces thématiques étaient nouvelles pour moi et j'ai ressenti le besoin de reprendre des études, en cours du soir. J'ai obtenu un diplôme de niveau baccalauréat +4 (RNCP niveau 2) au Centre National des Arts et Métiers (CNAM). J'avais réalisé toutes les unités de valeur du cycle C pour l'obtention d'un diplôme d'ingénieur lorsque la société Cephalon s'est séparée de l'ensemble des activités de recherche en 2006. J'ai donc dû stopper ma formation pour rechercher un nouvel emploi.

En 2006, j'ai rejoint la société Sanofi pour un contrat de 6 mois. J'ai ainsi pu utiliser mes compétences en culture cellulaire, et j'ai également acquis une expérience en patch clamp. J'ai enchaîné avec un nouvel emploi dans une autre CRO (Cellvax), ce qui m'a permis de travailler sur de nouveaux modèles de cancer (pancréas, poumon, prostate, cerveau, lymphome). J'ai également acquis à cette occasion quelques compétences en gestion de projet et une première expérience en histologie.

Puis j'ai intégré une société de recherche de candidat médicament (Endotis Pharma), dans le groupe pharmacocinétique, en 2008. J'ai été embauchée pour mettre en place un test de thrombose que j'avais utilisé lors de mes expériences précédentes, mais j'ai aussi développé des méthodes d'étude de l'angiogenèse et continué à travailler sur des thématiques de cancer.

Après cette expérience en pharmacocinétique, je suis arrivée au CEA, à NeuroSpin, en 2009, en intérim pour 18 mois sur le projet Iseult. NeuroSpin est un centre de neuroimagerie par Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), utilisant des scanners IRM à très haut champ magnétique, pour l'étude du cerveau en conditions normale et pathologique. Le projet Iseult consistait en un partenariat entre NeuroSpin et la société Guerbet, pour travailler au développement d'une nouvelle génération de produits de contraste IRM fonctionnalisés pour le diagnostic et le suivi de traitement de pathologies cérébrales (glioblastome, accident vasculaire, maladie d'Alzheimer).

J'ai été en charge de la culture cellulaire et de la mise en place au laboratoire du modèle animal de glioblastome. J'ai également été responsable de l'acquisition des données histologiques nécessaires pour valider les données d'IRM, après le départ de ma collègue en charge de ces techniques. J'ai poursuivi mon contrat d'intérimaire par un contrat court chez Guerbet, détachée à NeuroSpin sur le même poste. J'ai finalement intégré le Laboratoire de Biologie Intégrée (LBI) de NeuroSpin en tant que titulaire d'un poste de technicienne supérieure en culture cellulaire et en histologie, à la fin de l'année 2011. La dissolution de ce laboratoire en 2012, suite à une réorganisation de l'unité, m'a conduit à intégrer l'équipe MIDAS (Molecular Imaging and Delivery of Active Substances), qui faisait partie de l'unité UNIRS (Unité d'Imagerie par Résonance Magnétique à très haut champ et de Spectroscopie). Depuis 2019, cette unité a évolué en une unité mixte de recherche appelée BAOBAB (UMR 9027, Université Paris-Saclay/CNRS/CEA), dont je fais toujours partie au sein du laboratoire CIEL (Cerebral Imaging and Engineering Laboratory).

J'ai été nommée Ingénieur-chercheur en 2018, en reconnaissance des différentes activités de recherche que j'ai menées au cours des projets scientifiques auxquels j'ai participé. Je suis aujourd'hui responsable des laboratoires d'histologie et de culture cellulaire à NeuroSpin, et parmi mes principales activités, je développe des modèles cellulaires et animaux pour mes collègues physiciens de l'IRM et dans le cadre de collaborations scientifiques.

J'ai décidé de faire un doctorat en VAE pour deux raisons principales :

- À titre personnel, comme un challenge, pour faire une synthèse de mes réalisations passées et relier différents projets entre eux, ainsi que poursuivre des projets qui me tiennent à cœur, comme l'histologie 3D et l'utilisation des magnétosomes pour des applications biomédicales. Cela me permettra aussi de renforcer par un diplôme de doctorat mon statut cadre au CEA obtenu en 2018.
- À titre professionnel, pour avoir la possibilité de faire des demandes de financement, de porter des projets, de continuer de développer des méthodes qui me paraissent importantes pour les thématiques de recherche de mon laboratoire CIEL et de NeuroSpin.

Sommaire

Sommaire

1 Introduction

2 Mefisto

3 Orano

4 Culture cellulaire 3D

5 Transparency

6 Conclusion

A Annexes *in vitro*

B Annexes *in vivo* et *ex vivo*

C Annexes Projets 3D

D Annexe Références

Liste des abréviations, des sigles et des symboles

Bibliographie

Liste des figures

Table des matières

Chapitre 1

Introduction

- 1.1 NeuroSpin, centre de neuroimagerie par IRM haut champ
- 1.2 L'IRM moléculaire
- 1.3 Projets auxquels j'ai participé à NeuroSpin
- 1.4 Première partie du manuscrit
 - 1.4.1 Projet Mefisto
 - 1.4.2 Projet Orano
- 1.5 Deuxième Partie du manuscrit
 - 1.5.1 Culture cellulaire 3D
 - 1.5.2 Transparency

Dans cette introduction, je vais présenter mon travail à NeuroSpin, dont certains résultats et développements spécifiques font l'objet de ce manuscrit de thèse. Tout d'abord, une description de l'infrastructure, puis de la thématique de recherche principale dans laquelle s'inscrivent mes travaux de recherche (l'imagerie moléculaire) et enfin les différents projets auxquels j'ai participé et ceux qui sont en cours.

1.1 NeuroSpin, centre de neuroimagerie par IRM haut champ

NeuroSpin est un département de l'Institut des Sciences du Vivant Frédéric Joliot (Institut Joliot) qui fait partie de la Direction de la Recherche Fondamentale (DRF) du CEA. Au sein de l'Institut Joliot, NeuroSpin est le centre de neuroimagerie par Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), utilisant des scanners IRM à très haut champ magnétique pour l'étude du cerveau en conditions normale et pathologique. Ouvert en 2007, NeuroSpin possède actuellement une plateforme unique au monde de scanners IRM, constituée de 3 systèmes cliniques (3 T, 7 T et 11,7 T en cours d'installation) et 3 systèmes précliniques dédiés rongeurs (7 T, 11,7 T et 17,2 T).

L'architecture du bâtiment de NeuroSpin est unique, en forme d'arches (Figure 1.1), permettant d'accueillir chacune un scanner IRM.

NeuroSpin comporte 5 entités de recherche :

- Unité Mixte de Recherche BAOBAB (Building large instruments for neuroimaging : from population imaging to ultra-high magnetic fields), sous tutelle CEA, CNRS et Université Paris-Saclay, née de la fusion des deux entités de recherche UNIRS (Unité d'Imagerie par Résonance Magnétique à très haut champ et de Spectroscopie) et UNATI (Unité d'Analyse et Traitement de l'Information)
- Unité Mixte de Recherche UNICOG (Neuroimagerie Cognitive), sous tutelle CEA, Inserm et Université Paris-Saclay
- Unité de Recherche UNIACT (NeuroImagerie Applicative Clinique et Translationnelle), rattachée à l'UMR 1141
- Unité Mixte MIND (Models and Inference for Neuroimaging Data), sous tutelle Inria et CEA
- Groupe d'Imagerie Neurofonctionnelle (GIN-IMN), situé à Bordeaux et rattaché à l'UMR 5293

1.2 L'IRM moléculaire

L'imagerie IRM à très haut champ magnétique (7 T et au-delà) permet d'obtenir des images avec un meilleur rapport signal-sur-bruit, comparativement à celles acquises à l'hôpital avec des scanners conventionnels à plus bas champ (1,5 T et 3 T). Ce gain de sensibilité, combiné au développement d'agents de contraste IRM à très forte relaxivité (*i.e.*, qui présentent un fort pouvoir contrastant), a permis d'établir l'imagerie moléculaire par IRM comme nouvelle thématique de recherche à NeuroSpin, initialement dans le cadre du projet Iseult. Ce projet, qui a permis l'installation à NeuroSpin de 2 systèmes IRM uniques au



FIG. 1.1 – Arches de NeuroSpin

monde (à 17,2 T pour l'imagerie préclinique et à 11,7 T pour l'imagerie clinique), a également profité du partenariat avec la société pharmaceutique Guerbet pour développer une nouvelle génération de molécules pouvant être des produits de contraste IRM fonctionnalisés, dédiés au diagnostic et au suivi de traitement de pathologies cérébrales comme le glioblastome, l'accident vasculaire ou la maladie d'Alzheimer, comme illustré par la Figure 1.2. L'imagerie moléculaire est une modalité d'imagerie qui vise à déterminer directement l'expression de certaines molécules d'intérêt, en les ciblant grâce à des agents de contraste combinant une forte affinité pour les molécules visées et un fort pouvoir contrastant pour la technique d'imagerie utilisée (dans notre cas l'IRM). Les différentes recherches menées en imagerie moléculaire ont donc pour but principal de développer de nouveaux agents de contraste fonctionnalisés, permettant un meilleur diagnostic d'une pathologie, et d'améliorer la délivrance *in situ* d'agents thérapeutiques, et ainsi de proposer des thérapies innovantes à base de ces agents dits théranostiques.

1.3 Projets auxquels j'ai participé à NeuroSpin

Les projets sur lesquels je suis impliquée comprennent soit une composante *in vitro* (culture cellulaire), soit une composante *in vivo* (modèles animaux) ou une composante *ex vivo* (histologie), et très souvent les trois composantes combinées.

Le premier projet auquel j'ai participé à NeuroSpin est donc le projet Iseult, sur l'IRM moléculaire préclinique à très haut champ (7 T puis à 17,2 T). À cette occasion, j'ai développé le laboratoire de culture cellulaire et mis en place un modèle de glioblastome humain (U87MG) chez la souris. Travaillant en partenariat avec les chimistes de la société Guerbet, 3 chercheurs et 3 étudiants en thèse de NeuroSpin ont étudié des agents de contraste différents, tous fonctionnalisés pour réaliser l'imagerie moléculaire par IRM de biomarqueurs spécifiques du glioblastome. Les trois projets ont consisté à étudier le potentiel de ces nouveaux agents de contraste pour le diagnostic précoce par IRM haut champ du glioblastome, en utilisant des

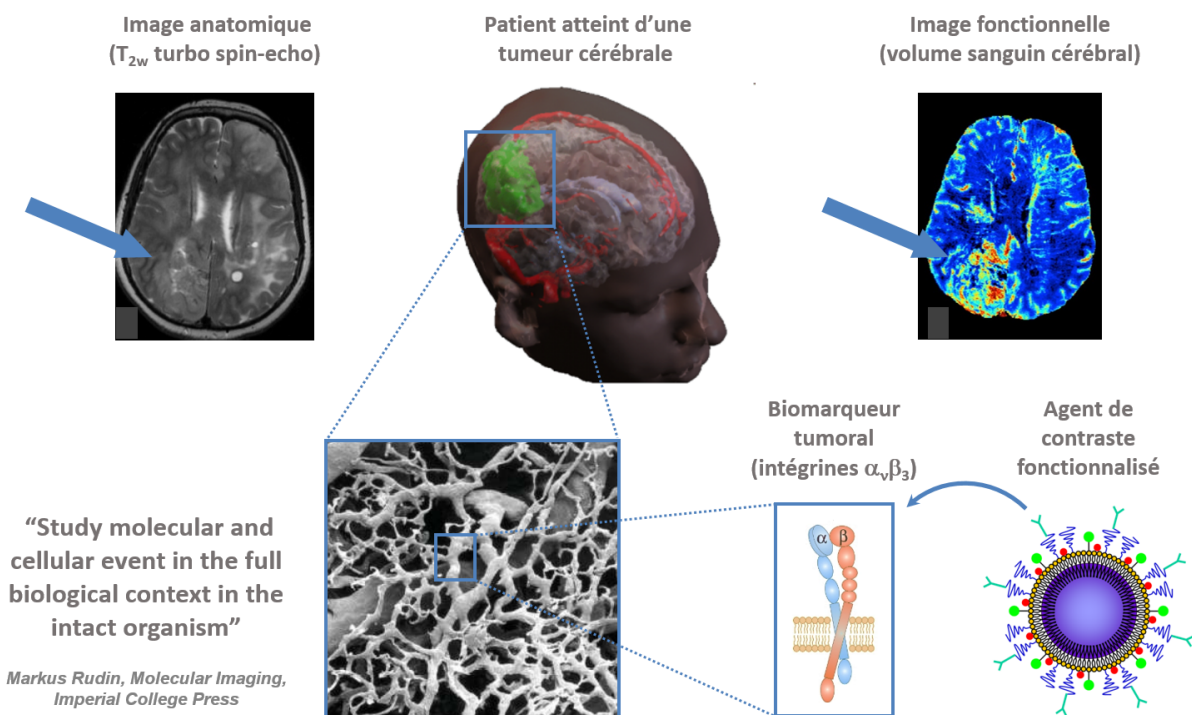


FIG. 1.2 – Illustration du principe de l'imagerie moléculaire sur un patient atteint de tumeur cérébrale : en plus des informations anatomique et fonctionnelle, l'IRM moléculaire permet de détecter la présence de biomarqueurs tumoraux, grâce à des agents de contraste fonctionnalisés.

souris porteuses de tumeurs cérébrales (U87MG). Je fais partie des auteurs des publications qui en ont découlé, décrivant les agents de contraste de type émulsions à base de Fluor-19 [Giraudeau *et al.*, 2013] ou de Gadolinium [Marty *et al.*, 2011], ainsi que des liposomes contenant des agents de type CEST (Chemical Exchange Saturation Transfert) [Flament *et al.*, 2013].

En parallèle du projet Iseult, j'ai également participé à l'étude des effets des très hauts champs magnétiques (17,2 T) sur le cerveau sain [Yamaguchi-Sekino *et al.*, 2012], avant de passer sur les modèles pathologiques.

J'ai ensuite travaillé sur des modèles de glioblastome chez le rat, pour le développement non plus de produits de contraste mais de séquences IRM innovantes pour améliorer le diagnostic [Valette *et al.*, 2012, Reynaud *et al.*, 2013, Iima *et al.*, 2014], ainsi que pour étudier la délivrance de nanoparticules après perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique [Conti *et al.*, 2017].

L'arrivée du scanner IRM préclinique à 17,2 T m'a permis également de réaliser des images IRM de cellules uniques, en utilisant un modèle animal particulier, la limace de mer *Aplysia Californica*. Cet animal possède la particularité de ne pas avoir de système nerveux central mais plusieurs ganglions neuronaux dédiés à des activités particulières (se nourrir, se déplacer. . .). L'extraction de la plus grosse cellule neurale du ganglion buccal (R2, 0,5 mm de diamètre), que j'ai réalisée sous loupe binoculaire, a permis d'obtenir des images de cellule unique vivante, à 17,2 T [Jelescu *et al.*, 2014], afin d'étudier les mouvements de l'eau au niveau cellulaire lors d'une activation neuronale.

Dans toutes les publications citées, je fais partie des auteurs.

Dans l'équipe MIDAS, dédiée à l'imagerie moléculaire par IRM de pathologies cérébrales, nous avons collaboré avec plusieurs équipes de chimistes qui développent de nouvelles générations d'agents de contraste IRM fonctionnalisés [Richard *et al.*, 2016], principalement pour cibler des tumeurs cérébrales. En effet, l'équipe MIDAS s'est spécialisée dans l'étude de modèles pathologiques de cancer du cerveau. J'ai d'ailleurs pu travailler sur d'autres types de tumeurs cérébrales que le glioblastome U87MG, notamment des modèles de tumeurs invasives, comme le gliome pontique intrinsèque diffus humain (DIPG, pour Diffuse Intrinsic Pontine Glioma) [Plessier *et al.*, 2017] ou le gliome murin (GL261) utilisé par des collaborateurs d'une équipe du CEA Saclay pour développer un vaccin antitumoral (résultats non publiés).

Depuis la fin du projet Iseult, j'ai eu l'occasion de collaborer plusieurs fois avec une équipe de l'Institut de Biosciences et Biotechnologies d'Aix-Marseille (BIAM) du CEA de Cadarache. Avec cette équipe MEM (Laboratoire de Microbiologie Environnementale et Moléculaire), j'ai participé à la réalisation de deux projets de recherche sur les applications biomédicales des magnétosomes (Mefisto et Orano) que je vais détailler dans ce manuscrit. De plus, un nouveau projet (RADIO-MAGNET) a été déposé pour une demande de financement auprès de l'ITMO Cancer afin de continuer cette collaboration à l'avenir.

Enfin, j'ai également travaillé toutes ces années sur d'autres modèles de pathologies traumatiques ou neurodégénératives, telles que l'accident vasculaire cérébral (ou stroke en anglais) [Grinberg *et al.*, 2014], la maladie d'Alzheimer [Gerstenmayer *et al.*, 2017, Gerstenmayer *et al.*, 2018], la sclérose en plaque ou le vieillissement cérébral. Sur les animaux sains, j'ai notamment mis au point, dans le cadre du projet de microscopie 3-photons, un quadruple marquage pour la caractérisation de sous-populations de neurones exprimant des protéines en lien avec le Calcium (calrétinine, calbindin, parvalbumin), et j'ai participé à la mise au point d'un atlas cérébral chez le rat [Barrière *et al.*, 2019].

Ma thèse en VAE reprend une partie des réalisations effectuées à NeuroSpin, le manuscrit s'articulant en deux parties :

- une première partie dans laquelle je présente les projets réalisés en collaboration avec l'équipe MEM, concernant le développement et l'utilisation d'agents de contraste biogéniques (les magnétosomes) pour des applications d'imagerie moléculaire par IRM de tumeurs ;
- une deuxième partie dans laquelle je présente mes développements méthodologiques, en culture cellulaire et en histologie, notamment la mise au point de protocoles de transparençation des tissus pour l'imagerie par microscopie optique en 2D et en 3D.

1.4 Première partie du manuscrit

La première partie comprend deux chapitres, correspondant à deux projets de recherche en IRM moléculaire menés en collaboration avec l'équipe MEM : le projet Mefisto, financé en 2012 par l'ANR (Agence Nationale de la Recherche) et qui s'est achevé en 2017, et le projet Orano, financé par la société OranoMed et qui est toujours en cours.

1.4.1 Projet Mefisto

Le projet Mefisto est un projet réalisé entre 2012 et 2017 en collaboration avec l'équipe MEM du BIAM au CEA Cadarache, équipe dirigée à l'époque par David Pignol.

L'équipe MEM est une équipe dont les thématiques de recherche sont focalisées sur l'étude des bactéries magnétotactiques et des nanoparticules de fer qu'elles produisent, les magnétosomes. Outre les applications biomédicales, les chercheurs du MEM ont développé par exemple des méthodes de dépollution des sols à l'aide de magnétosomes fonctionnalisés, produits par des bactéries magnétotactiques génétiquement modifiées [Ginet *et al.*, 2011].

Sébastien Mériaux, responsable de l'équipe MIDAS et chercheur en imagerie moléculaire par IRM, a débuté en 2011 une collaboration avec David Pignol afin de tester les magnétosomes comme agents de contraste pour l'IRM à très haut champ magnétique. Une première étude a montré les excellentes propriétés des magnétosomes en termes de pouvoir contrastant (notamment une relaxivité transverse très élevée) [Mériaux *et al.*, 2015], ce qui a conduit au montage du projet Mefisto financé en 2012 par le programme P2N (Nanotechnologies et Nanosystèmes) de l'ANR. Ce projet s'est alors focalisé sur l'utilisation de magnétosomes, fonctionnalisés à l'aide d'un peptide (RGD) pour cibler des cellules tumorales humaines de glioblastome (cancer du cerveau de grade IV).

Ce projet a comporté plusieurs phases :

- le design et la production par l'équipe MEM des magnétosomes fonctionnalisés à partir de bactéries magnétotactiques génétiquement modifiées ;
- la réalisation par l'équipe MIDAS de l'étude d'affinité des magnétosomes pour leur cible, réalisée *in vitro* avec des cellules tumorales de glioblastome humain (U87MG) ;
- l'étude d'imagerie moléculaire *in vivo* par IRM du ciblage tumoral suite à l'injection des magnétosomes fonctionnalisés à des souris porteuses de glioblastome (tumeurs U87MG) ;
- l'étude histologique pour valider *ex vivo* les résultats d'imagerie.

Mon implication a consisté en la mise en place des modèles *in vitro* et *in vivo* de glioblastome humain, nécessaires pour étudier les propriétés de ciblage tumoral des magnétosomes développés par l'équipe MEM, ainsi que la réalisation de l'étude histologique sur les souris U87 ayant reçu une injection de magnétosomes fonctionnalisés. Les acquisitions et les analyses des données IRM ont été réalisées par Marianne Boucher, étudiante en thèse, avec l'aide d'Erwan Selingue, technicien en expérimentation animale de l'équipe MIDAS, sous la supervision de Sébastien Mériaux. 10 communications [Preveral *et al.*, 2014, Ginet *et al.*, 2014, Boucher *et al.*, 2014, Boucher *et al.*, 2015a, Boucher *et al.*, 2015b, Geffroy *et al.*, 2015, Boucher *et al.*, 2016a, Boucher *et al.*, 2016b, Geffroy *et al.*, 2016, Boucher *et al.*, 2017a] ont été présentées dans diverses congrès scientifiques internationaux (ENM, European Nanomedicine Meeting ; ESB, European Society of Biomaterials ; ISMRM, International Society For Magnetic Resonance In Medicine ; MTB, International Meeting on Magnetotactic Bacteria ; WMIC, World Molecular Imaging Congress). Les deux posters que j'ai présentés comme premier auteur lors des conférences WMIC 2015 et 2016 sont fournis en Annexe A.1. Enfin, l'ensemble des résultats du projet a été publié dans le journal Biomaterials [Boucher *et al.*, 2017b], publication qui a reçu le **2016 Biomaterials Outstanding Paper Award**.

1.4.2 Projet Orano

Ce projet est également un projet en collaboration avec l'équipe MEM du BIAM au CEA Cadarache, équipe dirigée par Damien Faivre. L'objectif principal de ce projet, financé par la société OranoMed, est de développer une nouvelle construction de magnétosomes permettant de cibler le récepteur de l'herceptine, la protéine HER2 pour Human Epidermal Growth Factor Receptor-2, fortement impliquée dans certains types de cancer, de sein notamment. La fonctionnalisation des magnétosomes est réalisée, non pas par modification génétique de la bactérie magnétotactique comme pour le projet Mefisto, mais par greffage chimique à la membrane du magnétosome d'un anticorps, le Trastuzumab qui cible les récepteurs HER2, couplé à un chélateur de Plomb TCMC (TCMC, pour 2-(4-isothiocyanatobenzyl)-1,4,7,10-tetraaza-1,4,7,10-tetra-(2-carbamoylmethyl)cyclododecane) permettant de fixer du Plomb 212 radioactif.

Cette nouvelle construction de magnétosomes fonctionnalisés devrait permettre à la fois de cibler les cellules tumorales exprimant HER2, mais également de les détruire grâce au rayonnement énergétique de particules alpha émis par le Plomb 212.

La fonctionnalisation du magnétosome à l'aide du Trastuzumab-TCMC a été réalisée avec succès par l'équipe MEM, mais ce travail n'est pas du domaine public, donc je n'en parlerai pas dans ce manuscrit. Mon implication dans ce projet concerne à la fois les études *in vitro* d'interactions des magnétosomes fonctionnalisés avec des lignées de cellules cancéreuses exprimant ou non le récepteur HER2, mais également le développement des modèles tumoraux *in vivo* utilisés pour les expériences d'IRM moléculaire, ainsi que les immunomarquages réalisés sur les pièces anatomiques *ex vivo*.

1.5 Deuxième Partie du manuscrit

Cette deuxième partie concerne des développements méthodologiques que j'ai réalisés en imagerie moléculaire. En effet, l'IRM moléculaire nécessite différentes étapes en amont et en aval des études par IRM.

En amont, il est indispensable de valider la biocompatibilité de l'agent de contraste et la spécificité du ciblage, mais également de déterminer la cinétique d'interaction entre l'agent IRM et sa cible sur des modèles cellulaires en 2D puis en 3D, afin de réduire le nombre d'animaux utilisés *in vivo* (règles des 3R en éthique animale). En aval, il est nécessaire de valider les résultats d'imagerie *in vivo* par des analyses histologiques extensives, notamment pour confirmer la biodistribution et le ciblage des biomarqueurs d'intérêt observés en IRM, ce qui nécessite de développer des protocoles de multiples marquages immunohistochimiques et des protocoles de transparisation pour l'imagerie optique en 3D. En effet, on ne voit pas l'agent de contraste directement en IRM mais son influence sur les molécules d'eau environnantes, donc cette étape de cross-validation des résultats IRM par l'histologie 3D est primordiale pour confirmer le potentiel diagnostique des agents de contraste IRM fonctionnalisés en cours de développement.

Cette partie comprend deux chapitres. Le premier chapitre, baptisé Culture cellulaire 3D, décrit les modèles *in vitro* 3D que j'ai développés à NeuroSpin. Ces modèles ont pour but de mieux représenter *in vitro* la réalité du développement tumoral que les modèles 2D. En effet, il est maintenant avéré que de nombreux candidats médicaments efficaces sur des modèles *in*

vitro 2D échouent à traiter les tumeurs lors des essais *in vivo*. Le deuxième chapitre, baptisé Transparency, décrit les méthodes que j'ai utilisées ou que j'ai moi-même développées, pour rendre les cerveaux transparents, et pouvoir faire de l'imagerie optique en 3D afin de valider les résultats obtenus avec l'imagerie IRM.

1.5.1 Culture cellulaire 3D

Ce projet est le développement d'une demande initiale d'un doctorant (Julien Flament) pour le projet Iseult, supervisé par Fawzi Boumezbeur. J'ai développé à cette occasion une technique *in vitro* de culture de tumeurs cérébrales en 3D (glioblastome U87MG). Ce travail a fait l'objet d'un poster présenté lors de la conférence WMIC 2010 [Geffroy *et al.*, 2010] (voir Annexe C.1).

Par la suite, j'ai continué d'utiliser ce modèle de tumeurs en 3D, notamment lors du projet Mefisto, pour visualiser l'incorporation des magnétosomes en 3D.

J'ai également développé de nouveaux modèles 3D, notamment un modèle de sphéroïdes 3D bi-cellulaires, combinant des cellules endothéliales et des cellules tumorales, pour imiter de façon plus pertinente la composition des tumeurs *in vivo*, riches en néo-vaisseaux. J'ai caractérisé ce modèle de sphéroïdes 3D bi-cellulaires et je l'ai utilisé pour tester l'incorporation des magnétosomes en comparant avec le modèle mono-cellulaire. J'ai également réalisé un modèle intermédiaire des microsphéroïdes, sous agitation, afin d'étudier l'incorporation des magnétosomes sur ces modèles plus petits, mimant les premiers stades du développement tumoral. J'ai enfin amélioré mon modèle bi-cellulaire en transfectant les lignées cellulaires avec des plasmides porteurs de gènes de protéines fluorescentes, de façon à identifier le positionnement des cellules entre elles ainsi que leur devenir, mais également pour visualiser leur ciblage par les particules fonctionnalisées. J'ai utilisé par la suite mes connaissances acquises lors du projet Mefisto, et lors du développement du modèle bi-cellulaire, pour commencer à travailler sur d'autres lignées de cellules tumorales, comme le cancer de sein (SKBR3, MDA-MB-231) et de la peau (A431).

1.5.2 Transparency

J'ai mis en place ce projet dans le but de faire de l'imagerie 3D des tissus en microscopie de fluorescence et comparer avec l'imagerie moléculaire par IRM. En effet, les résultats obtenus par IRM sont encore aujourd'hui principalement validés par des études histologiques utilisant l'imagerie en microscopie, mais en 2D alors que les images IRM acquises sont en 3D. Ce projet a commencé dès 2013, en mettant en place au laboratoire des méthodes déjà publiées (iDisco, CUBIC, Clarity) [Chung *et al.*, 2013, Renier *et al.*, 2014, Lloyd-Lewis *et al.*, 2016] et en développant moi-même de nouvelles solutions dédiées à nos thématiques (G-clear). Je continue à l'heure actuelle d'améliorer les techniques de perméabilisation des tissus, afin de visualiser en profondeur les immunomarquages. J'ai commencé par travailler sur la visualisation des ganglions d'aplysie en 3D, puis celle des vaisseaux sanguins de cerveaux de rongeurs, avant de poursuivre par la visualisation 3D de cellules gliales, microgliales... J'ai également commencé d'utiliser ces méthodes pour visualiser en 3D l'agent de contraste fonctionnalisé développé lors du projet Mefisto (magnétosomes RGD), dans les sphéroïdes de cellules tumorales ou sur des coupes épaisses de cerveaux de rongeurs (coupes optiques en profondeur).

Chapitre 2

Mefisto

- 2.1 Contexte du Projet Mefisto
 - 2.1.1 Pathologie étudiée : le glioblastome
 - 2.1.2 Quelques notions d'IRM
 - 2.1.3 Bactéries magnétotactiques
 - 2.1.4 Magnétosomes non fonctionnalisés comme agents de contraste IRM
 - 2.1.5 Fonctionnalisation des Magnétosomes
- 2.2 Résultats *in vitro*
 - 2.2.1 Ciblage : comparaison des Magnétosomes Venus et VRGD
 - 2.2.2 Incorporation
 - 2.2.3 Immunomarquages *in vitro* en 2D
 - Anti-GFP et Anti-AMB1
 - Devenir des magnétosomes dans les cellules
 - 2.2.4 Coloration Perl's en 2D
 - 2.2.5 Cinétiques d'incorporation des magnétosomes *in vitro*
 - Un traitement, cinétique sur 72 heures
 - Multi-traitements, cinétique sur 72 heures
 - 2.2.6 IRM sur cellules *in vitro*
 - 2.2.7 Modèles cellulaires 3D
- 2.3 Résultats *in vivo*
 - 2.3.1 Modèle tumoral
 - 2.3.2 Résultats IRM *in vivo*
 - Etudes préalables
 - Etudes avec les magnétosomes AMB1V et AMB1VRGD
- 2.4 Résultats *ex vivo*
 - 2.4.1 Histologie
 - AMB1V versus AMB1VRGD : Cerveau
 - AMB1V versus AMB1VRGD : Foie
 - AMB1-VRGD : cellules gliales, microgliales, macrophages
 - AMB1-VRGD : Néo-vaisseaux
 - AMB1-VRGD : Marqueurs de cellules souches
 - AMB1-VRGD : Marqueurs d'EMT

AMB1-VRGD : Marqueurs de métabolisme

AMB1-VRGD : Multiples marquages avec les marqueurs CSC, d'EMT
et du métabolisme

2.4.2 Toxicologie

2.5 Conclusion et perspectives

2.1 Contexte du Projet Mefisto

2.1.1 Pathologie étudiée : le glioblastome

Le projet Mefisto a pour but de développer un nouveau type d'agent de contraste issu de bactéries magnétotactiques, le magnétosome, en lui ajoutant une spécificité par la fonctionnalisation de la membrane du magnétosome avec un peptide, visant une cible sur-exprimée par certaines cellules cancéreuses.

La cible visée est une intégrine, $\alpha_v\beta_3$, qui est sur-exprimée dans de nombreux cancers notamment les tumeurs cérébrales de grade IV, comme le glioblastome multiforme (GBM) [Mattern *et al.*, 2005], et dont l'un des rôles est de renforcer la néo-angiogenèse et la capacité à se déplacer des cellules tumorales.

Les GBM sont des cancers très agressifs, incurables, avec une médiane de survie toujours faible (environ deux ans) [Tan *et al.*, 2020], en dépit des découvertes de la dernière décennie concernant la physiopathologie de ce type tumoral [Simińska *et al.*, 2021].

Des études génétiques chez les patients pour découvrir les principales mutations en jeu [Brennan *et al.*, 2013, Soomro *et al.*, 2017], des études de biologie moléculaire et de protéomique pour découvrir de nouveaux biomarqueurs [Parsons *et al.*, 2008], des études sur les voies de signalisation et la progression tumorale [Ohgaki et Kleihues, 2007] ont bien décrit l'hétérogénéité des glioblastomes, entre patients et même entre les cellules d'une même tumeur, illustrant l'énorme difficulté à traiter ces cancers.

L'étude du microenvironnement tumoral, notamment les interactions avec les cellules immunitaires [Chen et Hambardzumyan, 2018], ont montré la complexité des relations entre cellules tumorales et cellules gliales, microgliales, immunitaires et endothéliales qui les entourent. Les cellules tumorales forment aussi un réseau d'interconnexions entre elles, via des nanotubulures, beaucoup plus étendu que ce qui était identifié précédemment, avec de fortes interactions avec le microenvironnement [Osswald *et al.*, 2015].

L'angiogenèse est un facteur particulièrement important pour le développement rapide de ces tumeurs [Folkman *et al.*, 1971], et par conséquent une cible privilégiée dans la lutte contre le glioblastome [Vajkoczy et Menger, 2004]. En effet les glioblastomes sont très vascularisés, avec des vaisseaux sanguins anormaux, une tortuosité importante et un réseau disfonctionnel, ainsi qu'une production importante de cytokines et de molécules stimulant l'angiogenèse [Carmeliet, 2003, Jain *et al.*, 2007, Ahir *et al.*, 2020]. De nombreuses stratégies visant à réduire l'angiogenèse ont été développées au cours du temps [Lakka et Rao, 2008] mais la résistance aux thérapies anti-angiogéniques fait que des cibles thérapeutiques sont toujours recherchées [Le Joncour *et al.*, 2021, Buccarelli *et al.*, 2022].

Les intégrines forment une famille de récepteurs fortement impliqués dans la néo-angiogenèse tumorale de par leur rôle d'interaction avec la matrice extracellulaire et sont donc particulièrement intéressantes à cibler [Brooks *et al.*, 1994, Lorger *et al.*, 2009].

La transdifférenciation de cellules tumorales en vaisseaux sanguins et le mimétisme vasculaire ont été découverts assez récemment [El Hallani *et al.*, 2010], ouvrant de nouveaux champs de recherche concernant le ciblage de l'angiogenèse tumorale comme voie thérapeutique, notamment en nanomédecine [Feng *et al.*, 2015, Clavreul *et al.*, 2019].

L'étude de l'hétérogénéité tumorale a aussi permis de découvrir l'importance des cellules souches tumorales (CSCs, pour Cancer Stem Cells), qui sont notamment impliquées dans l'agressivité des tumeurs [Yan *et al.*, 2011], la résistance aux traitements par radio ou chimiothérapies [Cheray *et al.*, 2017, De Francesco *et al.*, 2018], la résurgence tumorale [Liu *et al.*, 2009], et la transdifférenciation en cellules endothéliales [Yan *et al.*, 2017].

Les CSCs sont difficiles à identifier car comme les cellules souches neurales (NSCs, pour Neural Stem Cells), aucun biomarqueur n'a encore été découvert permettant de les détecter toutes avec certitude. Les NSCs ont été identifiées depuis la fin des années 1990 [Reynolds et Weiss, 1992, Palmer *et al.*, 1997, Uchida *et al.*, 2000], *in vitro* par leur capacité à se diviser et à former de nouveaux neurones et astrocytes. Les NSCs expriment différents récepteurs, mais toutes les NSCs n'expriment pas les mêmes récepteurs [Rehfeld *et al.*, 2021]. Elles sont retrouvées dans différentes structures [Rispoli *et al.*, 2014]. La notion de niche, réservoir de cellules souches neurales [Robins *et al.*, 2013, Codega *et al.*, 2014, Rojczyk-Gołąbiewska *et al.*, 2014] met en lumière les interactions des NSCs avec le microenvironnement. Il en va de même avec les CSCs, qui expriment une grande variété de biomarqueurs [Cheray *et al.*, 2017], correspondant à différentes voies de signalisation [Samoilova *et al.*, 2018], avec également une notion de niche dans les tumeurs, exprimant un plus grand nombre de marqueurs des cellules souches à différents endroits (zones hypoxiques, niches périvasculaires. . .) [Schiffer *et al.*, 2014, Gritsenko *et al.*, 2017]. De très nombreux paramètres (énergétiques, métaboliques, oxygénation. . .) [De Francesco *et al.*, 2018], le microenvironnement ou encore les cellules circulantes jouent un rôle dans le développement des CSCs.

Le nombre d'études ciblant ces CSCs augmente de façon exponentielle depuis ces dernières années, sans pour autant avoir, à ce jour, permis d'identifier une stratégie thérapeutique satisfaisante, même si certains biomarqueurs sont prometteurs [Chow *et al.*, 2017, Yao *et al.*, 2018]. Les voies de signalisation qui sont impliquées dans la résistance des CSCs aux traitements notamment la radiothérapie sont des voies d'études prometteuses [Séhédic *et al.*, 2015].

Parmi les voies de signalisation fréquemment étudiées, la transition entre cellules endothéliales et mésenchymateuses (EMT, pour Epithelial-Mesenchymal Transition), très présente dans les tumeurs de haut grade, favorise la migration cellulaire ainsi que la résistance aux thérapies [Nguemgo Kouam *et al.*, 2018, Ziegler *et al.*, 2019, Zhao *et al.*, 2020]. La transition EMT est en lien avec le métabolisme du fer dans les cellules [Torti et Torti, 2020, Müller *et al.*, 2020], ce qui ouvre de nouvelles pistes de traitement, par le blocage du fer dans les lysosomes [Mai *et al.*, 2017] ou par induction de la ferroptose, mort cellulaire liée à l'excès de fer via la production d'un excès de peroxydation des lipides, provoquant la rupture des membranes cellulaires [Rodriguez *et al.*, 2022]. Cependant, ces voies de signalisation sont également retrouvées fortement exprimées dans les cellules gliales réactives (astrogliose et microgliose), limitant encore l'identification des CSCs et cellules métastatiques [Bourne *et al.*, 2010, Rao *et al.*, 2018, Hewer *et al.*, 2020].

Les traitements combinatoires alliant chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie, voire même immunothérapie et nanomédecine, sont toujours insuffisants pour traiter les tumeurs cérébrales. Diagnostic tardif, difficulté à délimiter la tumeur durant la résection chirurgicale, franchissement de la barrière hémato-encéphalique très limité pour certaines molécules thérapeutiques, prolifération de CSCs, hétérogénéité entre les patients... constituent autant de points d'acchopement importants. Le développement de nouveaux outils diagnostiques, de

nouveaux biomarqueurs et de nouvelles approches thérapeutiques est toujours essentiel pour améliorer la prise en charge des patients atteints de GBM [Wen *et al.*, 2020, Muir *et al.*, 2020].

Comme indiqué précédemment, le projet Mefisto a pour but de développer une nouvelle génération d'agents théranostiques dédiés au GBM, en fonctionnalisant la membrane de magnétosomes avec un peptide ciblant spécifiquement les intégrines $\alpha_v\beta_3$ qui sont sur-exprimées par les cellules tumorales et les cellules endothéliales des vaisseaux tumoraux néo-angiogéniques. Le peptide RGD, composé de trois acides aminés (Arginine, Glycine et Acide aspartique), est bien connu pour cibler spécifiquement les intégrines $\alpha_v\beta_3$ [D'Souza *et al.*, 1991].

En accrochant, par génie génétique, un peptide RGD sur une protéine de la membrane bilipidique des magnétosomes, nous pouvons donc obtenir un agent de contraste IRM fonctionnalisé, ciblant préférentiellement les tumeurs de type GBM et permettant, non seulement d'identifier les cellules tumorales et les vaisseaux tumoraux néo-angiogéniques, mais aussi potentiellement de les traiter par photothermie, hyperthermie magnétique et radiothérapie.

L'idée commune à ces différentes stratégies est de transférer de l'énergie (provenant d'un rayonnement) aux nanocristaux de fer constituant le cœur des magnétosomes, qui vont à leur tour retransférer cette énergie aux tissus environnants, énergie qui va principalement se dissiper sous forme de chaleur. La photothermie utilise un laser pour engendrer une stimulation lumineuse au niveau de la tumeur. L'utilisation de nanomagnétosomes (NPs), absorbantes dans la bonne bande de fréquence optique, permet d'accroître localement la température. De même, la radiothérapie utilise un faisceau de rayons X haute énergie qui, une fois absorbé par les NPs accumulées dans la tumeur, va engendrer une augmentation locale de la température. L'hyperthermie magnétique quant à elle délivre localement une énergie thermique, en appliquant un champ magnétique radiofréquence alternatif qui va exciter les NPs magnétiques accumulées dans la tumeur.

2.1.2 Quelques notions d'IRM

Fondée sur le principe de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) est une technique d'imagerie très utilisée en clinique pour visualiser les tissus mous (cerveau, tendon, ligament...).

Schématiquement, le phénomène de RMN s'appuie sur l'existence d'un spin nucléaire, qui est une caractéristique intrinsèque de certains atomes (comme les atomes d'hydrogène contenus dans une molécule d'eau), dont le noyau atomique possède un proton isolé (non lié à un neutron). Ce spin nucléaire, qui vaut $\frac{1}{2}$ dans le cas du proton, possède un moment magnétique associé. Ainsi, l'application d'un champ magnétique externe intense (appelé B_0) permet d'aligner les moments magnétiques des différents spins nucléaires, créant ainsi une aimantation magnétique résultante.

Il est alors possible de « manipuler » cette aimantation magnétique en transférant de l'énergie aux spins nucléaires grâce à l'émission d'une onde radiofréquence, dont la fréquence doit correspondre exactement à la fréquence de précession du noyau atomique, dite fréquence de Larmor : $\nu_0 = \gamma B_0$, avec γ le rapport gyromagnétique du noyau atomique ($= 42,576 \text{ MHz} \cdot \text{T}^{-1}$ dans le cas de l'hydrogène). Lorsque l'excitation des spins nucléaires par l'onde radiofréquence est stoppée, ceux-ci retournent à leur état d'équilibre avec un mécanisme de relaxation qui

se caractérise par deux temps de relaxation distincts, le temps de relaxation longitudinale T_1 (également appelé temps de relaxation spin-réseau) et le temps de relaxation transverse T_2 (également appelé temps de relaxation spin-spin). Ces temps de relaxation T_1 et T_2 sont des caractéristiques intrinsèques des tissus que l'on cherche à imager : ils dépendent de l'environnement et de la mobilité des molécules dans lesquelles sont engagés les noyaux d'hydrogène.

L'intérêt de l'IRM est qu'en jouant sur des paramètres propres à la séquence d'acquisition de l'image, notamment le temps d'écho TE (temps séparant l'excitation et la mesure du signal IRM) et le temps de répétition TR (temps séparant deux excitations des spins nucléaires), il est possible de pondérer l'image obtenue en fonction des valeurs de T_1 , T_2 ou de la densité de protons, et ainsi de générer différents types de contraste entre les différentes structures dans l'image (Figure 2.1).

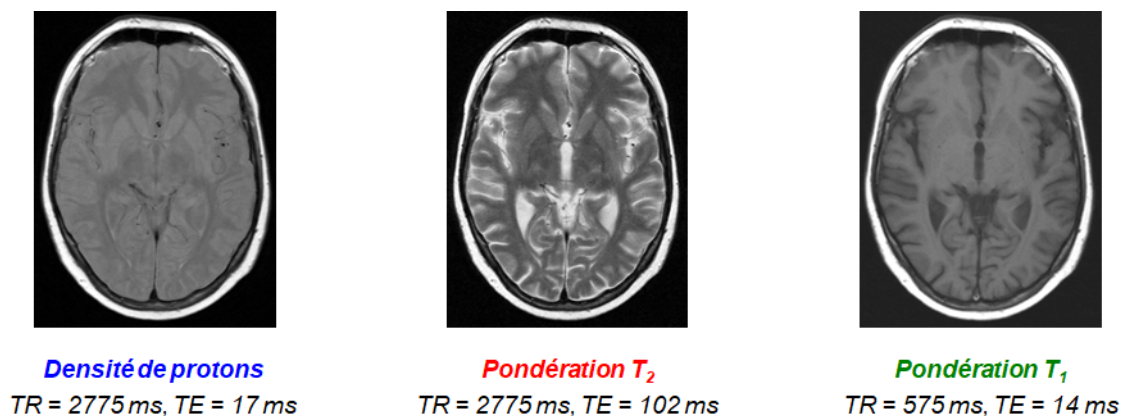


FIG. 2.1 – Différents contrastes IRM entre les structures cérébrales obtenus pour différents types de pondération, en fonction des paramètres de séquence IRM utilisés

Un autre intérêt de l'IRM est sa dimension multimodale : en effet, en jouant sur l'ensemble des paramètres d'acquisition (TE, TR, gradients, bandes passantes d'excitation et de réception...), il est possible d'accéder à différents types d'information (structurelle, fonctionnelle...) avec la même méthode d'imagerie. Les exemples ci-dessous permettent d'illustrer quelques unes des images qu'il est possible d'obtenir.

- Une image anatomique IRM (Figure 2.2-a) permet de visualiser dans un organe la répartition et l'organisation des différents tissus, grâce aux contrastes différents entre les structures provenant des différences entre les contenus en eau et les temps de relaxation (T_1 et T_2).
- L'imagerie de diffusion par IRM (Figure 2.2-b) est une technique fondée sur la détection des mouvements des molécules d'eau dans les tissus : un déplacement anisotrope est détecté lorsque les mouvements des molécules d'eau sont contraints dans une structure de type fibre, comme par exemple les faisceaux de matière blanche dans le cerveau, ce qui permet de réaliser des images de tractographie des faisceaux d'axones.
- L'imagerie fonctionnelle par IRM (Figure 2.2-c) utilise le couplage neurovasculaire, et plus spécifiquement un signal dépendant du niveau d'oxygénation cérébrale (signal

BOLD, pour Blood Oxygenation Level Dependent), pour détecter les zones cérébrales actives.

- La spectroscopie IRM (Figure 2.2-d) permet de détecter dans des régions spécifiques d'un organe les différentes molécules présentes, chaque molécule possédant un spectre RMN distinct, mais également de quantifier la concentration de chacune d'entre elles à condition d'être décelables.
- L'imagerie moléculaire par IRM (Figure 2.2-e) permet de visualiser *in vivo* des biomarqueurs de façon non invasive, grâce à leur ciblage spécifique par des agents de contraste fonctionnalisés qui modifient le signal IRM détecté.

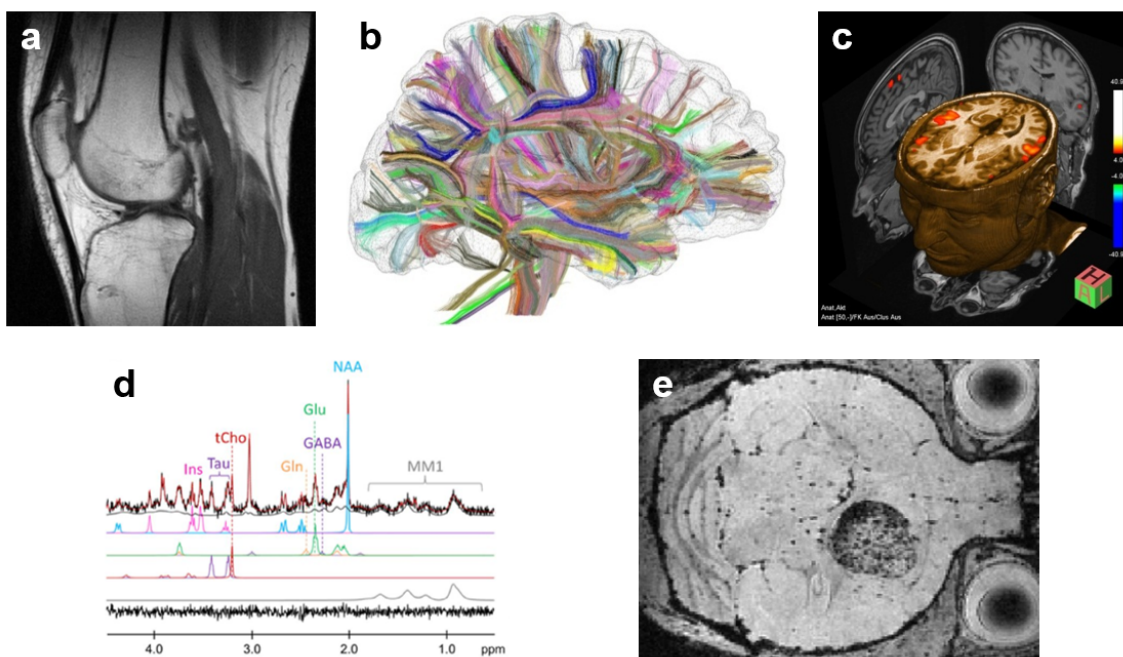


FIG. 2.2 – IRM multimodale : illustration des types d'information accessible (a- IRM anatomique, b- tractographie par IRM, c- IRM fonctionnelle, d- spectroscopie IRM, e- IRM moléculaire)

Dans ce manuscrit de thèse, nous présentons des résultats d'IRM anatomique et moléculaire obtenus grâce à des scanners précliniques à très haut champ magnétique (7 T, 11,7 T et 17,2 T). Les séquences IRM utilisées pour obtenir ces résultats sont présentées à l'Annexe B.1.

2.1.3 Bactéries magnétotactiques

Les bactéries magnétotactiques (MTB, pour Magnetotactic Bacteria) sont des bactéries Gram-, découvertes puis décrites par Salvatore Bellini en 1963 [Bellini, 1963], à partir d'échantillons collectés à Pavie, en Italie. Ces bactéries ont ensuite été re-découvertes de façon indépendante par Richard Blakemore en 1975 [Blakemore *et al.*, 1979] puis largement étudiées pour leurs propriétés magnétiques [Frankel *et al.*, 1981, Wajnberg *et al.*, 1986, Frankel et Blakemore, 1988, Lins de Barros *et al.*, 1990].

Désormais, elle sont observées partout sur la planète, dans des environnements humides. Elles ont la particularité de produire des nano-aimants dans des organelles spécialisées (les magnétosomes), leur permettant de s'orienter par rapport au champ magnétique terrestre. Cette propriété, appelée magnétotactisme, leur confère un avantage évolutif en matière de recherche de nourriture et d'un environnement leur convenant en termes d'oxygène et de température [Blakemore, 1982, Lefèvre et Bazylinski, 2013]. En effet, elles vivent pour la plupart dans les zones peu oxygénées, à la limite des zones anoxiques. L'orientation par rapport au champ magnétique terrestre leur permet de diminuer la zone de recherche de leur habitat, passant d'une zone de recherche tri-dimensionnelle à une zone uni-dimensionnelle, et donc d'économiser de l'énergie.

Les magnétosomes sont composés d'une couche bi-lipidique et protéique enfermant un cristal magnétique d'oxyde de fer (magnétite, maghémite...), ou de sulfite de fer (greigite), de taille nanométrique (20-120 nm), régulier et très reproductible entre magnétosomes. Les cristaux peuvent être de différentes formes selon la souche bactérienne qui les produit (en forme de balle de fusil, de cubo-octaèdre, parallélépipède...) [Bazylinski *et al.*, 1994, Schüler, 2008]. Les magnétosomes sont souvent alignés sous forme de chaîne dans la bactérie, comme illustré sur la Figure 2.3.

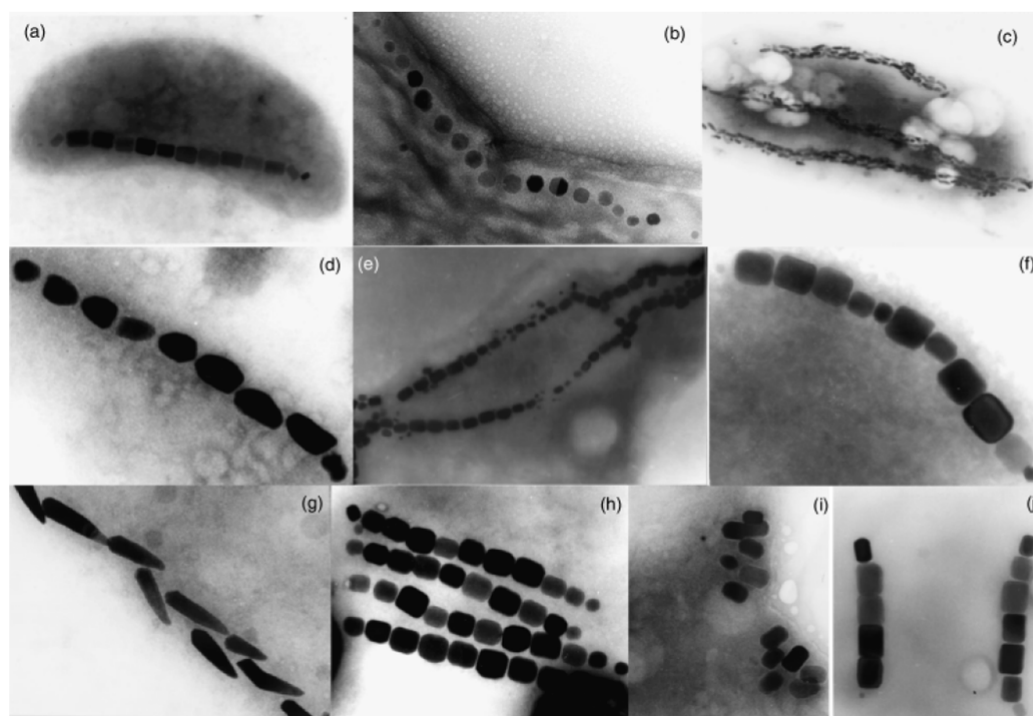


FIG. 2.3 – Images en microscopie électronique de MTB, illustrant les différentes formes de magnétosomes dans les bactéries. Les magnétosomes peuvent être cubo-octaédriques (b), allongés (a,e,f,h,i,j) ou en forme de balle de fusil (c,d,g). Ils peuvent former une ou plusieurs chaînes dans les bactéries. (Source : adapté de [Schüler, 2008])

Depuis 1979, une douzaine de souches de bactéries magnétotactiques sont cultivées en laboratoire [Blakemore *et al.*, 1979, Dieudonné *et al.*, 2019]. Le génome de certaines souches a été entièrement décodé, ce qui a permis d'utiliser des outils de génie génétique pour faire exprimer à la membrane des magnétosomes certaines protéines d'intérêt. Les applications de ces magnétosomes fonctionnalisés obtenus par modification génétique sont très variées, allant de la dépollution à la recherche biomédicale [Matsunaga et Arakaki, 2007, Chen *et al.*, 2016, Vargas *et al.*, 2018]. En effet, la biocompatibilité des magnétosomes est excellente [Xiang *et al.*, 2007, Sun *et al.*, 2010] et les magnétosomes extraits de ces bactéries génétiquement modifiées ont été testés dès 1987 comme transporteurs d'enzymes [Matsunaga et Kamiya, 1987, Yoshino *et al.*, 2009], puis d'acides nucléiques [Takeyama *et al.*, 1995, Yoza *et al.*, 2002, Ota *et al.*, 2003, Tanaka *et al.*, 2003], ou bien encore d'anticorps [Nakamura *et al.*, 1993, Wacker *et al.*, 2007]. Les magnétosomes ont aussi été utilisés comme outils de détection ou de sélection que ce soit d'auto-anticorps [Sugamata *et al.*, 2013], de cellules immunitaires [Takahashi *et al.*, 2009] ou progénitrices [Kuhara *et al.*, 2009].

L'utilisation des magnétosomes dans la lutte contre le cancer s'est rapidement développée, comme transporteurs de molécules anti-cancéreuses [Hopkin, 2004, Lu et Martel, 2006, Sun *et al.*, 2011], ainsi que comme agents de contraste pour le diagnostic et le suivi de traitement [Felfoul *et al.*, 2007, Martel *et al.*, 2009]. Les magnétosomes peuvent également être utilisés comme outil thérapeutique à part entière, par hyperthermie magnétique [Alphandéry *et al.*, 2013] ou photothermie [Plan Sangnier *et al.*, 2018, Hafsi *et al.*, 2020], voire par une approche multimodale [Nima *et al.*, 2019], que ce soit pour lutter contre différents types de cancer [Mannucci *et al.*, 2014, Lee *et al.*, 2015, Orlando *et al.*, 2016, Le Fèvre *et al.*, 2017, Al Faruque *et al.*, 2020] ou contre les bactéries résistantes [Kim *et al.*, 2013]. Le nombre d'applications et de publications relatives à l'utilisation des magnétosomes ne cesse d'augmenter depuis ces dix dernières années, illustrant l'intérêt croissant dans la communauté internationale pour cette technologie.

Nos collaborateurs de l'équipe MEM du BIAM travaillent depuis plus de 15 ans sur les applications potentielles des magnétosomes et ils ont notamment réussi à modifier génétiquement la souche *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 (AMB-1 pour *Magnetospirillum magneticum* AMB-1) pour se servir des magnétosomes comme outils de dépollution des sols, ciblant la dégradation d'un pesticide (le paraoxonde) de type organophosphate par une enzyme [Ginet *et al.*, 2011].

2.1.4 Magnétosomes non fonctionnalisés comme agents de contraste IRM

Suite au travail effectué par l'équipe MEM du BIAM sur la dépollution des sols, nous nous sommes intéressés à NeuroSpin spécifiquement aux propriétés magnétiques des magnétosomes pour leur utilisation comme agents de contraste IRM. Un agent de contraste IRM est une molécule qui va perturber les propriétés de relaxation des molécules d'eau environnantes, ce qui va permettre sa détection sur des images IRM pondérées en T_1 ou en T_2 . Parmi les agents de contraste IRM les plus étudiés, les nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques (SPIONs, pour SuperParamagnetic Iron Oxyde Nanoparticles) sont particulièrement intéressantes car elles possèdent une relaxivité transverse très élevée, ce qui signifie un fort pouvoir de perturbation du temps de relaxation transverse T_2 des molécules d'eau environnantes, et par conséquent une sensibilité de détection importante.

La formation des magnétosomes au sein des bactéries magnétotactiques est soumise à une régulation génétique stricte, ce qui affecte la taille et la forme du cristal d'oxyde de fer, avec une distribution de taille étroite et des structures cristallines élevées. Ces propriétés conduisent à des relaxivités transverses extrêmement élevées, notamment en comparaison avec des nanoparticules produites chimiquement de même taille, pour lesquelles la régularité du cristal est plus difficile à contrôler. Ainsi, les propriétés magnétiques des bactéries magnétotactiques et des magnétosomes ont été décrites, notamment dans différentes études réalisées avec des scanners IRM cliniques à 1,5 ou 3 T [Hartung *et al.*, 2007, Benoit *et al.*, 2009, Hu *et al.*, 2010].

Dans une première étude, nous avons cherché à caractériser les propriétés magnétiques des magnétosomes à très haut champ magnétique en utilisant notre scanner préclinique à 17,2 T [Mériaux *et al.*, 2015], par comparaison avec des SPIONs commercialisées par Guerbet (Endorem[®]). L'Endorem[®] est un ferumoxide synthétisé chimiquement, composé de nanoparticules d'oxyde de fer recouvertes de dextran et d'une taille similaire aux magnétosomes (50-100 nm). Les magnétosomes utilisés ont été extraits à partir de la souche *Magnetovibrio blakemorei* MV-1, leur forme étant de type allongé prismatique (polyèdre dont les bases sont deux polygones égaux à côtés parallèles et dont les faces latérales sont des parallélogrammes). Leur taille a été mesurée à $53,6 \pm 7,2$ nm par microscopie électronique et leur relaxivité transverse a été estimée à 17,2 T par cartographie T₂ ($r_2 = 728 \pm 35$ mM⁻¹.s⁻¹). La relaxivité transverse des magnétosomes MV-1 s'est avérée 4 fois meilleure que celle du ferumoxide ($r_2 = 173 \pm 15$ mM⁻¹.s⁻¹), permettant d'obtenir une sensibilité de détection de l'ordre de 100 nM en fer, contre 440 nM pour l'Endorem[®].

Les résultats obtenus avec les magnétosomes MV-1 ont été comparés avec ceux obtenus avec les magnétosomes AMB-1, de forme cubo-octaédrique. La relaxivité transverse des magnétosomes issus de MV-1 s'est avérée 1,5 fois plus grande que celle des magnétosomes issus de AMB-1 ($r_2 = 489 \pm 26$ mM⁻¹.s⁻¹), confirmant l'influence de la forme du nanocristal d'oxyde de fer sur les propriétés magnétiques du magnétosome.

Une étude *in vivo* a également été réalisée en injectant à des souris un volume de 100 μ L de magnétosomes issus de MV-1 ou d'Endorem[®], le groupe contrôle correspondant à l'injection à des souris du même volume de sérum physiologique. Deux doses ont été testées : une dose de 200 μ mol.kg⁻¹ de fer habituellement utilisée dans les études précliniques et une dose de 20 μ mol.kg⁻¹ de fer correspondant aux doses de SPIONs utilisées en clinique. Des images IRM à haute résolution spatiale (90×90×180 μ m³) ont été acquises à 17,2 T pour détecter les magnétosomes circulant dans la vascularisation sanguine après injection, et reconstruire ainsi des angiogrammes de cerveaux de souris en 3D. Un rehaussement de la vascularisation cérébrale a été mis en évidence avec les magnétosomes MV-1 dès l'injection de la dose clinique de 20 μ mol.kg⁻¹ de fer, alors qu'aucun rehaussement n'a été détecté après injection d'Endorem[®] à la même dose ou pour le groupe contrôle (voir Annexe B.2). À plus forte dose (200 μ mol.kg⁻¹ de fer), un rehaussement similaire de la vascularisation cérébrale a été obtenu après injection de l'Endorem[®] et des magnétosomes MV-1, les angiogrammes avec les magnétosomes montrant des zones saturées correspondant probablement aux plus gros vaisseaux.

Cette étude confirme l'intérêt des magnétosomes comme agents de contraste IRM, notamment à très haut champ magnétique (17,2 T) avec une sensibilité de détection de l'ordre de 100 nM en fer, compatible avec des protocoles d'imagerie moléculaire.

2.1.5 Fonctionnalisation des Magnétosomes

Comme indiqué au Paragraphe 2.1, le peptide RGD est un ligand des intégrines $\alpha_v\beta_3$, qui sont sur-exprimées dans les GBM par les cellules tumorales et les cellules endothéliales des vaisseaux tumoraux néo-angiogéniques. L'équipe MEM du BIAM a donc modifié génétiquement la souche de bactéries magnétotactiques AMB-1, pour que les magnétosomes produits expriment à leur membrane le peptide RGD ainsi qu'un fluorochrome (Venus), une protéine proche de la GFP (GFP, pour Green Fluorescent Protein) fluorescente en jaune-vert.

Le protocole de modification génétique utilisé est décrit dans l'article [Boucher *et al.*, 2017b] et indiqué en Annexe A.2. La Figure 2.4 montre la construction du magnétosome AMB-1 fonctionnalisé par greffage de la protéine Venus et du peptide RGD à la membrane grâce à la protéine d'accroche de la fusion, MamC.

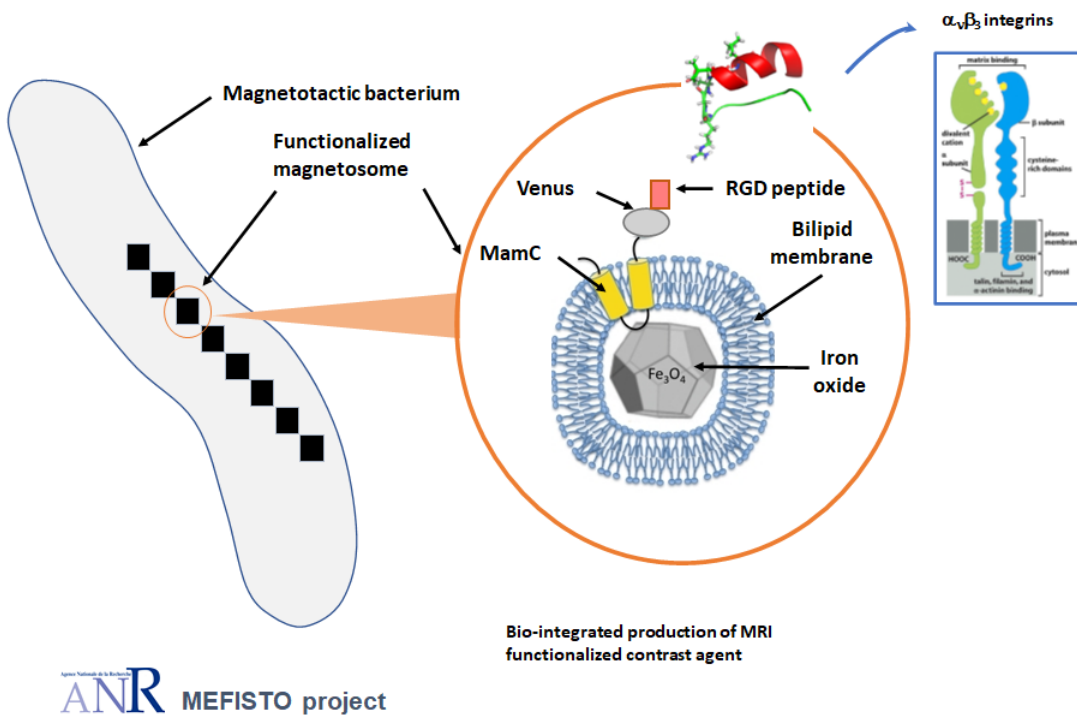


FIG. 2.4 – Schéma de la construction des magnétosomes fonctionnalisés AMB-1 avec Venus-RGD (Source : adapté de [Boucher *et al.*, 2014])

La fonctionnalisation des magnétosomes AMB-1 a été vérifiée *in vivo* grâce à la présence de la protéine fluorescente Venus. Les bactéries magnétotactiques AMB-1 ont été préférées aux bactéries MV-1 pour la production de magnétosomes fonctionnalisés, malgré un pouvoir contrastant IRM moins élevé (une relaxivité transverse r_2 1,5 fois plus faible), car la protéine membranaire utilisée pour le greffage de la fonctionnalisation (MamC) est exprimée en bien plus grande quantité sur les magnétosomes issus de AMB-1, permettant potentiellement l'accrochage d'un plus grand nombre de peptides RGD.

2.2 Résultats *in vitro*

Dans le cadre du projet Mefisto, j'ai été en charge de toutes les études réalisées *in vitro*. J'ai tout d'abord étudié l'intérêt de la fonctionnalisation par le peptide RGD, puis travaillé sur l'incorporation des magnétosomes et leur visualisation au cours du temps. J'ai préparé également les modèles *in vitro* qui ont été étudiés à l'IRM par Marianne Boucher, doctorante, et comparé les résultats avec mes images en immunocytochimie (ICC, pour ImmunoCytoChimie). J'ai aussi commencé d'étudier les interactions entre les magnétosomes et les modèles *in vitro* 3D.

2.2.1 Ciblage : comparaison des Magnétosomes Venus et VRGD

Afin de vérifier notre hypothèse de liaison spécifique de la particule fonctionnalisée sur les cellules de GBM humain, le MEM a produit deux types de magnétosomes. Les magnétosomes AMB1-VRGD, entièrement fonctionnalisés et les magnétosomes AMB1-V exprimant uniquement le fluorochrome Venus. Ces magnétosomes, ainsi que les magnétosomes non fonctionnalisés AMB1-WT, ont tout d'abord été testés *in vitro* sur un modèle cellulaire de glioblastome humain, les cellules U87MG (U87MG, pour Uppsala 87 Malignant Glioma).

Les cellules U87MG sont cultivées comme décrit en Annexe A.3.1 et mises en contact avec les magnétosomes comme décrit en Annexe A.4. Les essais se sont déroulés en faisant varier deux paramètres : la concentration de magnétosomes mise en contact et le temps d'incubation. Lors de la première série d'essai, les cellules cultivées sur lames huit puits sont mises en contact avec les magnétosomes AMB1-V versus celles AMB1-VRD, à $2 \text{ mg}_{\text{Fer}}/\text{L}$ pendant 3 heures 30 versus 1 heure 30.

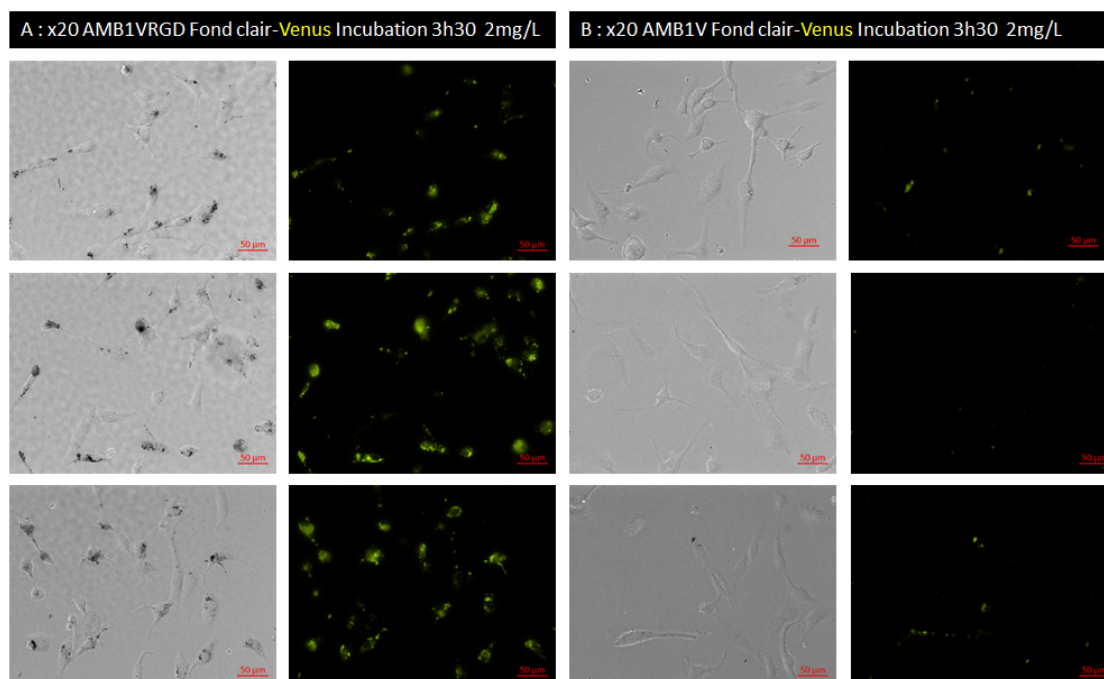


FIG. 2.5 – Incorporation des magnétosomes fonctionnalisés AMB1-VRGD par rapport à ceux AMB1-V, temps 3h30, dose $2 \text{ mg}_{\text{Fer}}/\text{L}$ grossissement x20

La Figure 2.5 montre la différence notable d'incorporation des magnétosomes AMB1-VRGD (image A) par rapport aux magnétosomes AMB1-V (image B), au temps d'incubation 3 heures 30. Bien qu'on ne puisse déterminer si les magnétosomes sont dans ou sur les cellules avec certitude, les magnétosomes fonctionnalisés uniquement par le fluorophore Venus sont beaucoup moins nombreuses et souvent non accrochées aux cellules. Au temps 1 heure 30, beaucoup moins de magnétosomes sont visibles, les magnétosomes n'ont pas encore atteint les cellules (résultat non montré).

Une gamme de dose a été réalisée avec des concentrations élevées de magnétosomes fonctionnalisés de 1 $\text{mg}_{\text{Fer}}/\text{L}$ à 10 $\text{mg}_{\text{Fer}}/\text{L}$, avec un temps d'incubation de 3 heures 30.

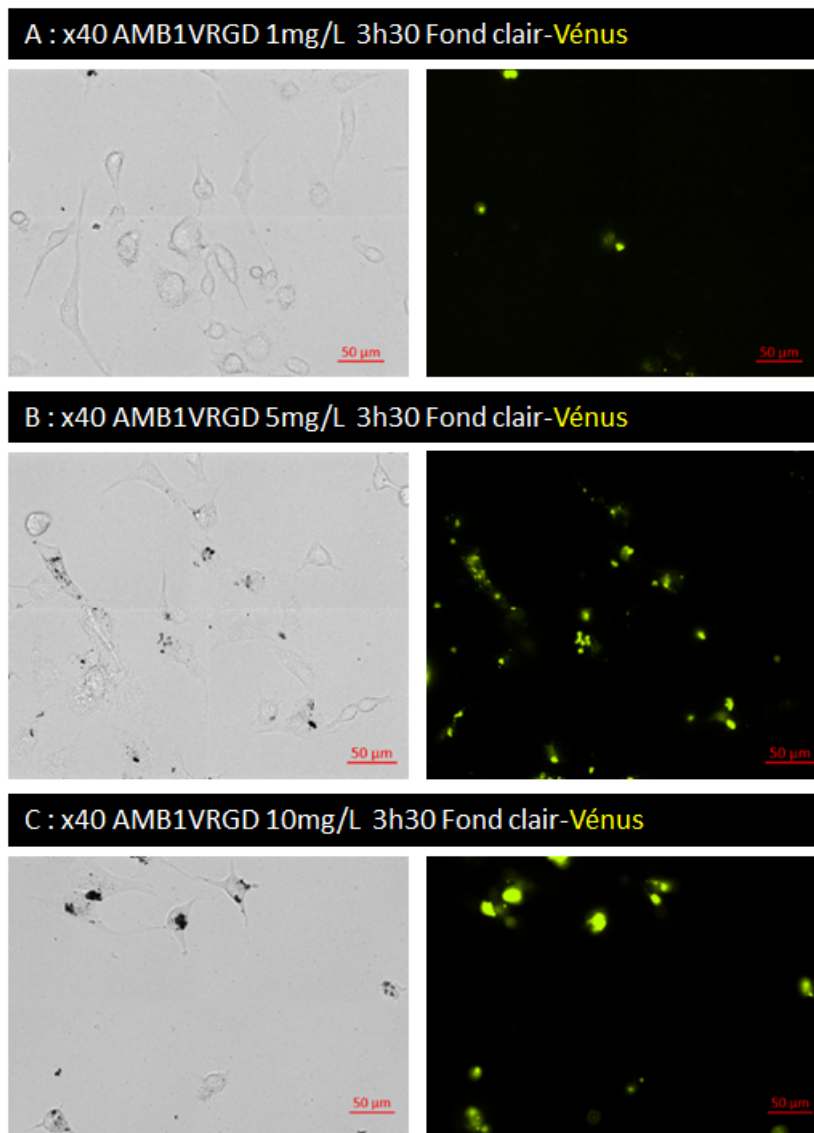


FIG. 2.6 – Incorporation des magnétosomes fonctionnalisés AMB1-VRGD, temps 3h30, Gamme de dose 1 (image A), 5 (image B) et 10 $\text{mg}_{\text{Fer}}/\text{L}$ (image C) mosaïques grossissement x40

La Figure 2.6 montre que le nombre de magnétosomes AMB1-VRGD incorporés aux concentrations de 5 et 10 $\text{mg}_{\text{Fe}}/\text{L}$ n'augmente pas de façon significative par rapport à la concentration 2 $\text{mg}_{\text{Fe}}/\text{L}$, mais plutôt que les magnétosomes en trop grand nombre s'agrègent entre elles et ne peuvent plus entrer dans les cellules. Les magnétosomes AMB1-V incubés avec les cellules aux concentrations de 1 et 10 $\text{mg}_{\text{Fe}}/\text{L}$ sont retrouvés sur et à côté des cellules, en nombre beaucoup plus faible, comme montré Figure A.10 à l'Annexe A.7. Les amas de magnétosomes concentrés, fonctionnalisés ou non, sont à saturation en fluorescence Vénus, pour une durée d'acquisition rapide (250 ms).

Un essai a été réalisé en parallèle pour déterminer si la température joue un rôle dans l'incorporation des magnétosomes, en comparant une incubation réalisée à 37°C par rapport à une incubation à +4°C (résultats non montrés). Clairement à +4°C, les cellules n'incorporent pas les magnétosomes, un mécanisme dynamique serait donc à l'oeuvre plutôt qu'un simple accrochage par contact. Cela semble bien correspondre avec le fait que l'intégrine $\alpha_{\nu}\beta_3$ est internalisée périodiquement avec son substrat accroché puis retourne à la membrane, le cycle d'endocytose-exocytose étant bien décrit dans la littérature [Roberts *et al.*, 2004, Caswell et Norman, 2006]. L'agrégation des magnétosomes entre elles pose donc un problème majeur pour l'incorporation au cours du temps, car cela bloque mécaniquement l'endocytose du complexe intégrine-magnétosomes.

2.2.2 Incorporation

Afin de réduire le nombre et la taille des agrégats, la sonication est fréquemment utilisée. Cela consiste à exposer la suspension de NPs à des ultrasons, provoquant des effets de cavitation, qui vont disperser mécaniquement les magnétosomes. Une étape de sonication de 20 minutes a été ajoutée à notre protocole de mise en contact, permettant une réduction de la taille des agrégats mais insuffisante pour améliorer l'incorporation dans les cellules.

La sonication ne suffisant pas, un milieu de dispersion a été mis au point afin de pouvoir améliorer l'incorporation des magnétosomes dans les cellules. La dispersion de nanomagnétosomes peut être réalisée en utilisant des méthodes de répulsion stérique par ajout de surfactants qui vont éloigner les magnétosomes entre elles [Krause, 1987, Odenbach, 2003], ou par répulsion électrostatique ou ionique en utilisant les charges de surface des magnétosomes dans un milieu donné [Massart, 1981, Cabane, 2003].

Les agents de dispersion sont donc souvent des tensioactifs ou des émulsifiants, permettant d'obtenir une suspension colloïdale maintenant en suspension des magnétosomes et évitant l'agrégation de celles-ci. Divers réactifs tels que l'hexane ou l'acide oléique sont fréquemment utilisés pour disperser les oxydes de fer [Tadmor *et al.*, 2000]. Les nanomagnétosomes sont aussi fréquemment recouvertes de diverses molécules telles que des groupements carboxylés ou sulfonates alkyles [Lu *et al.*, 2003].

Le cœur de fer de nos magnétosomes est englobé dans une bi-couche membranaire, lipidique et protéique, ce qui entraîne des contraintes chimiques pour ne pas dénaturer la membrane. De plus, les magnétosomes sont utilisées sur des cellules vivantes, limitant le nombre d'agents possibles, qui doivent être facilement supportés par les cellules. J'ai donc commencé par tester sur les cellules seules différentes concentrations de réactifs me paraissant remplir les critères

d'agents de dispersion (citrate trisodique, ovalbumine, glycérol, lysolécithine). J'ai utilisé du milieu sans sérum afin d'éviter de surcharger le milieu de culture, sachant que les cellules U87MG ont une croissance rapide même sans sérum.

Le tableau présenté à la Figure A.6 (voir Annexe A.5) montre l'impact de ces réactifs sur les cellules, certains entraînant une mort cellulaire ou un décrochage précoce des cellules bien avant la confluence. Après avoir déterminé les concentrations maximales utilisables sans dommages pour les cellules, différents tests ont été réalisés avec un agent ou une combinaison de plusieurs agents, en présence des magnétosomes. La Figure A.7 (voir Annexe A.5) illustre les effets de certains réactifs, après 3 heure 30 d'incubation à $2 \text{ mg}_{Fe}/\text{L}$ de magnétosomes V versus VRGD. Visuellement, le glycérol permet de mieux éliminer les agrégats restés au fond de la boîte mais semble éliminer également la plus grande partie des magnétosomes. Le chlorure de potassium et la lysolécithine ne réduisent pas la taille des agrégats. Le citrate trisodique et les protéines telles que l'ovalbumine et la caséine donnent de bons résultats. Les agents sont ensuite combinés afin d'augmenter l'effet dispersant sans altérer les magnétosomes.

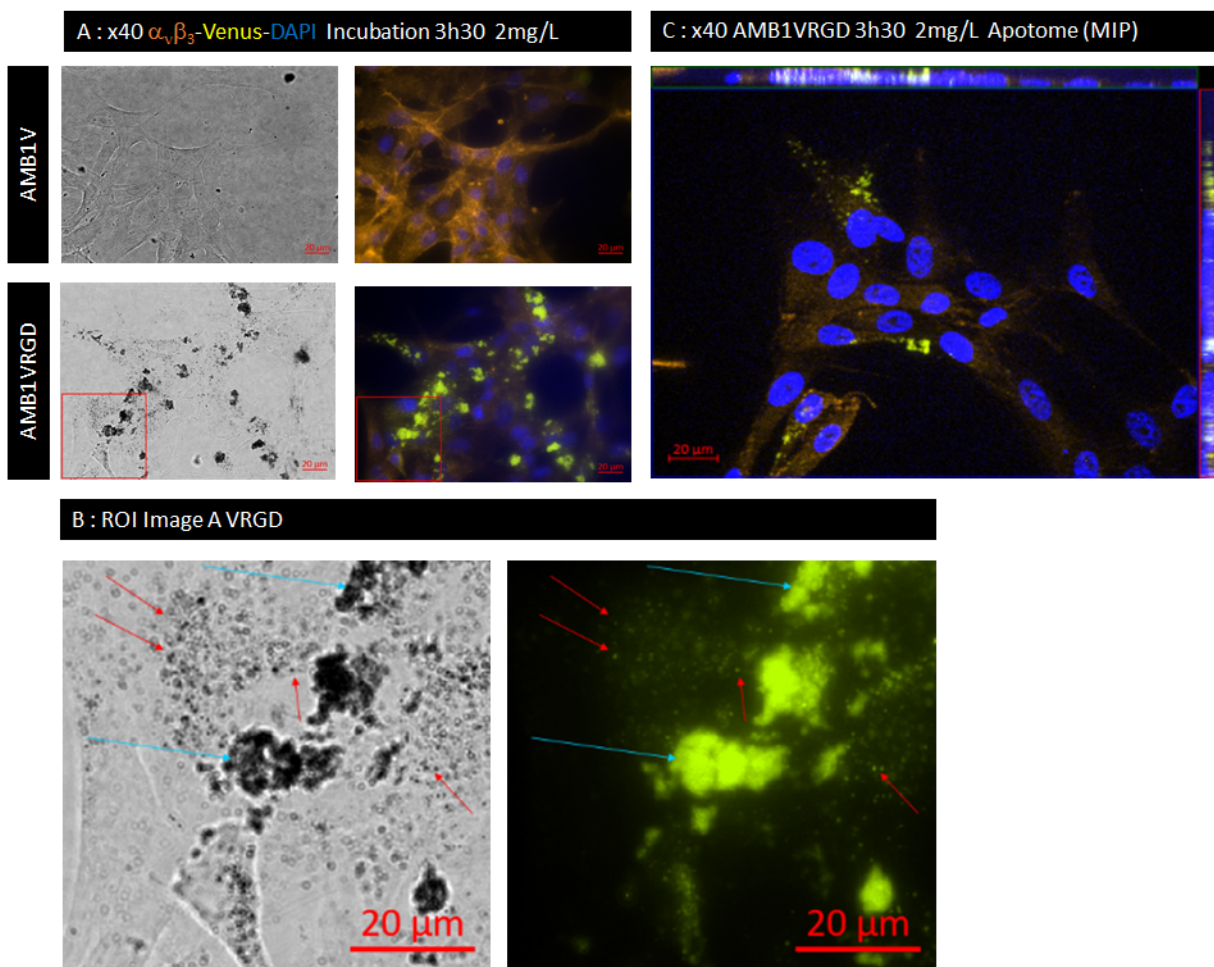


FIG. 2.7 – Incorporation des magnétosomes fonctionnalisés avec Venus-RGD par rapport à Venus seul, temps 3h30, $2 \text{ mg}_{Fe}/\text{L}$, Milieu de dispersion, grossissement x40.

La Figure 2.7 montre les résultats obtenus après 3 heures 30 d'incubation à $2 \text{ mg}_{Fe}/\text{L}$ de magnétosomes fonctionnalisés versus non fonctionnalisés dans le milieu de dispersion retenu : un milieu sans sérum, avec 1mM de citrate, 1% de glycérol et 0.25% de sel de sodium de caséine, en conservant la sonication de 20 minutes.

L'image A montre la différence entre les cellules traitées avec les magnétosomes AMB1-V versus les magnétosomes AMB1-VRGD. Les magnétosomes AMB1-V sont pratiquement toutes rincées lors des lavages avant la fixation au PFA 4%, alors que les magnétosomes AMB1-VRGD restent bien dans et sur les cellules. Les magnétosomes AMB1-VRGD semblent s'accumuler dans de petites vésicules dans les cellules (image B, ROI de l'image A, flèches rouges), ainsi qu'en gros amas sur les cellules (flèches bleues). En effet, la concentration importante fait qu'une partie des magnétosomes AMB1-VRGD s'agrègent néanmoins dans/sur les cellules, produisant des amas très fluorescents, ce qui sature le signal et limite l'incorporation dans les cellules.

L'image C est une image prise en "profondeur" (z-stack) à l'aide du module apotome 2 du microscope AxioObserver Z1 de Carl Zeiss. Le microscope Zeiss Apotome utilise la méthode d'illumination structurée appelée 1D-SIM (SIM, pour Structured Illumination Microscopy). Cette méthode de projection de grille permet de retirer le flou dans l'image à partir de seulement trois images et d'obtenir ainsi des images confocales. L'image MIP (MIP, pour Maximum Intensity Projection) est obtenue en compilant les coupes optiques sur la distance d'acquisition en z. Cette image MIP permet de définir que les petites vésicules (flèches rouges) sont bien situées dans les cellules, les gros amas restant accrochés à la membrane à l'extérieur. La présence de la cible, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est révélée par un immunomarquage avec un anticorps anti- $\alpha_v\beta_3$ (MAB1976H couplé Phycoérythrine (PE), Merck-Millipore).

Il est donc nécessaire de diminuer la concentration de magnétosomes pour pouvoir observer plus facilement une accumulation à l'intérieur des cellules. Une gamme de concentrations a donc été étudiée pour déterminer la dose la plus faible permettant de voir les magnétosomes AMB-VRGD, après 3 heures 30 d'incubation, afin de suivre le devenir des magnétosomes dans la cellule sur un plus long terme. Les concentrations utilisées sont 10, 25, 50, 100, 250, 500 et $1000 \mu\text{g}_{Fe}/\text{L}$.

La Figure 2.8 illustre les résultats obtenus. Les images en fond clair montrent en noir les magnétosomes de fer et les images en fluorescence montre la fluorescence Venus. Les images A et B de la Figure 2.8 montrent que les magnétosomes commencent d'être tout juste détectables à la concentration de $50 \mu\text{g}_{Fe}/\text{L}$, dans quelques cellules, à un grossissement de x 20.

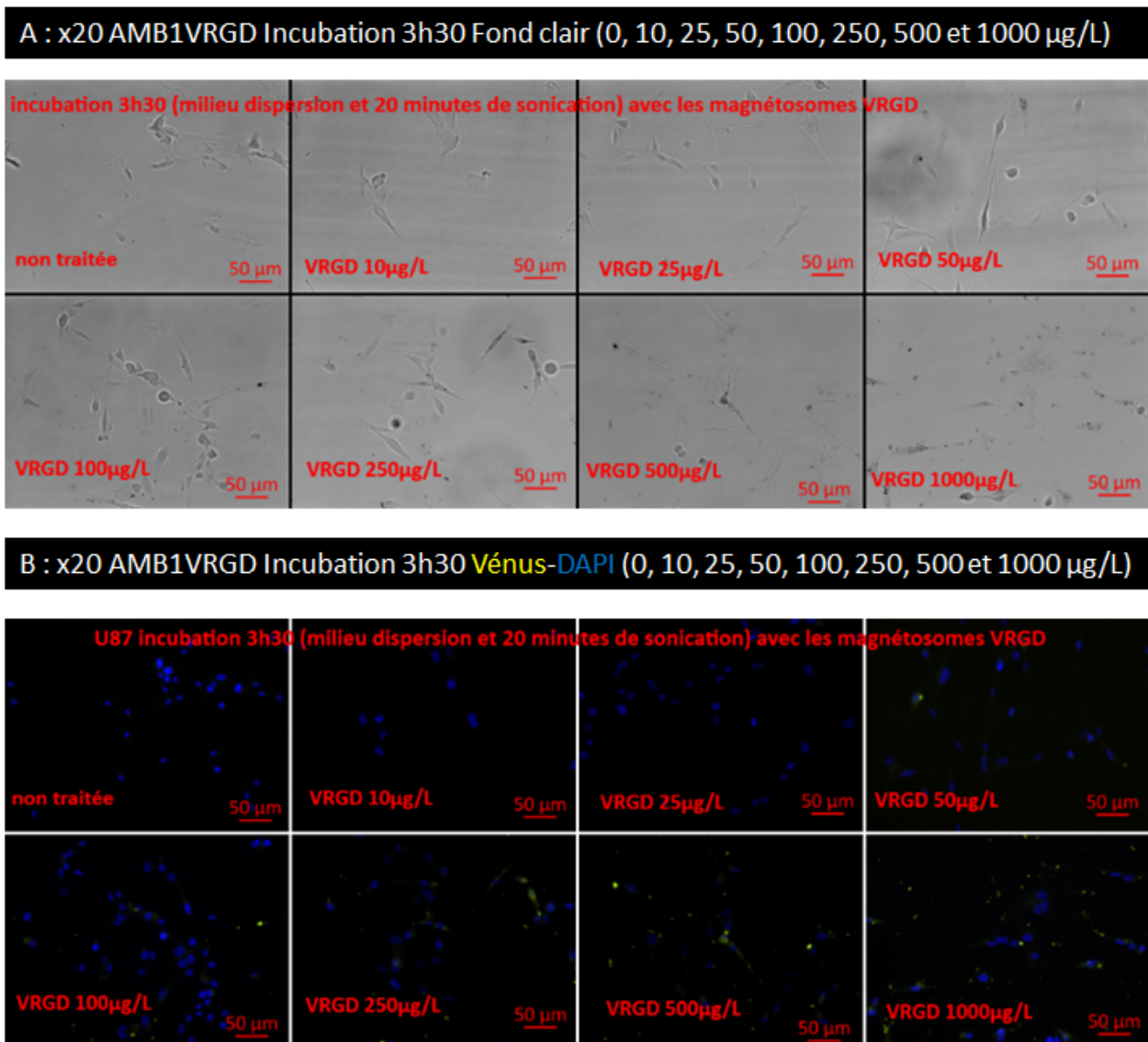


FIG. 2.8 – Gamme de concentrations en magnétosomes AMB1-VRGD, temps 3h30, Milieu de dispersion, grossissement x20

Une région d'intérêt des champs de vue à 250 (image A) et 1000 $\mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$ (image B) montre que les magnétosomes sont bien dispersés dans de nombreuses cellules à la concentration de 250 $\mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$ et qu'à 1000 $\mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$, les magnétosomes en excès commencent à former des amas, sur les cellules (Figure 2.9).

La concentration de 250 $\mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$ a donc été choisie pour réaliser les essais suivants d'incorporation au cours du temps. Après 24 heures d'incubation avec les magnétosomes AMB-VRGD à la concentration de 250 $\mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$, nous avons constaté que la fluorescence émise par la protéine Venus diminue beaucoup en intensité, au point qu'au grossissement x 20 la fluorescence soit proche du bruit de fond, alors même que les images en fond clair semblent bien indiquer une incorporation plus importante au cours du temps.

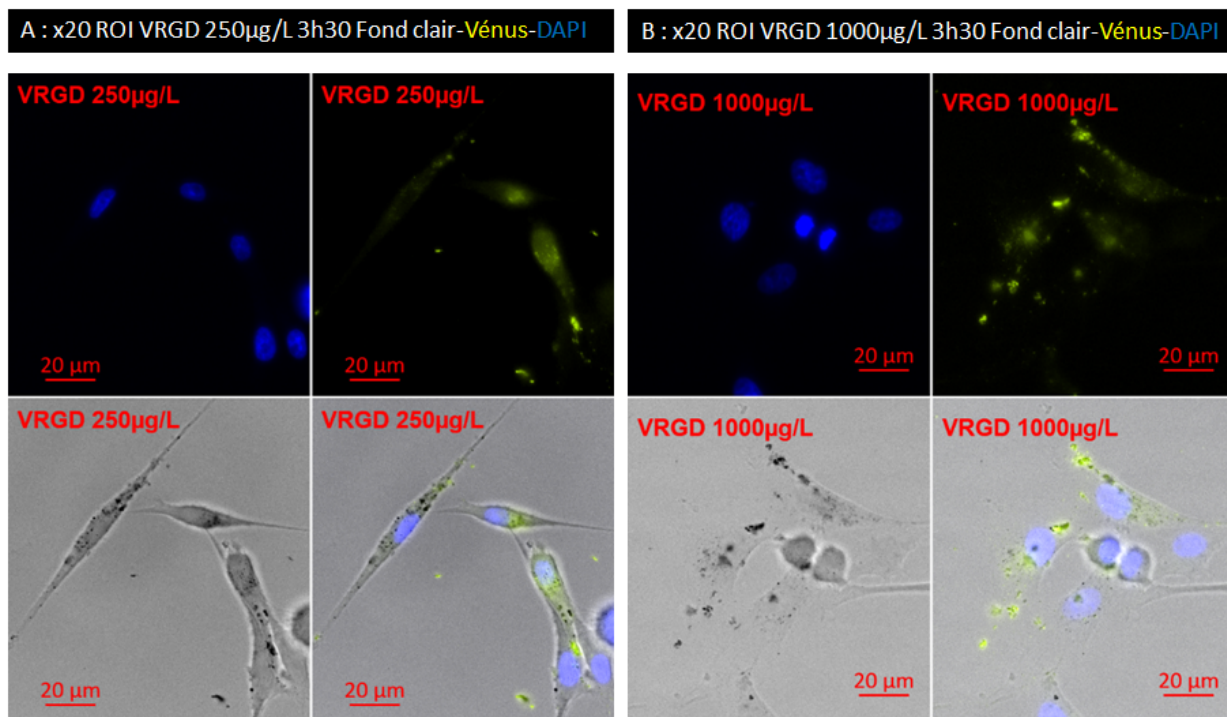


FIG. 2.9 – ROI des concentrations 250 et 1000 $\mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$, temps 3h30

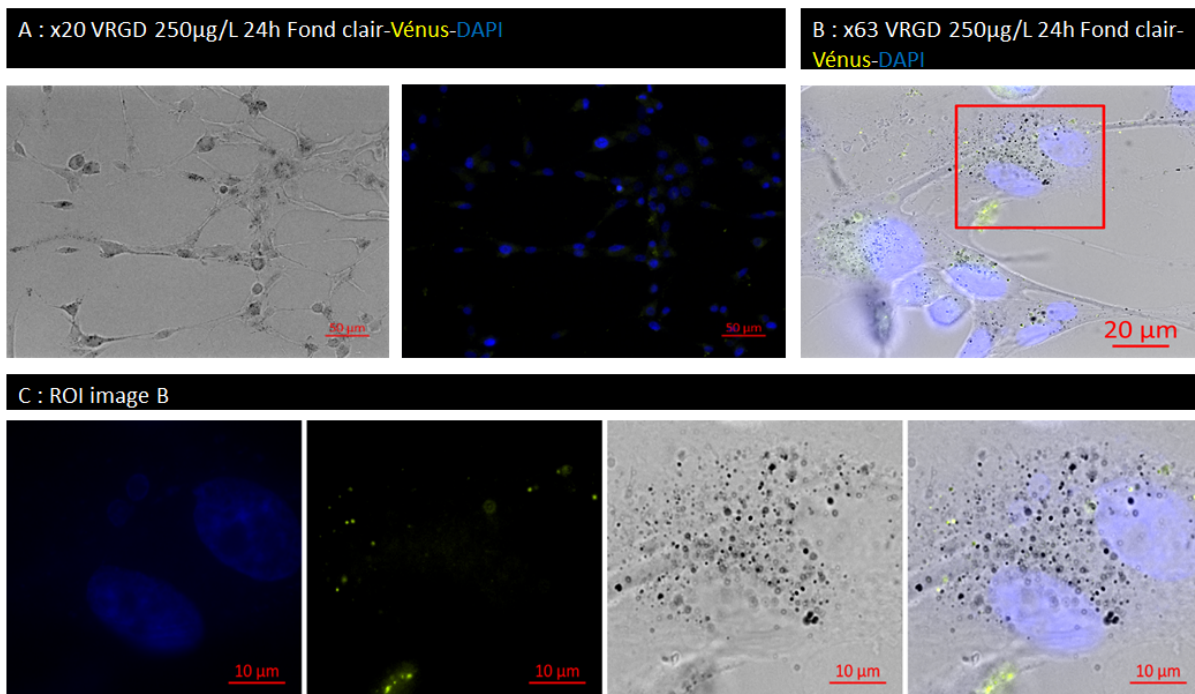


FIG. 2.10 – Magnétosomes AMB1-VRGD, 250 $\mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$, temps 24h, Milieu de dispersion, grossissement x20 (A), x63 (B) et ROI image B (C)

La Figure 2.10 compare les images en fond clair et en fluorescence à un grossissement de $\times 20$ (image A) et à $\times 63$ (image B). L'image C est une ROI de l'image B, soulignant bien une accumulation de magnétosomes noirs en fond clair alors que l'intensité de fluorescence diminue fortement, bien qu'encore partiellement visible à $\times 63$.

Nous avons émis plusieurs hypothèses :

- l'incorporation dans les cellules décroche le fluorochrome dans le cytoplasme.
- la membrane des magnétosomes est tout ou partie abimée.
- la protéine Venus est dénaturée dans le cytoplasme.

Pour étudier ces hypothèses, nous avons réalisé des immunomarquages.

2.2.3 Immunomarquages *in vitro* en 2D

Anti-GFP et Anti-AMB1

Pour vérifier si la protéine Venus est toujours présente bien que la fluorescence soit trop faible pour se distinguer du bruit de fond, un immun marquage à l'aide d'un anticorps anti-GFP (Abcam ref. ab13970) a été réalisé, cet anticorps reconnaissant la protéine Vénus. Un anticorps anti-AMB1 a également été développé en interne, au CEA Marcoule, par l'équipe dirigée par Laurent Bellanger, partenaire du projet Mefisto.

Cet anticorps a été produit chez le lapin, selon le protocole décrit en Annexe A.6. Le protocole d'immun marquage est également décrit en Annexe A.6.

L'utilisation de ces deux anticorps nous a permis de démontrer que même lorsque la fluorescence émise par la protéine Venus n'est plus visible, les magnétosomes peuvent être révélés ainsi que visualisés (Figure 2.11).

Les cellules incubées avec les magnétosomes AMB1-VRGD à la concentration de $250 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$ en milieu de dispersion sont visibles en fond clair (images A et B) et seuls quelques amas sont décelables en fluorescence Venus. Les images C et D sont les régions d'intérêt identifiées sur les images A et B par un carré rouge. Les magnétosomes sont visibles en fond clair et révélés par l'anti-GFP (images A et C) ou par l'anticorps anti-AMB1 (images B et D). L'anticorps anti-AMB1 (image B) permet de révéler beaucoup plus de magnétosomes que l'anticorps anti-GFP (image A), nous confortant dans l'hypothèse que la protéine Venus est partiellement décrochée ou dégradée lors de l'incorporation. Nous utiliserons donc l'anticorps anti-AMB1 pour révéler la présence des magnétosomes lors des études suivantes.

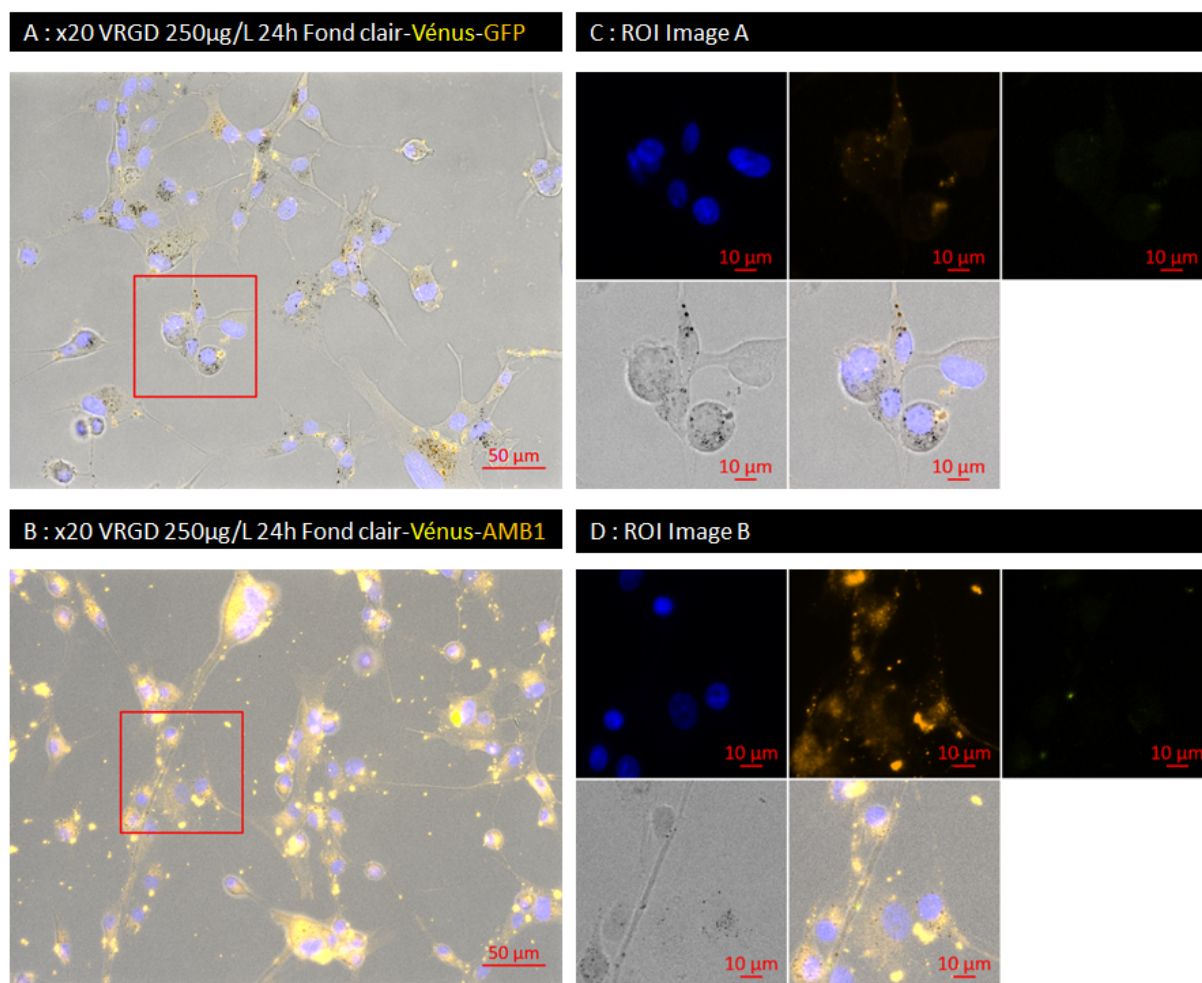


FIG. 2.11 – Révélation des magnétosomes AMB1-VRGD par immunomarquages par les anticorps anti-AMB1 et GFP, après incubation 24h à $250 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$, grossissement x20 (Images A et B) ROI des images A et B (C et D)

Devenir des magnétosomes dans les cellules

Pour définir l'évolution des magnétosomes dans les cellules, une étude a été réalisée sur cellules vivantes en culture, à l'aide de l'anticorps anti-AMB1 et d'un marqueur des lysosomes (cytopainter), selon le protocole décrit à l'Annexe A.8.

L'anticorps anti-AMB1 ne rentre pas dans les cellules, pas sans perméabilisation de la membrane après fixation. Il permet de révéler dans cette étude les magnétosomes accrochées à la membrane à l'extérieur, après rinçage. Le cytopainter, lui rentre très bien dans les cellules vivantes et permet de colorer en orange les lysosomes. La fluorescence Venus a été utilisée afin de colocaliser les vésicules visibles en fond clair, les lysosomes et les magnétosomes fluorescents en Venus.

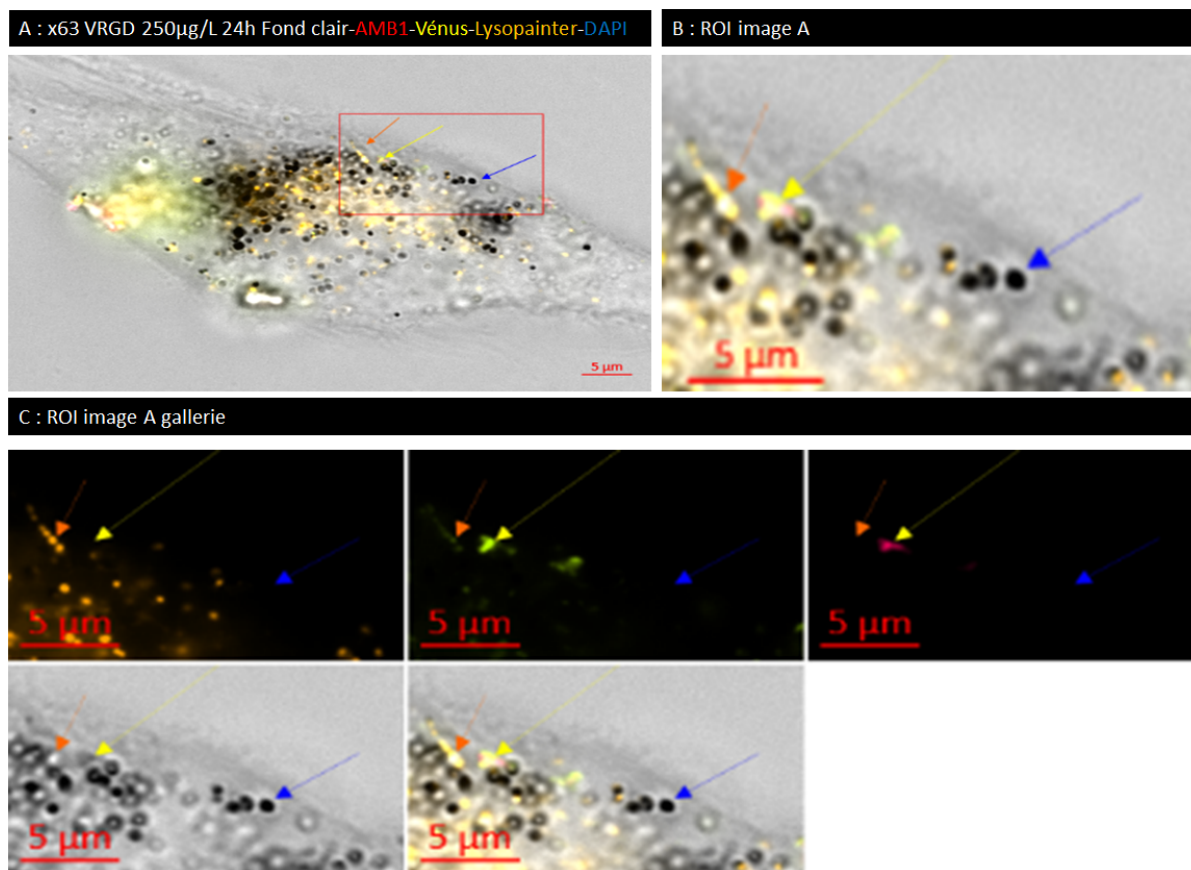


FIG. 2.12 – Immunomarquage par l'anticorps anti-AMB1 et coloration des lysosomes avec le colorant cytopainter sur cellules U87MG en culture, incubation 24h à $250 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$, grossissement x63

La Figure 2.12 au grossissement x 63 (image A) montre bien une importante disparité entre les vésicules. Une région d'intérêt permet de mieux distinguer les vésicules (image B) et la décomposition par filtres de fluorescences (image C) montre différentes configurations de vésicules. En effet, si une partie des magnétosomes positifs en Venus sont bien colocalisés avec les lysosomes (flèche orange), une partie des magnétosomes positifs avec l'anticorps anti-AMB1 (flèche jaune) sont restées accrochée à l'extérieur de la membrane et une majorité de vésicules ne sont pas dans les lysosomes ni à l'extérieur, uniquement visibles en fond clair (flèche bleue). Des essais d'immunomarquages avec un anticorps anti-EEA1 qui cible les endosomes précoces n'a pas donné de résultats probants (résultats non montrés).

Pour vérifier que les magnétosomes sombres visibles en fond clair ne sont pas des dépôts protéiques ou des dégradations d'ADN mais bien nos magnétosomes de fer, quelque soit le type de vésicules dans lesquelles elles se trouvent, une coloration au Bleu de Prusse a été réalisée, montrant bien la présence de magnétosomes de fer dans les cellules traitées par les magnétosomes AMB1-VRGD (voir Figure 2.13).

2.2.4 Coloration Perl's en 2D

La coloration Perl's ou coloration au Bleu de Prusse est une coloration du fer, classique en histologie, développée depuis 1867 par le docteur Max Perl, fréquemment utilisée pour révéler les dépôts de fer dans les organes, dont le cerveau [Thulborn *et al.*, 1990].

Le principe de cette coloration est l'utilisation d'une solution de sels de cyanure (ferrocyanide) en milieu acide pour révéler les ions Fe^{2+} , colorés en bleu.

Pour notre application, sur cellules fixées sur lame, le protocole a été légèrement modifié en ajoutant une étape de perméabilisation afin d'atteindre les magnétosomes incorporées dans les vésicules cytoplasmiques. Le protocole est décrit en Annexe A.9. Sans cette étape de perméabilisation, les magnétosomes restent noires, comme montré en Figure A.12 en Annexe A.9. La Figure 2.13 montre les cellules U87MG à un grossissement de x63, incubées avec les magnétosomes AMB1-V (image A) et AMB1-VRGD (image B), colorées au Bleu de Prusse. Les magnétosomes AMB1-VRGD sont bien visibles en bleu dans les cellules, contre-colorées au rouge d'aniline.

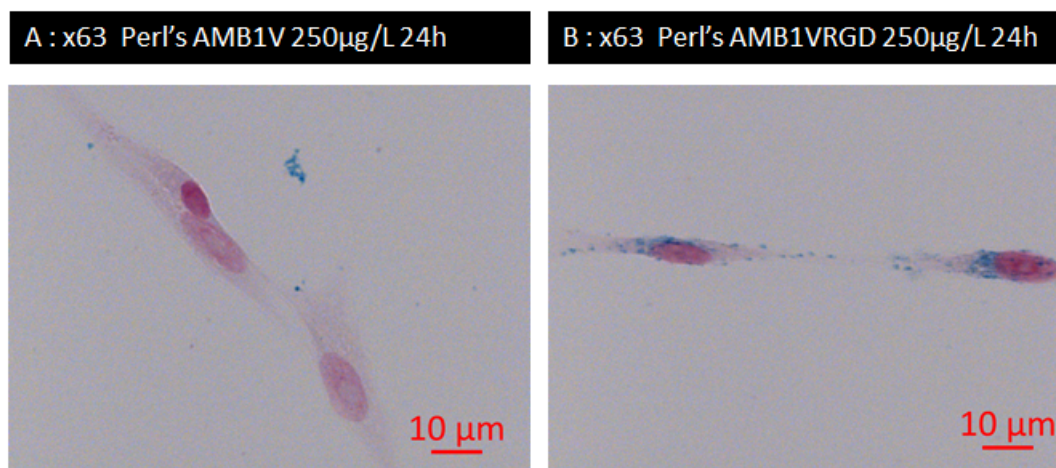


FIG. 2.13 – Coloration Perl's sur cellules U87 incubées avec les magnétosomes AMB1-V (A) et AMB1-VRGD (B), incubation 24h à $250 \mu g_{Fe}/L$, grossissement x63

2.2.5 Cinétiques d'incorporation des magnétosomes *in vitro*

Un traitement, cinétique sur 72 heures

Afin de déterminer si les cellules continuent d'intégrer les magnétosomes au cours du temps, ou bien si une saturation ou un relargage se produit, des études longitudinales ont été réalisées.

Une première cinétique a été réalisée à la concentration minimale retenue précédemment : $250 \mu g_{Fe}/L$. Les magnétosomes fonctionnalisés et non fonctionnalisés ont été mis en contact 24, 48, et 72 heures avec les cellules U87MG. Un immunomarquage a été réalisé avec l'anticorps anti-AMB1, après une étape de perméabilisation, révélé par un anticorps anti-rabbit A647 (rouge).

La Figure A.11 en Annexe A.7 montre bien une augmentation de l'incorporation de magnétosomes, mais il est toujours difficile de définir avec certitude si les magnétosomes sont dans ou sur les cellules. À noter que même après 72 heures, les magnétosomes AMB1-V ne rentrent pas dans les cellules. De plus, les magnétosomes AMB1-VRGD ne semblent pas s'accumuler beaucoup plus après 48 heures.

Pour déterminer si les magnétosomes sont restés en surface ou bien ont été incorporés dans le cytoplasme, un marquage double "in&out", utilisant l'anticorps anti-AMB1 a été réalisé. Le protocole est présenté en Annexe A.6.2. Brièvement, il s'agit de faire un immunomarquage avec l'anticorps anti-AMB1 avant et après une étape de perméabilisation, révélant en Alexa 647 (rouge) la partie uniquement en surface et en Alexa 488 (vert) la partie internalisée plus la partie en surface. Les magnétosomes uniquement révélés en vert sont ceux internalisés.

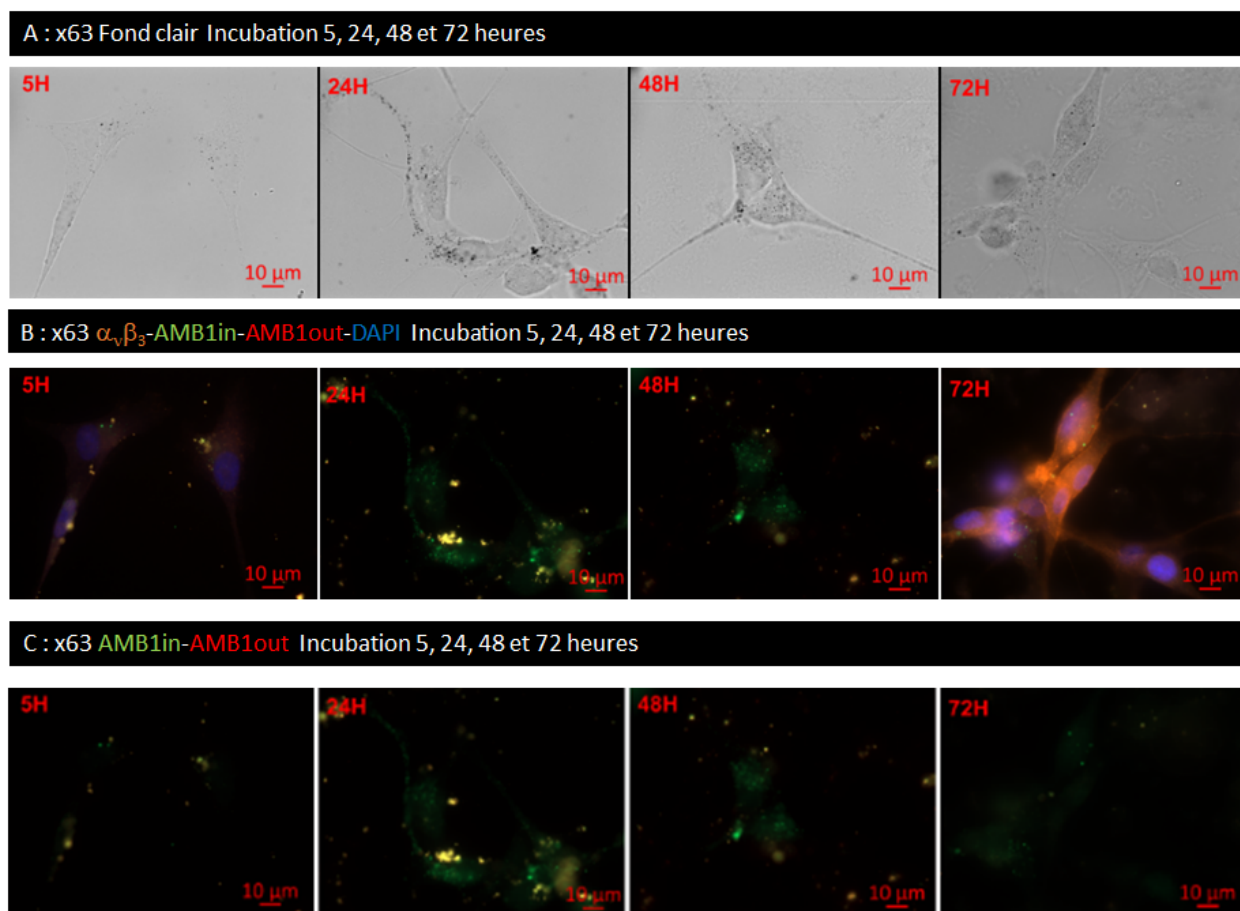


FIG. 2.14 – Cinétique d'incorporation des magnétosomes AMB1-VRGD après 5, 24, 48 et 72 heures d'incubation, à la concentration de $250 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$, révélés par l'anticorps anti-AMB1, grossissement x63

La Figure 2.14 montre une augmentation du nombre de magnétosomes fonctionnalisés dans les cellules au cours du temps, à la concentration de $250 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$ (grossissement x 63). L'image A montre les magnétosomes en fond clair, l'image B montre l'image composite de la fluorescence de l'anticorps anti- $\alpha_{\nu}\beta_3$ (PE) et de l'anticorps anti-AMB1 en Alexa 647 pour la partie non internalisée, en Alexa 488 pour la partie internalisée. L'image C montre le marquage anti-AMB1, les magnétosomes rouges et verts apparaissant en jaune.

La Figure 2.15 présente en image A les cellules U87MG incubées 48 heures et en B, une ROI de l'image A, permettant de mieux voir la répartition des magnétosomes fonctionnalisés "in" et "out". L'incorporation dans le cytoplasme semble être plus importante à 48 heures qu'à 72 heures, potentiellement en raison d'un effet de la croissance des cellules et à l'appauvrissement progressif du milieu en magnétosomes non agrégées ou bien un effet de relargage dans le milieu de culture. À noter que la présence de l'intégrine $\alpha_{\nu}\beta_3$ s'intensifie avec le temps, en raison de la croissance cellulaire et de l'augmentation du nombre de cellules en interaction.

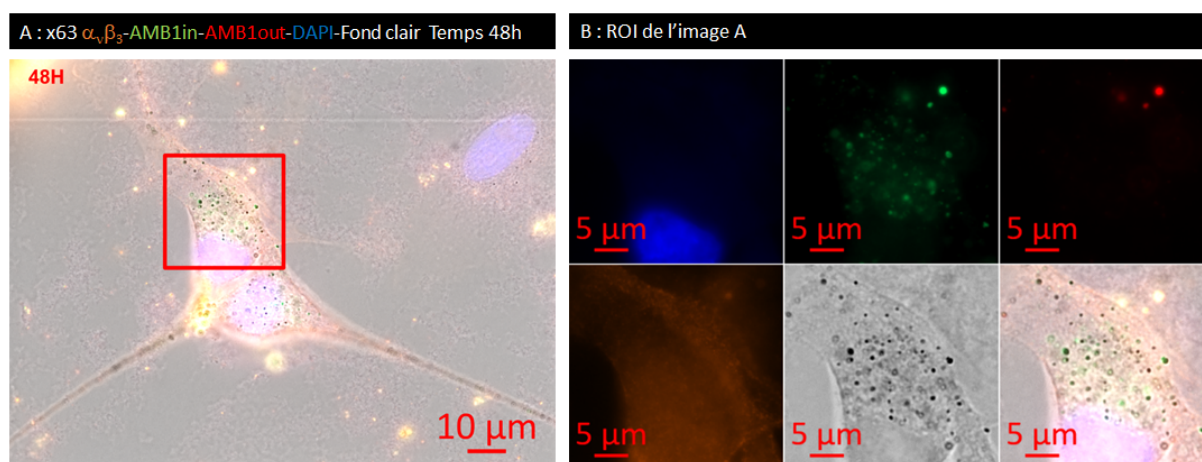


FIG. 2.15 – Cinétique d'incorporation des magnétosomes AMB1-VRGD après 48 heures d'incubation, à la concentration de $250 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$, révélés par l'anticorps anti-AMB1, grossissement x63

Multi-traitements, cinétique sur 72 heures

Le même protocole d'immunomarquage a été utilisé pour comparer l'incorporation des magnétosomes en multi-traitements, en ajoutant des magnétosomes fonctionnalisés toutes les 24 heures, pendant trois jours. Deux essais ont été réalisés en multi-traitements.

Le premier essai a consisté à comparer un seul traitement à $250 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$ par rapport à apporter trois fois la dose de $250 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$ sur trois jours, pour voir si les cellules sont capables d'accumuler les magnétosomes ou si une saturation se fait jour.

La Figure 2.16 montre l'augmentation du nombre de magnétosomes dans les cellules au cours du temps et du nombre de traitements, à $250 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$.

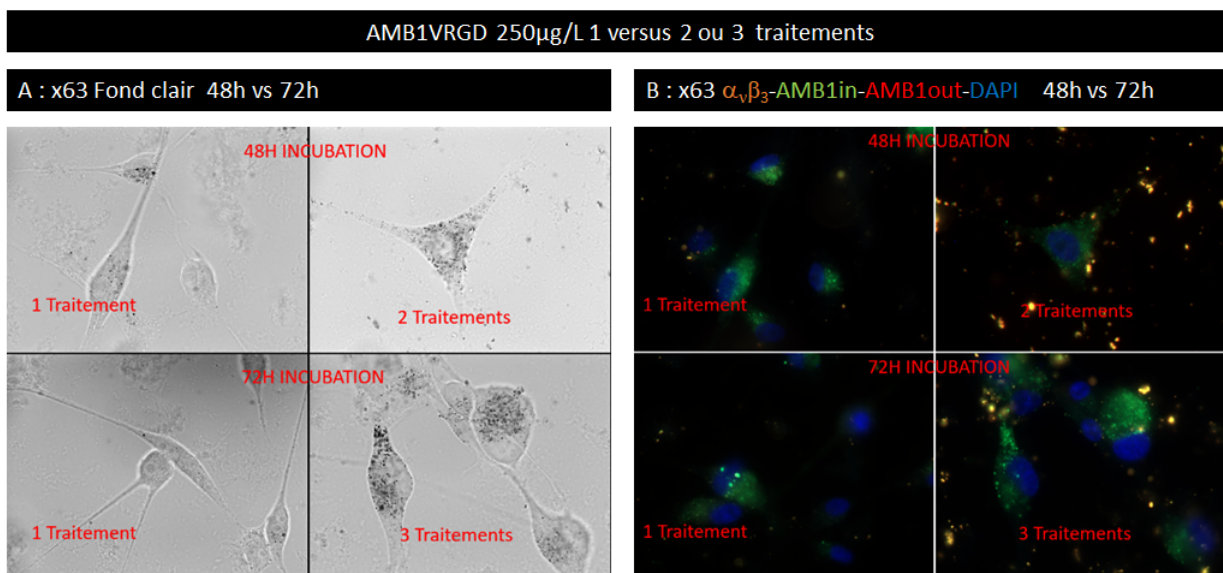


FIG. 2.16 – Cinétique d'incorporation des magnétosomes AMB1-VRGD après 1, 2 ou 3 traitements, 24 et 48 heures d'incubation ($250 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$), révélés par l'anticorps anti-AMB1, grossissement x63

Les cellules continuent d'incorporer les magnétosomes fonctionnalisés, même après trois ajouts dans le milieu de culture, bien que de nombreux magnétosomes restent en excès à l'extérieur. Il est notable que l'intensité de fluorescence des cellules après un traitement au temps 48 heures est similaire à celle observée au temps 48 heures avec deux traitements et au temps 72 heures avec trois traitements, alors qu'après 72 heures d'incubation avec un seul traitement l'intensité de fluorescence diminue fortement.

Les magnétosomes visibles en fond clair semblent plus nombreux après chaque ajout dans le milieu de culture, quelque soit la quantité de magnétosomes révélés par l'anticorps anti-AMB1, ce qui paraît indiquer une dégradation de la membrane des magnétosomes dans le cytoplasme cellulaire, comme déjà observée au temps 24h. La concentration de $250 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$ ajoutée en une seule fois n'est pas saturante. Les magnétosomes restés à l'extérieur des cellules n'ont pas été incorporés soit en raison d'un trop grand nombre de magnétosomes dans le milieu par rapport au nombre d'intégrines disponibles pour l'accrochage à un temps t , soit de leur agrégation entre eux au cours de l'incubation, empêchant le cycle d'internalisation.

Un deuxième essai a donc été réalisé pour comparer la quantité de magnétosomes AMB1-VRGD incorporés dans les cellules après 48 heures avec un traitement à une concentration unique de $250 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$ versus un multi-traitement de $4 \times 62,5 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$, correspondant à la même quantité de magnétosomes mais apportés en quatre fois (matin et soir, à six heures d'intervalles, pendant 2 jours).

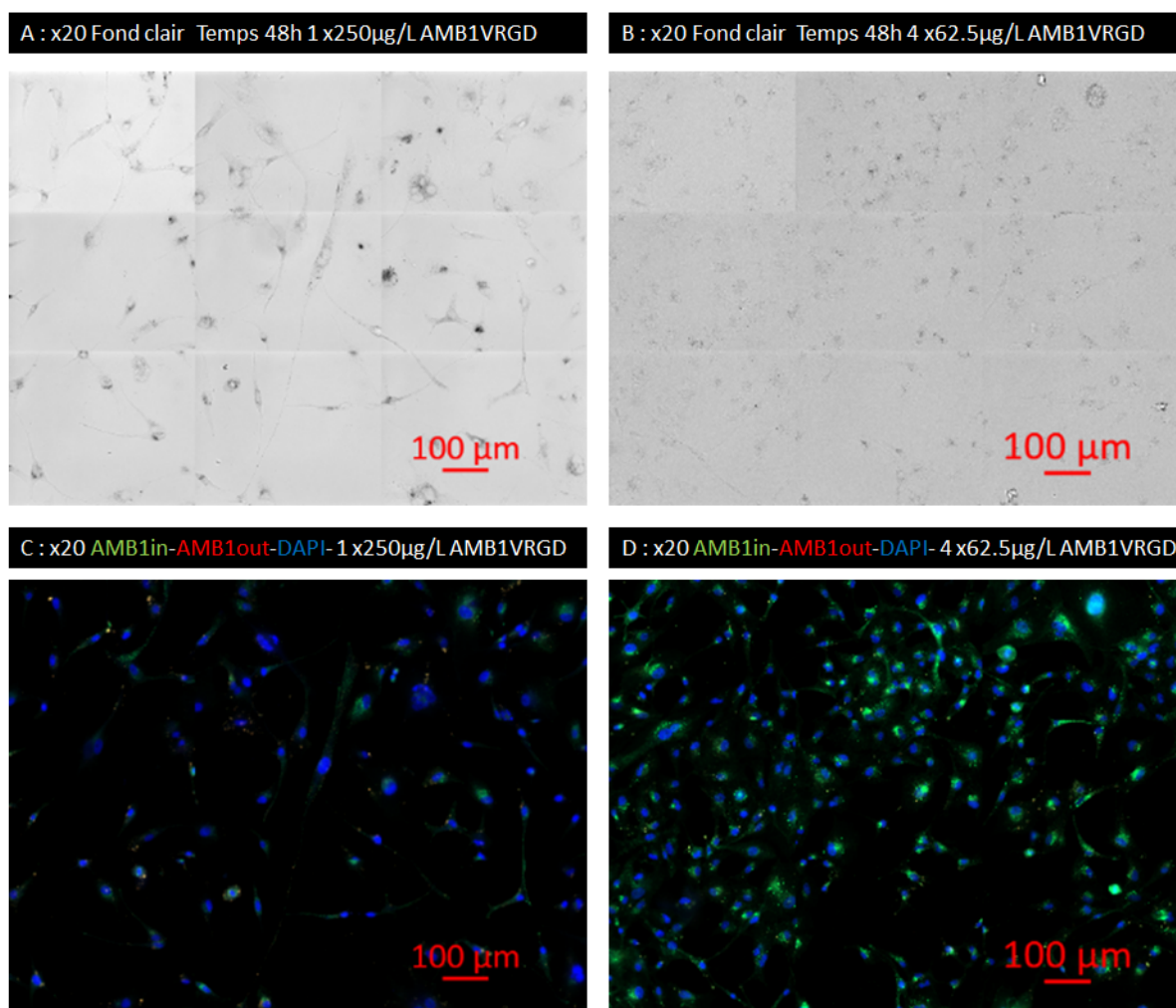


FIG. 2.17 – Cinétique d'incorporation des magnétosomes AMB1-VRGD après 48 heures d'incubation, dose unique 250 $\mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$ versus 4 x 62,5 $\mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$, révélés par l'anticorps anti-AMB1, mosaïques d'images grossissement x20

La Figure 2.17 montre l'augmentation du nombre de magnétosomes AMB1-VRGD incorporés au cours du temps lorsque la mise en contact est progressive, par rapport à une dose unique. Les images sont des mosaïques de 9 champs de vue pris à un grossissement x 20, en fond clair (A et B) et en fluorescence (C et D). La meilleure dispersion des magnétosomes apportés en quatre fois, fait que l'image en fond clair semble indiquer que les cellules sont moins chargées en magnétosomes internalisés que ne le révèle l'anticorps anti-AMB1. En condition un seul traitement, on distingue plus d'amas visibles uniquement en fond clair, dans/sur les cellules, non reconnus par l'anticorps anti-AMB1. On remarque également que bien qu'ensemencées dans les mêmes conditions, la densité des cellules en condition un seul traitement est plus faible, il se peut que leur croissance soit ralentie par la présence des magnétosomes, ou bien que plus de cellules se soient décrochées lors des rinçages successifs.

La Figure 2.18 compare deux champs de vue par condition, la Figure 2.19 montre les ROI sur ces champs de vue. Ces figures illustrent bien que les images en fluorescence et en fond clair ne sont pas forcément corrélées. L'image en fluorescence permet de visualiser les magnétosomes finement dispersés dans le cytoplasme en condition $4 \times 62,5 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$, mais ne permet plus de visualiser les amas importants présents dans certaines cellules à la condition un seul traitement. À contrario, l'image en fond clair seule en condition quatre apports est trompeuse, donnant une impression de faible incorporation. Afin d'étudier l'incorporation il est nécessaire de considérer les deux observations, sans se limiter à l'utilisation de l'anticorps anti-AMB1 en fluorescence.

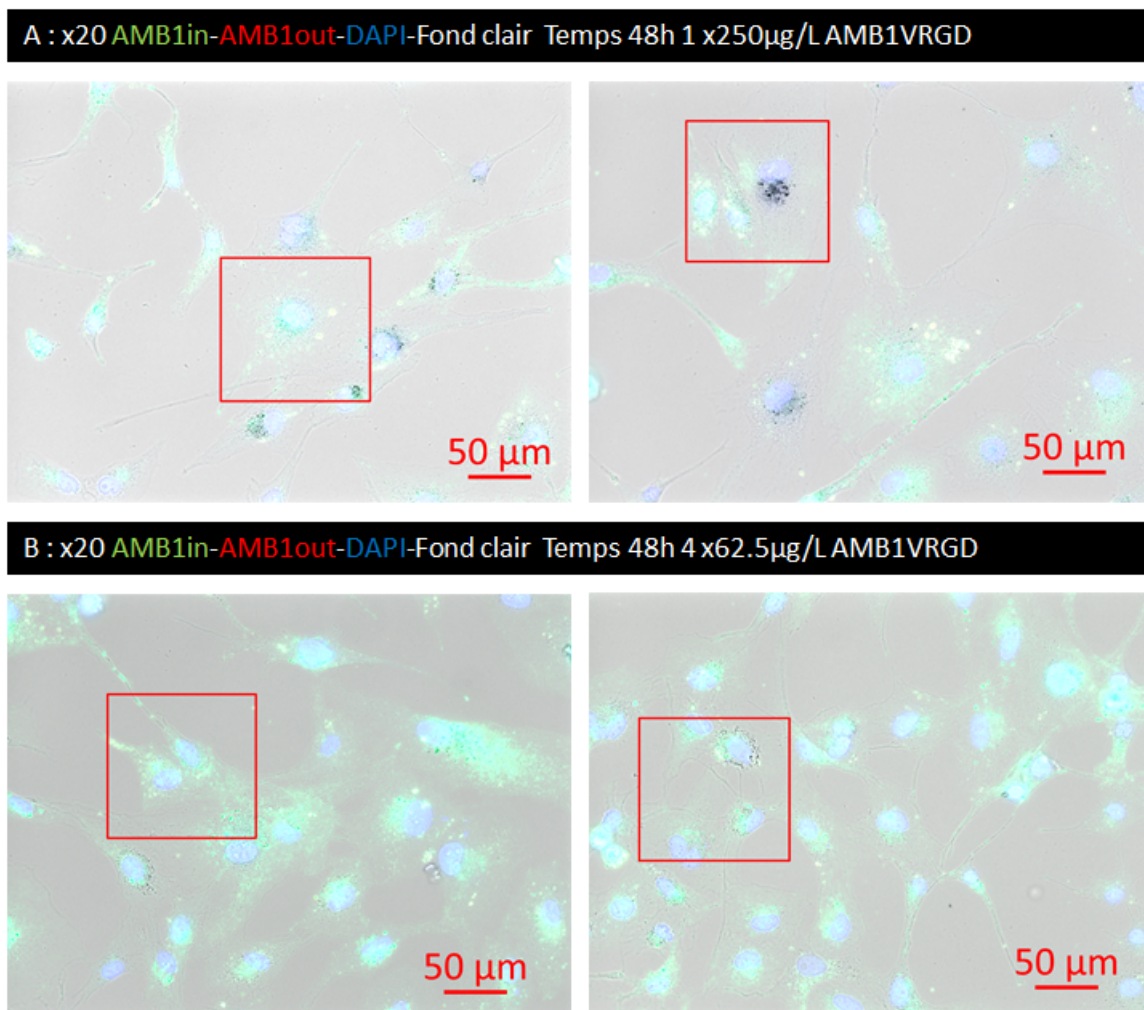


FIG. 2.18 – Cinétique d'incorporation des magnétosomes AMB1-VRGD après 48 heures d'incubation, dose unique $250 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$ versus $4 \times 62,5 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$, révélés par l'anticorps anti-AMB1, grossissement x 20

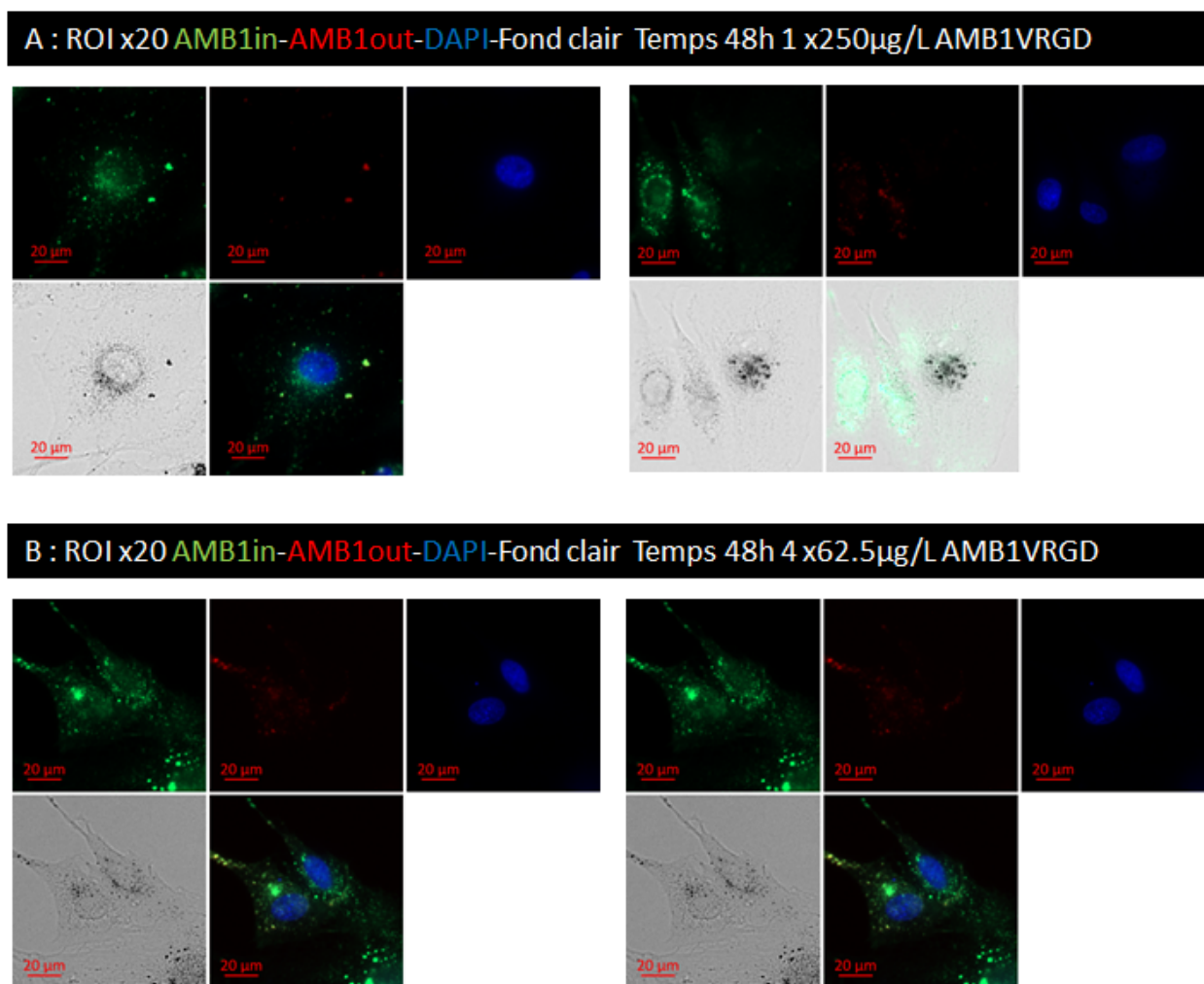


FIG. 2.19 – Cinétique d'incorporation des magnétosomes AMB1-VRGD après 48 heures d'incubation, dose unique 250 μ g_{Fer}/L versus 4x 62,5 μ g_{Fer}/L, révélés par l'anticorps anti-AMB1, grossissement x 20 ROI de la Figure 2.18

Le multi-traitement en quatre fois homogénéise l'incorporation des magnétosomes dans l'ensemble des cellules, par rapport à un traitement unique où certaines cellules sont plus chargées que d'autres. Le mécanisme dynamique d'incorporation des magnétosomes par représentation à la membrane de la cible intégrine $\alpha_v\beta_3$ après relargage des magnétosomes dans le cytoplasme, semble bien se confirmer. Ce mécanisme dynamique ne semble pas perturbé par la charge de fer croissante des cellules au cours du temps. Il semble donc que la limitation d'incorporation dans les cellules au cours du temps vient plus de l'agrégation progressive des magnétosomes entre elles, qui bloque leur internalisation, que de la quantité apportée au départ. La question qui se pose maintenant est de savoir si les cellules sont capables d'incorporer plus de magnétosomes apportés en une seule fois, à une concentration plus élevée, en condition de dispersion.

2.2.6 IRM sur cellules *in vitro*

Une étude multi-modale a été réalisée en comparant l'incorporation du fer dans les cellules par IRM (11,7 T) et par la coloration Perl's. Deux concentrations en fer ont été comparés au temps d'incubation 48h (250 et 1000 $\mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$) versus des cellules non traitées pour l'étude IRM.

Brièvement, les cellules ont été mises en contact avec les magnétosomes AMB1-VRGD pendant 48 heures, sur des boîtes à fond de verre pour la microscopie, en flacons de culture 25 cm^2 pour l'étude IRM, dans les conditions déjà décrites précédemment. Au temps 48 heures, les cellules sur boîtes à fond de verre ont été rincées puis fixées au PFA 4% 15 minutes et de nouveau rincées deux fois, puis gardées à $+4^\circ\text{C}$ jusqu'au moment de la coloration, effectuée en suivant le protocole décrit à l'Annexe [A.9](#).

Les cellules pour l'étude IRM ont été recueillies pour chaque condition (voir Annexe [A.3.1](#)). Une suspension cellulaire à 10 millions de cellules/mL a été préparée pour chaque condition. Un aimant a permis de vérifier que les magnétosomes de fer étaient bien toujours magnétiques, par une visualisation du déplacement des magnétosomes sur le côté du tube Eppendorf où a été fixé l'aimant. Les suspensions cellulaires ont été diluées au demi dans de l'agarose à 0,6% à 60°C , et des tubes ont été préparés pour passage à l'IRM 11,7 T.

La séquence utilisée a été la même que celle utilisée pour les mesures de relaxométrie initiales, permettant d'obtenir le paramètre T_2 (séquence MSME, pour Multi-slice Multi-echo). La valeur initiale du paramètre T_2 a été obtenue sur les cellules non traitées. Pour analyser les résultats, nous avons choisi d'utiliser non pas une gamme de référence déjà utilisée pour les fantômes (magnétosomes dispersés dans l'agarose), mais d'utiliser la décroissance du signal. En effet, nous avons émis l'hypothèse que les magnétosomes incorporés dans le cytoplasme cellulaire pouvaient de pas avoir les mêmes propriétés d'agent de contraste que ceux dispersés dans l'agarose (fantômes).

La Figure [2.20](#) montre le contenu en fer de cellules U87MG, incubées 48 heures avec les magnétosomes fonctionnalisés, à deux concentrations différentes (250 $\mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$ et 1000 $\mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$), avec la coloration Perl's en comparaison avec l'IRM. La concentration en fer des cellules incubées à 1000 $\mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$ est 3,5 fois plus forte que celle des cellules incubées à 250 $\mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$ en imagerie IRM, ce qui paraît être très bien corroboré avec le résultat des cellules colorées avec le Bleu de Prusse.

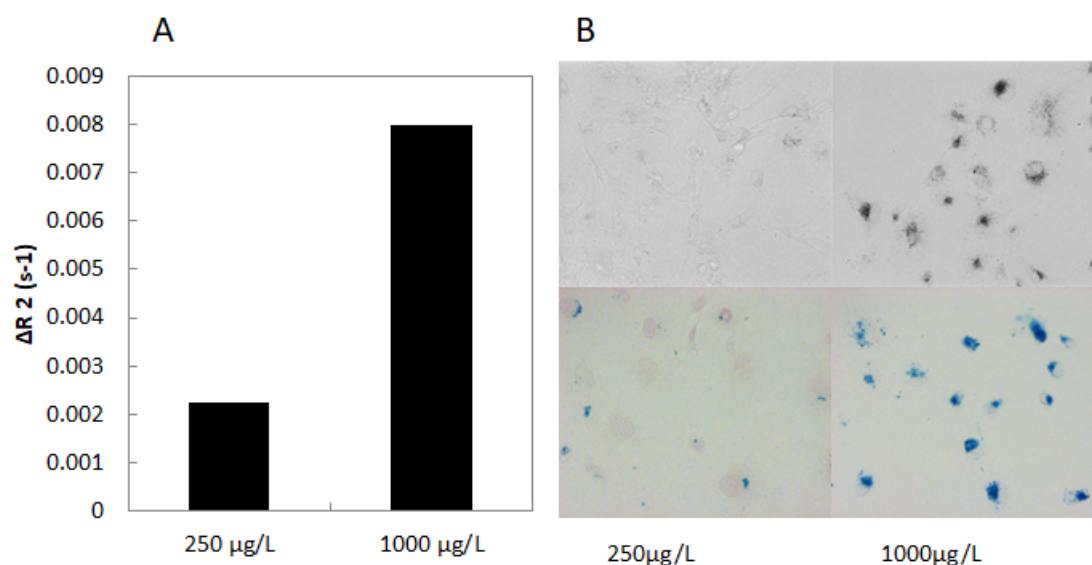


FIG. 2.20 – Révélation du contenu en fer par IRM (A) et par coloration Perl's versus le fond clair (B), après incubation 48h à 250 $\mu\text{g}_{\text{Fe}}/\text{L}$ et 1000 $\mu\text{g}_{\text{Fe}}/\text{L}$

La trypsine utilisée pour décoller les cellules ayant probablement éliminé les magnétosomes résiduels hors cellules, nous avons pensé que la prise de contraste observée en IRM était uniquement due aux magnétosomes présents dans le cytoplasme, ce qui confirme la possibilité d'une accumulation importante du fer intracellulaire au cours du temps, gardant toutes ses propriétés superparamagnétiques. L'incorporation des magnétosomes est clairement liée à l'effet dose et les cellules peuvent se charger de grandes quantités de magnétosomes sans observer de mort cellulaire.

Les conclusions des études *in vitro* sont donc :

- Le ciblage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ par le peptide RGD est efficace.
- La fluorescence Venus est insuffisante pour identifier les magnétosomes au cours du temps, elle est partiellement dégradée dans le cytoplasme.
- Les cellules incorporent de plus en plus de magnétosomes AMB1-VRGD au cours du temps, un effet dose étant visible au microscope et à l'IRM.
- L'incorporation est supérieure en multi-traitements qu'en mono-traitement.

2.2.7 Modèles cellulaires 3D

Les modèles cellulaires en 3D sont particulièrement intéressants pour mimer les interactions cellulaires qui ont lieu dans les tumeurs *in vivo*. L'échec de traitements anti-tumoraux *in vivo*, efficaces sur modèles cellulaires 2D, a conduit la communauté scientifique à s'intéresser de plus en plus aux modèles *in vitro* en 3D.

Je développerai plus particulièrement cette problématique dans l'introduction du Chapitre 4, Projet 3D (Paragraphe 4.1). Des premiers essais sur modèles 3D *in vitro* ont été réalisés en même temps que les essais 2D et se sont poursuivis après la fin du projet Mefisto. Les modèles et leurs applications dans le projet Mefisto sont décrits dans le chapitre Projet 3D, Paragraphes 4.2 et 4.6.2.

2.3 Résultats *in vivo*

2.3.1 Modèle tumoral

Le modèle tumoral choisi est le glioblastome consistant en l'implantation intracérébrale de cellules humaines de glioblastome de grade IV chez la souris immunodéficiente nude (cellules U87MG déjà utilisées *in vitro*).

Brièvement, les cellules U87MG cultivées comme décrit à l'Annexe A.3.1, sont prélevées et une suspension cellulaire à 60 millions cellules/mL est préparée en DPBS et gardée sur glace jusqu'à l'implantation intracérébrale. Les animaux reçoivent une injection intramusculaire d'antalgique (buprécare 0,1 mg/kg, 10 mL/kg) 30 minutes avant la chirurgie. Puis les animaux sont anesthésiés à la xylazine/kétamine (10/100 mg/kg, 10 mL/kg).

La peau du crâne est désinfectée à la bétadine et une incision de quelques millimètres est réalisée au scalpel. L'animal est ensuite positionné dans un cadre de stéréotaxie. Une ouverture est réalisée à la fraise dentaire aux coordonnées permettant une injection dans le striatum (sur Bregma, 2 mm latéral droit). 2 μ L de suspension cellulaire (120 000 cellules) sont injectés à l'aide d'une seringue Hamilton, sur une durée de 5 minutes. La seringue Hamilton est remontée par pallier et l'ouverture est bouchée à la cire à os. La peau est suturée au fil résorbable (vicryl 4.0) et la peau est de nouveau désinfectée à la bétadine.

L'animal est gardé en observation, dans une couveuse à 34°C, jusqu'au réveil complet. Une antalgie est apportée par l'ajout de Doliprane dans l'eau de boisson, jusqu'à trois jours après l'opération. Les animaux sont observés quotidiennement durant le durée de l'étude, tout signe clinique est rapporté et des actions sont entreprises pour pallier à la souffrance si nécessaire.

Les animaux récupèrent pendant une semaine après la chirurgie avant de commencer les études IRM. La taille et la croissance des tumeurs sont évaluées à chaque session d'IRM, les animaux dont la tumeur présente un diamètre supérieur à quatre mm un vendredi sont euthanasiés. À la fin de l'étude, les animaux sont sacrifiés par exsanguination-perfusion (voir protocole à l'Annexe B.4), pour prélever les organes d'intérêt pour des études histologiques ou pour mesurer le fer par un dosage spectroscopie ICP (Inductively Coupled Plasma).

2.3.2 Résultats IRM *in vivo*

Les magnétosomes ont été injectés chez la souris saine, comme décrit au Paragraphe 2.1.4, puis chez la souris porteuse de tumeur U87MG en orthotopique. Ce travail a fait l'objet de la thèse de Mariane Boucher [Boucher, 2016] et d'une publication [Boucher *et al.*, 2017b].

Etudes préalables

Brièvement, nous avons commencé par caractériser le modèle animal à l'IRM, afin de déterminer les meilleurs paramètres pour l'acquisition IRM et de reconstruction 3D de la croissance tumorale *in situ*. Il a été déterminé que les tumeurs poussent de façon assez reproductible et lentement jusqu'à 15 jours après l'implantation, puis que de 15 à 27 jours la croissance devient exponentielle et plus variable d'un individu à l'autre (voir Figure 2.21).

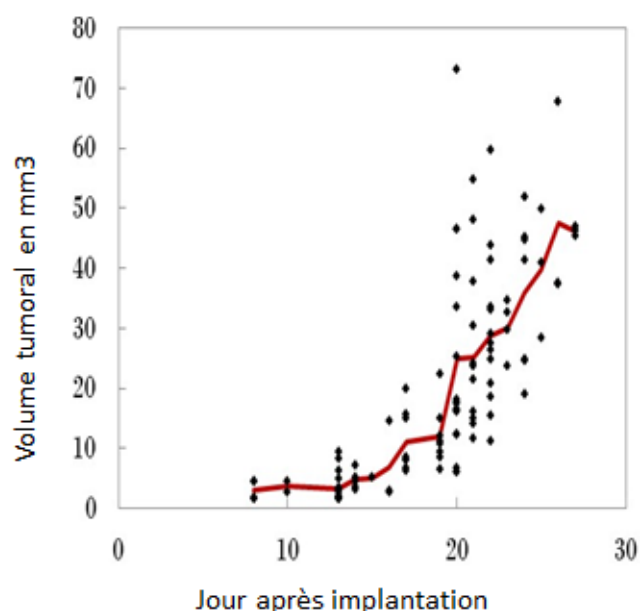


FIG. 2.21 – Croissance des tumeurs U87MG mesurée par IRM après l'implantation chez la souris nude

En termes de reconstruction 3D, la forme ellipsoïde est ce qui correspond le mieux, comparativement à la forme cylindrique et à la forme sphérique, ce qui correspond au trajet de l'aiguille lors de l'implantation.

Puis le modèle animal a été utilisé pour caractériser les propriétés d'agent de contraste des magnétosomes par rapport à un produit développé par Guerbet, le P904. Une étude a été réalisée en injectant les deux types de magnétosomes dans des souris porteuses de tumeur et en comparant le réhaussement de la vascularisation dans et hors de la tumeur, afin de déterminer si la vascularisation tumorale peut être identifiée par cette méthode. Des angiogrammes cérébraux ont été réalisés en comparant la zone tumorale et la zone contralatérale, sans arriver à obtenir de différence significative, la microcirculation tumorale n'est donc pas décelable par cette technique [Boucher, 2016].

Néanmoins un effet de réhaussement du signal dans la tumeur, lié à la forme et à la fonctionnalité des vaisseaux sanguins tumoraux, effet appelé EPR (EPR, pour Enhanced Permeability and Retention Effect), a été détecté. C'est un effet de rétention des agents de contraste, dû à la tortuosité et l'anormalité des vaisseaux sanguins tumoraux dont la Barrière hématoencéphalique est déficiente rendant les vaisseaux tumoraux plus perméables, en lien avec la réaction inflammatoire [Andrieux et Couvreur, 2009, Brigger *et al.*, 2012]. Cet effet a été démontré sur notre modèle avec plusieurs types d'agents de contraste, notamment les magnétosomes AMB1-WT. L'effet EPR se voit dès 15 minutes après l'injection des magnétosomes AMB1-WT, comme décrit à la Figure B.2 (voir Annexe B.3.1) et jusqu'à au moins 100 min après injection, par voie intraveineuse d'une suspension de magnétosomes à 200 μ moles de fer par kg.

Etudes avec les magnétosomes AMB1V et AMB1VRGD

Afin de comparer les produits de contraste de façon la plus pertinente possible, les souris porteuses de tumeurs ont été sélectionnées de façon à être à un stade similaire de la croissance tumorale au jour de l'injection (3 à 3,5 mm de diamètre). L'imagerie IRM a été réalisée à 11,7T, avec des séquences FLASH, MGE et RARE (voir Annexe B.1). En présence des NPs de fer, le signal de l'eau diminue (hyposignal). La mesure semi-quantitative du contenu en fer de la tumeur a été réalisée en comparant les images avant et après injection et en utilisant le paramètre de la variation de la relaxation transverse ΔR_2^* pour créer des cartes de réhaussement du signal T_2^* [Gambarota *et al.*, 2008].

Une première étude a consisté à comparer les magnétosomes AMB1-V et AMB1-VRGD, avant et après injection intraveineuse à 200 μ mol de fer/kg, à la veine caudale de souris porteuses de tumeur, à temps court (15 minutes) puis 100 minutes. La Figure B.3 (voir Annexe B.3.2) montre le réhaussement du signal du fer dans la tumeur traitée par AMB1-VRGD par rapport à AMB1-V, 100 minutes après injection.

Encouragés par ces premiers résultats, nous avons continué d'investiguer à temps plus long, 24 heures après l'injection. Cela nécessite de réveiller l'animal et de le repositionner dans le scanner, de la même façon 24 heures après.

La Figure 2.22 montre le réhaussement du signal après 24 heures, avec en Image A les images FLASH, sensibles aux magnétosomes de fer (hyposignal), avec la tumeur identifiée par une flèche blanche. Pour quantifier les variations du signal en présence des magnétosomes, on utilise des cartes T_2^* (Image B) que l'on analyse avec le paramètre ΔR_2^* (Image C). L'image C montre les différences en contenu en fer avant et après injection pour les deux types de magnétosomes. Un test statistique de Wilcoxon a permis de montrer une différence significative entre les animaux injectés avec les magnétosomes fonctionnalisés par rapport à ceux injectés avec les magnétosomes non fonctionnalisés à 24 heures [Boucher *et al.*, 2017b].

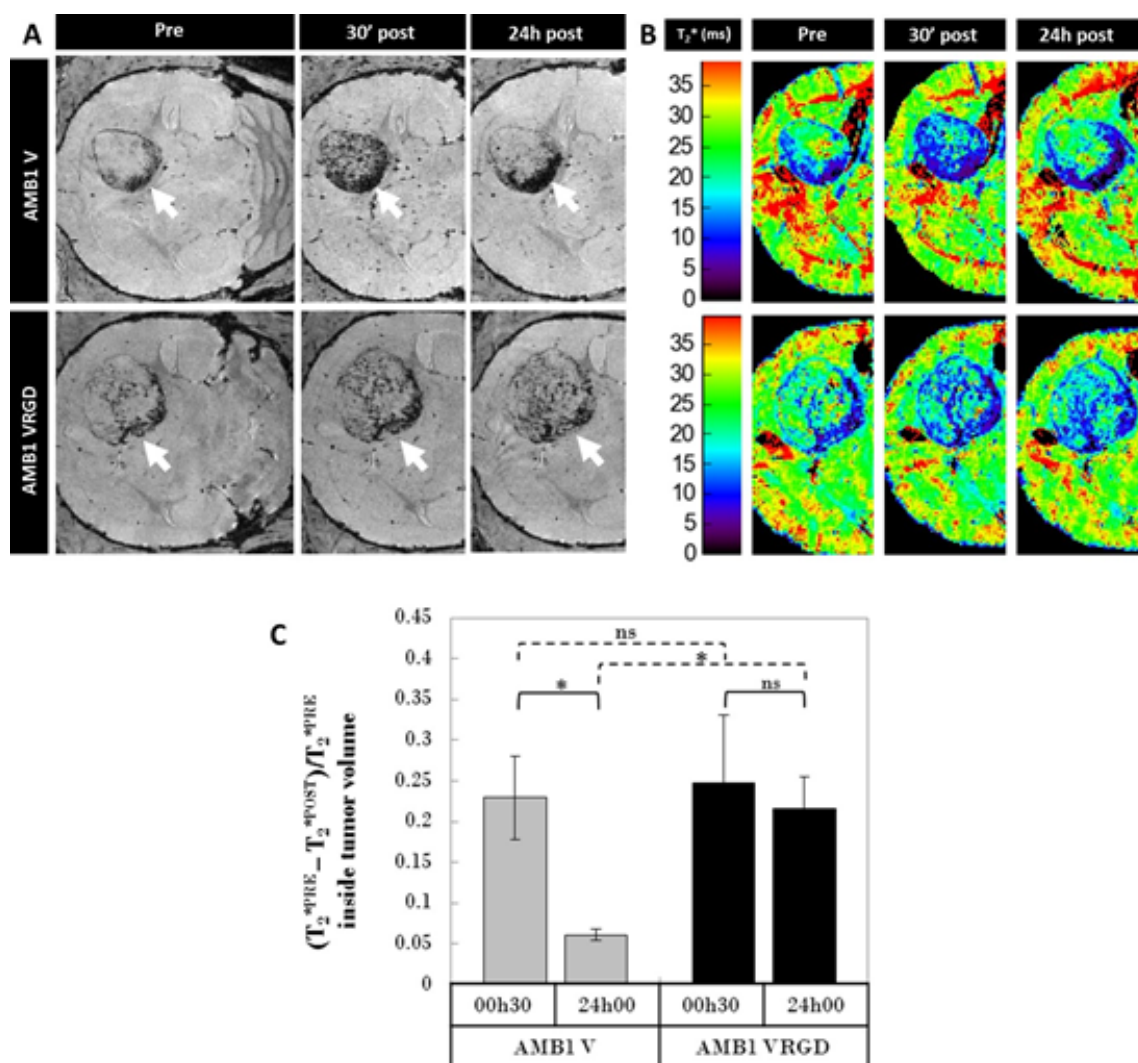


FIG. 2.22 – Réhaussement du signal du fer 24h après injection de magnétosomes AMB1-V (n=4) et AMB1-VRGD (n=5) à 200 μ mole de fer/kg : en A images FLASH, en B cartes de réhaussement du signal, en C histogrammes du paramètre ΔR_2^* mesuré en IRM

La prise de contraste n'est pas différente 30 minutes après l'injection des magnétosomes AMB1-V et AMB1-VRGD, mais après 24h, le contenu en fer des tumeurs AMB1-V est nettement plus faible, alors que le contenu en fer des tumeurs AMB1-VRGD n'a que peu diminué. Cela nous a conforté dans l'idée que les magnétosomes fonctionnalisés sont bien restés dans la tumeur au contraire des magnétosomes non fonctionnalisés, éliminés après ce même laps de temps. Néanmoins, il faut noter une assez grande disparité entre les animaux, comme présenté à la Figure B.4 (voir Annexe B.3.2), certains animaux présentant une prise de contraste beaucoup plus forte que d'autres, à condition égale. Il faut aussi noter que durant ces 24h, la croissance des tumeurs étant dans sa phase exponentielle, elles continuent de croître, entraînant de fait une dilution du signal. Les études *ex vivo*, présentées au Paragraphe 2.4.1, ont permis de confirmer la présence des magnétosomes fonctionnalisés dans les tumeurs.

Les résultats *in vitro* ayant montré une meilleure incorporation dans les cellules après de multiples traitements par rapport à un seul ajout dans le milieu de culture, une étude a été réalisée *in vivo* pour déterminer si le contenu en fer des tumeurs change en apportant la même quantité de fer en deux fois, puis en trois fois, par rapport à une seule injection. La Figure 2.23 montre le réhaussement du signal apporté par la dose de 200 μmoles de fer/kg, observé avec une injection ou bien en deux injections de 100 μmoles de fer/kg, à six heures d'intervalle (A), ou encore en trois injections de 66 μmoles de fer/kg avec six heures d'intervalle entre les deux premières injections, puis dix-sept heures entre la deuxième et la troisième injection (B). Le réhaussement du signal IRM semble plus important lorsque les magnétosomes sont apportés en plusieurs fractions de dose [Boucher, 2016].

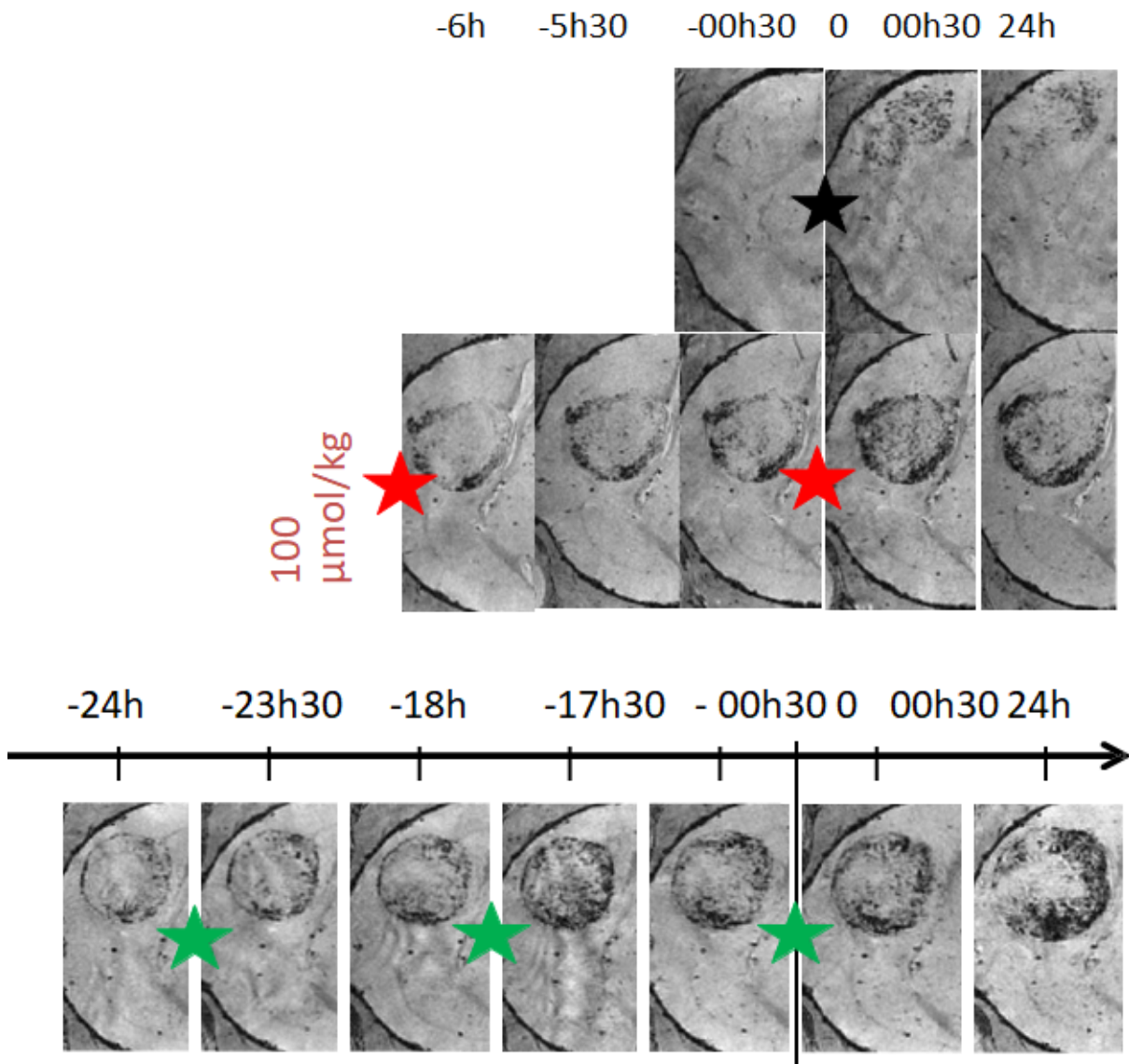


FIG. 2.23 – Comparaison du réhaussement du signal IRM 24h après 1 (étoile noire), 2 (étoiles rouges) ou 3 (étoiles vertes) injections de magnétosomes AMB1-VRGD, dose admistrée égale à 200 μmoles de fer/kg/animal, images FLASH

La semi-quantification réalisée sur les images FLASH montre en Figure 2.24 que l'injection en deux fois d'une dose de 100 μmoles de fer/kg donne un réhaussement plus élevé dans la tumeur qu'une unique dose de 200 μmoles de fer/kg. L'injection en trois fois ne réhausse pas le signal par rapport à deux injections mais au vu de la croissance tumorale observée entre la deuxième et la troisième injection, il est probable que l'augmentation du nombre de cibles fausse le résultat. Cette étude confirme la dynamique d'incorporation évaluée *in vitro*, la présentation à la membrane de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est à prendre en compte dans la cinétique de traitement de la tumeur. Les magnétosomes en excès par rapport aux cibles sont probablement éliminés avant que les intégrines soient de nouveau présentées à la membrane.

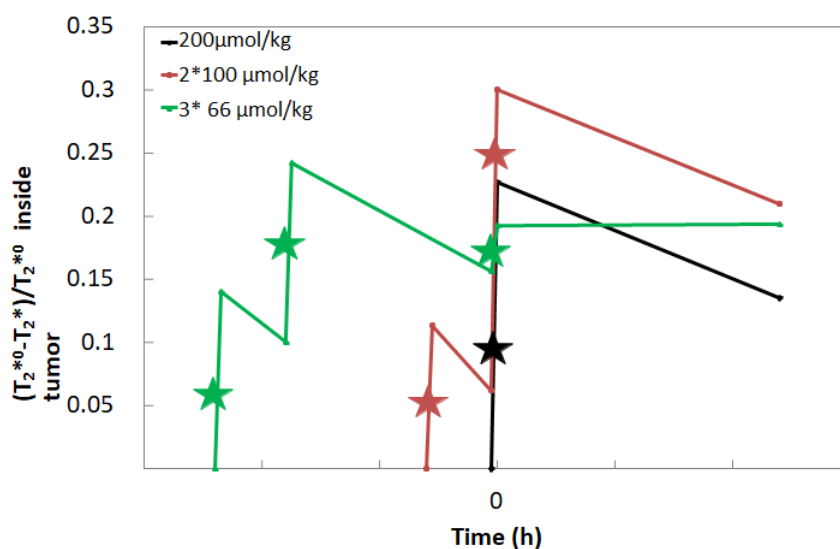


FIG. 2.24 – Quantification du réhaussement du signal IRM dans les tumeurs mesurée en IRM, après 1 (étoile noire), 2 (étoiles rouges) ou 3 (étoiles vertes) injections de magnétosomes AMB1-VRGD, dose administrée égale à 200 μmoles de fer/kg/animal

Les conclusions des études *in vivo* sont donc :

- L'effet EPR permet aux magnétosomes de s'accumuler dans les tumeurs cérébrales.
- Le ciblage par VRGD permet d'incorporer plus de magnétosomes dans les tumeurs que les magnétosomes non fonctionnalisés.
- Le traitement en deux demi-doses permet d'incorporer plus de magnétosomes qu'une seule dose.

2.4 Résultats *ex vivo*

Les pièces anatomiques prélevées après les études *in vivo* sont conservées à -80°C pour être utilisées pour les études histologiques, après découpe au cryostat, ou pour les études de toxicologie par ICP.

2.4.1 Histologie

Les protocoles sont décrits à l'Annexe B.5, les références des anticorps utilisés sont regroupés à l'Annexe D.4.

Plusieurs études histologiques ont été menées, les premières analyses de traitement de données ont été réalisées en utilisant Matlab (Mathworks, USA) [Boucher *et al.*, 2017b]. Les suivantes ont été réalisées après la fin du projet, j'ai traité les données en utilisant le logiciel Imaris (Bitplane).

Tout d'abord, nous avons utilisé l'histologie pour confirmer la différence observée à l'IRM entre les souris traitées par les magnétosomes AMB1-V et AMB1-VRGD, dans le cerveau, en immunomarquage et en coloration au Bleu de Prusse.

Une deuxième étude a concerné un autre organe d'intérêt observé en IRM, le foie, pour confirmer la captation des magnétosomes par les cellules immunitaires et l'inocuité à court terme au niveau des hépatocytes.

Puis lors d'une troisième étude, nous nous sommes intéressés aux types cellulaires captant les magnétosomes AMB1-VRGD dans le cerveau, en utilisant les marqueurs des cellules endothéliales, gliales et microgliales en plus de l'anticorps reconnaissant l'intégrine $\alpha_{\nu}\beta_3$. Enfin d'autres marqueurs ont été étudiés, pour déterminer si les magnétosomes sont captés par des cellules exprimant des marqueurs de néoangiogenèse, de CSCs, de la voie de signalisation EMT.

AMB1V versus AMB1VRGD : Cerveau

Les cerveaux de souris ont été coupés au cryostat en coupes de $20\ \mu\text{m}$. Puis les coupes de souris porteuses de tumeurs ont été immunomarquées pour déterminer l'incorporation des magnétosomes dans la tumeur et la colocalisation avec les vaisseaux sanguins.

Un triple marquage associant un anticorps rat anti-CD31 (qui permet d'identifier les vaisseaux sanguins), l'anticorps anti- $\alpha_{\nu}\beta_3$ déjà utilisé *in vitro* et l'anticorps de lapin anti-AMB1 développé en interne pour reconnaître les membranes des magnétosomes. L'anticorps anti- $\alpha_{\nu}\beta_3$ nous a permis de délimiter la tumeur pour traiter les images. À noter que le marquage anti- $\alpha_{\nu}\beta_3$ n'est pas homogène dans les tumeurs, certaines zones expriment plus l'intégrine que d'autres dans une même tumeur, et il y a également une hétérogénéité notable entre animaux.

Les immunomarquages ont permis de confirmer que les magnétosomes sont retrouvés principalement dans la tumeur (traitée avec l'un ou l'autre des magnétosomes), l'exsanguination ayant éliminé les magnétosomes circulants. Comme vu à l'IRM, l'effet EPR permet une accumulation des magnétosomes, fonctionnalisés ou non, dans les tumeurs, mais la fonctionnalisation par VRGD permet une accumulation supérieure dans les tumeurs par rapport aux magnétosomes non fonctionnalisés, même après exsanguino-perfusion.

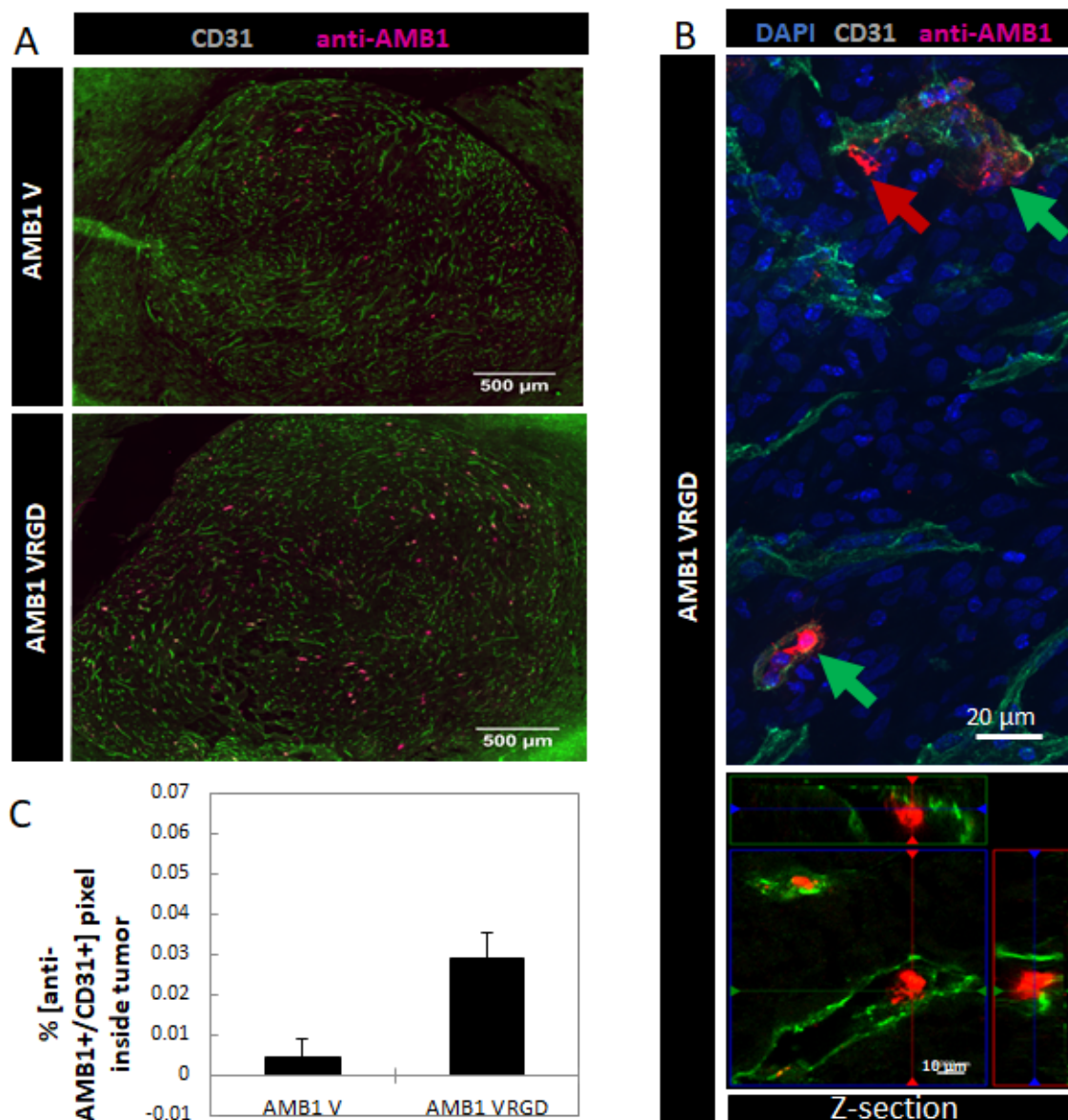


FIG. 2.25 – Triple marquage sur souris traitées avec des magnétosomes AMB1-V versus AMB1-VRGD, 200 μ moles de fer/kg en une injection, avec les anticorps anti-AMB1 plus anti-CD31 plus anti- $\alpha_v\beta_3$ à un grossissement x10 (A), un grossissement x63 (B). Estimation de la colocalisation des magnétosomes (AMB1+) et des vaisseaux sanguins (CD31+) dans la tumeur (C).

La Figure 2.25 montre la différence entre les tumeurs traitées par les magnétosomes fonctionnalisés AMB1-VRGD et par les magnétosomes non fonctionnalisés AMB1-V. L'image A montre les tumeurs, avec en Alexa 488 (vert) le marquage des vaisseaux sanguins (anti-CD31), très nombreux dans les tumeurs U87MG. Les tumeurs traitées par les magnétosomes fonctionnalisés AMB1-VRGD montrent une plus grande proportion de marquage anti-AMB1 (Alexa 647, rouge) que les tumeurs traitées avec les magnétosomes non fonctionnalisés AMB1-V.

L'image B montre à plus fort grossissement (x 63) la présence des magnétosomes fonctionnalisés dans les vaisseaux sanguins (flèche verte) et hors de ceux ci (flèche rouge). L'histogramme en C correspond à une étude semi-quantitative réalisée avec Matlab, permettant de déterminer le pourcentage de pixels colocalisant AMB1 et CD31 dans la tumeur. Les tumeurs traitées par les magnétosomes fonctionnalisés retiennent environ 6 fois plus de magnétosomes, dans ou sur les vaisseaux sanguins que celles traitées avec les magnétosomes non fonctionnalisés, 24 heures après une seule injection de magnétosomes à 200 μ moles de fer/kg.

La première analyse ne concernait que les animaux traités en une seule fois, par les magnétosomes AMB1-V versus AMB1-VRGD. Une deuxième analyse a donc été réalisée pour comparer la différence entre les animaux traités par VRGD, en une ou deux fois. Cette analyse a été réalisée avec le logiciel Imaris, contrairement à la première analyse réalisée avec Matlab (Histogramme de l'image 2.25). Le logiciel Imaris a été acquis après le projet Mefisto, il permet des analyses plus précises que le programme exécuté en Matlab.

Une différence de résultats apparaît entre les deux analyses. L'analyse Matlab a été réalisée sur les images à un grossissement x 10 et sous-estime sans doute le nombre de magnétosomes, les magnétosomes finement dispersés étant passés sous le seuil d'analyse. L'analyse Matlab n'a pas été refaite avec le logiciel Imaris, l'intérêt de la fonctionnalisation par VRGD étant suffisamment établie.

L'analyse avec le logiciel Imaris a été réalisée sur les images prises à un grossissement x 20 mieux résolues, mais utilise les surfaces avec une légère surestimation due aux effets de saturation et de diffusion des amas de magnétosomes, difficiles à éviter sans perdre les magnétosomes plus finement dispersés, notamment hors des vaisseaux sanguins.

L'analyse par Imaris a été réalisée sur une coupe de tumeur par animal, chaque groupe comprenant quatre animaux, la moyenne des valeurs obtenues par Imaris est présentée à l'Annexe B.7.

Brièvement, pour chaque animal une mosaïque de champs de vue a été acquise à un grossissement de x 20. L'analyse par Imaris consiste à délimiter une région d'intérêt sur la tumeur, formant un masque afin de déterminer le pourcentage de surface correspondant au marquage par AMB1 dans la tumeur par rapport à l'aire de la tumeur. Le même procédé permet de définir la surface vasculaire dans la tumeur et le pourcentage de magnétosomes AMB1-VRGD colocalisant avec les vaisseaux puis par déduction le pourcentage de magnétosomes hors des vaisseaux.

La Figure 2.26 montre la différence entre les tumeurs traitées par les magnétosomes fonctionnalisés AMB1-VRGD à 200 μ moles de fer/kg, une seule injection ou deux injections de 100 μ moles de fer/kg espacées de 6 heures. Un test de Student T a permis de mettre en évidence une significativité entre les groupes, pour ce qui est du nombre de magnétosomes présents dans la tumeur (AMB1 +, * $P < 0,05$) et du nombre de magnétosomes colocalisant avec les vaisseaux sanguins dans la tumeur (AMB1+/CD31+, ** $p < 0,01$).

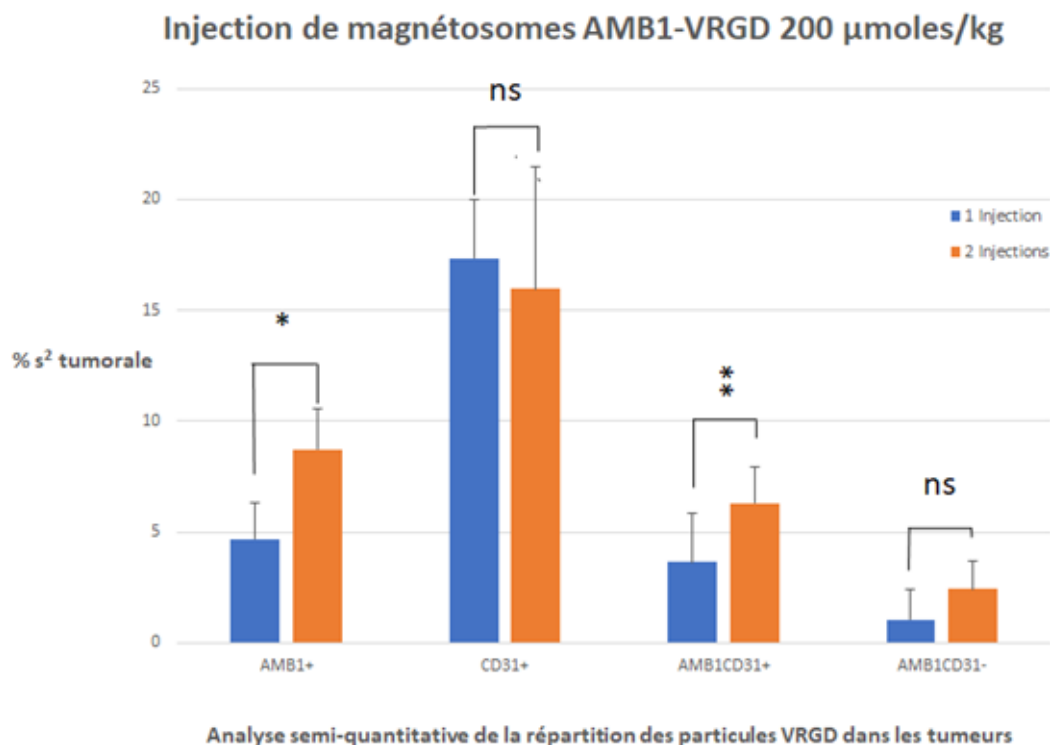


FIG. 2.26 – Etude semi-quantitative en histologie des tumeurs traitées par des magnétosomes AMB1-VRGD à une dose de 200 μ moles de fer/kg, en une ou deux injections (ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

Les résultats sont relativement similaires d'un animal à l'autre dans les groupes, le pourcentage de magnétosomes retrouvés dans les tumeurs traitées une seule fois est estimé à 4,69% pour le groupe de souris traitées en une seule fois et de 8,74 % pour le groupe de souris traitées en deux fois, soit presque le double alors que la dose est identique. Les magnétosomes co-localisant avec les vaisseaux sanguins sont majoritaires, 3,65% et 6,3% respectivement, la surface vasculaire étant quasi-identique dans chacun des groupes (17,35% et 15,98%). Nous retrouvons donc le résultat observé en IRM : le nombre de magnétosomes AMB1-VRGD retrouvés dans les tumeurs est plus élevé en fractionnant la dose de magnétosomes, et ce même après exsanguino-perfusion.

La coloration Perl's a aussi été réalisée sur quelques coupes de cerveaux de souris traitées avec des magnétosomes AMB1-V ou AMB1-VRGD, afin de comparer avec les immunomarquages. L'application pure et simple du protocole préconisé par le fournisseur des réactifs ne donne pas de marquage du fer satisfaisant en bleu, seuls quelques amas sont colorés en bleu, les autres restant bruns et on retrouve beaucoup moins de fer qu'attendu en comparant avec les immunomarquages, sur coupes adjacentes.

Mon hypothèse est que les trois membranes bi-lipidiques (de la cellule, des endosomes, des magnétosomes) entourant le cœur de fer des magnétosomes gênent l'accès au colorant, ainsi que le fait que cette coloration a été développée à l'origine pour des tissus en paraffine, et donc très déshydratés et dé-lipidémiés et non pas pour des coupes congelées.

Comme décrit pour le marquage des cellules en Annexe A.9, une étape de perméabilisation est donc là aussi nécessaire pour révéler le fer. De nombreux protocoles ont été testés, en variant le temps d'incubation, les détergents et même la fixation, tous ne donnant pas satisfaction, des magnétosomes restant non colorés et la quantité de magnétosomes retrouvées étant toujours nettement inférieure à celle obtenue avec l'immunomarquage AMB1. Un exemple des résultats obtenus avec divers protocoles est présenté en Annexe B.6 (Figure B.9).

En travaillant sur la coloration de microsphéroïdes, présentée au Chapitre 3 (Paragraphe 4.6.3), je suis revenue sur le protocole de coloration des coupes, en augmentant simplement le temps d'incubation en solution de perméabilisation (Triton X-100 0,2%) à 48 heures puis à 72 heures et en n'utilisant pas de contre-coloration. Les résultats sont plus pertinents, les magnétosomes visibles étant bien bleu vif mais on est encore loin de retrouver la quantité de magnétosomes observées avec les immunomarquages.

Mon hypothèse est que les magnétosomes se décrochent lors des étapes de perméabilisation et de coloration, notamment ceux initialement présents dans les vaisseaux sanguins, bien visibles en immunomarquages. La Figure 2.27 illustre la comparaison entre la coloration Perl's (48 heures de Triton X-100) et l'immunomarquage anti-AMB1. La coloration Perl's sur coupe ne permet donc pas de corréler l'imagerie par IRM et l'imagerie optique, contrairement aux immunomarquages et ne sera pas réalisée sur tous les animaux.

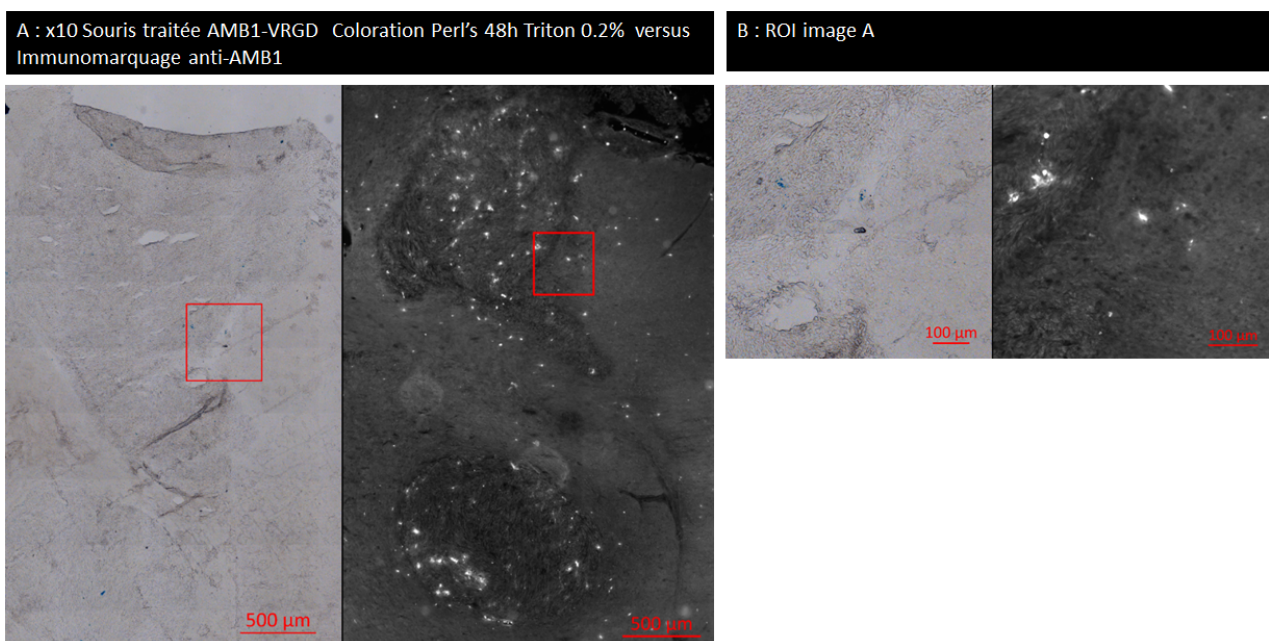


FIG. 2.27 – Comparaison de l'immunomarquage anti-AMB1 et de la coloration Perl's, grossissement x10

AMB1V versus AMB1VRGD : Foie

Les cellules du foie, hépatocytes et macrophages spécifiques, sont fortement impliquées dans la régulation du fer dans l'organisme [Rishi et Subramaniam, 2017, Nairz *et al.*, 2017]. Il est nettement visible à l'IRM que le foie capture une grande partie des magnétosomes injectés ainsi que la rate, très rapidement dès les dix premières minutes suivant l'injection.

Nous avons vérifié en histologie, sur un animal traité avec des magnétosomes AMB1-V et un animal avec des magnétosomes AMB1-VRGD (2 injections de 100 μ moles de fer/kg), si les magnétosomes sont bien capturés par les macrophages du foie, 24 heures après la fin de l'imagerie IRM, ou si les hépatocytes sont également impliqués. L'anticorps anti-CD68 permet de révéler les macrophages, l'anti-AMB1 permet de révéler les magnétosomes.

La Figure 2.28 montre bien l'incorporation des magnétosomes dans les macrophages du foie, quelque soit le traitement apporté, sur une coupe entière (Image A, mosaïque d'images à grossissement x 10) et à fort grossissement (Image B, x 63). Les hépatocytes ne semblent pas incorporer les magnétosomes, tous étant retrouvés dans les macrophages.

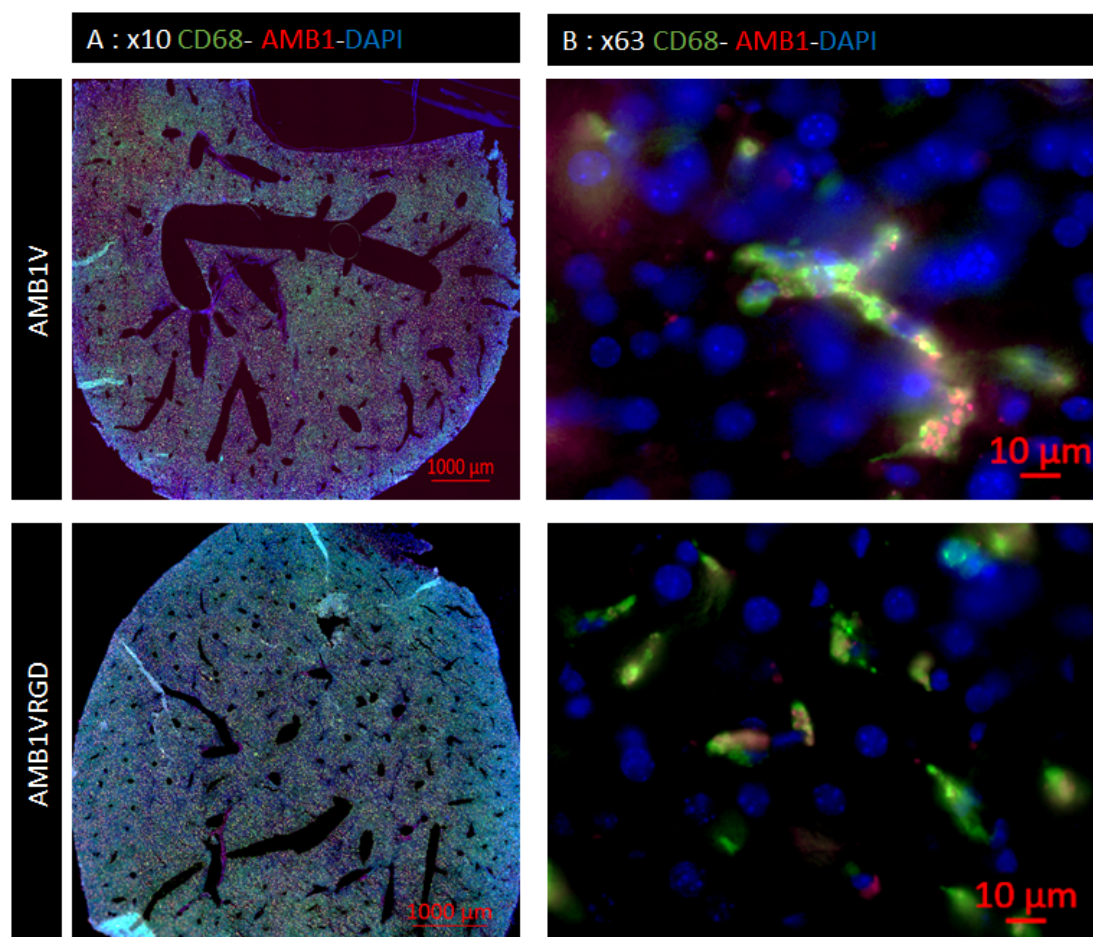


FIG. 2.28 – Double marquage sur souris traitées avec des magnétosomes AMB1-V et AMB1-VRGD, 200 μ moles de fer/kg en 2 injections, avec les anticorps anti-AMB1 (Alexa 647) et anti-CD68 (macrophages, Alexa 488), grossissement x10 (A) et x63 (B)

Nous avons également vérifié qu'il n'y a pas de signe d'apoptose et/ou de nécrose, signes de toxicité aiguë, 24h après l'injection. L'anticorps anti-caspase3 permet de cibler les cellules en apoptose [Taylor *et al.*, 2008], l'anticorps anti-RIP les cellules en nécrose [Liu *et al.*, 2019], les agglutinines de germe de blé (WGA pour Wheat Germ Agglutinin) permettent de délimiter les membranes cellulaires. Les anticorps primaires étant produits chez le lapin, il n'a pas été possible de réaliser un double marquage avec l'anti-AMB1, produit également chez le lapin, néanmoins l'image en fond clair permet de distinguer les magnétosomes de fer (en noir).

La Figure 2.29 montre qu'aucune nécrose n'est retrouvée (image B) et que très peu de cellules en apoptose sont visibles (image A, flèches oranges) et ce malgré la charge importante en magnétosomes, comme montrée par la Figure 2.28. Une région d'intérêt (images C et D), sur chacun des marquages permet de visualiser les magnétosomes en fond clair en plus des immunomarquages.

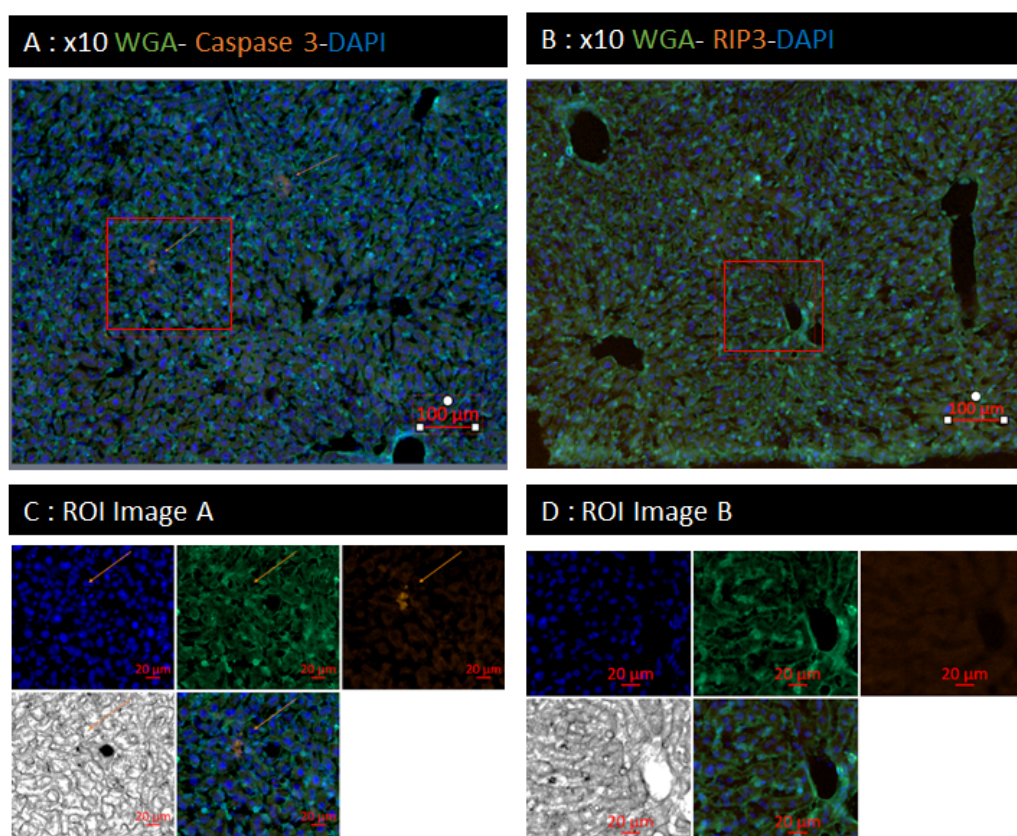


FIG. 2.29 – Marquage sur souris traitée avec des magnétosomes AMB1-VRGD, 200 μ moles de fer/kg en 2 injections, avec les anticorps anti-Caspase 3 ou anti-RIP3 (Alexa 594) plus un colorant membranaire WGA (Oregon 488), grossissement x10

AMB1-VRGD : cellules gliales, microgliales, macrophages

Nous nous sommes intéressés dans un deuxième temps aux cellules pouvant capter les magnétosomes dans le cerveau, hors cellules endothéliales et tumorales.

L'interaction des cellules gliales, des cellules microgliales et des macrophages circulants avec nos magnétosomes a été tout d'abord étudiée.

Les astrocytes sont identifiés par un marquage GFAP, pour Glial Fibrillary Acidic Protein, un filament intermédiaire du cytosquelette des cellules astrocytaires et de progéniteurs. L'activation astrocytaire est importante tout autour de la tumeur, jusqu'à atteindre l'hémisphère contralatéral (gliose). Les astrocytes sont très actifs en bordure de tumeur, encapsulant les cellules tumorales U87MG et limitant partiellement l'invasion [Silver *et al.*, 2013].

Partiellement parce que cette même astroglie en interaction avec le microenvironnement (matrice extracellulaire, cytokines, cellules endothéliales, microgliales...) peut également promouvoir la diffusion de cellules tumorales [Le *et al.*, 2003, Edwards *et al.*, 2011]. La complexité des cellules astrocytaires et de leur implication dans les pathologies cérébrales est le sujet de nombreuses publications [Escartin *et al.*, 2019, Moulson *et al.*, 2021]. Les cellules astrocytaires ne s'infiltrent que très peu dans les tumeurs U87MG, l'interaction avec les magnétosomes ne peut se faire qu'à la bordure.

L'image A de la Figure 2.30 (coupe entière de cerveau) et une ROI ciblant la tumeur (image B) illustrent bien l'activation astrocytaire et microgliale. Ce quadruple marquage réalisé avec l'anti-GFAP, l'anti-AMB1, l'anti-Iba1 (Iba1, pour Ionized calcium-binding adaptor molecule 1, marqueur des microglies) et l'anti- $\alpha_v\beta_3$ sur coupes de souris traitées par les magnétosomes AMB1-VRGD (deux traitements) montre bien les cellules astrocytaires restent en périphérie de la tumeur ($\alpha_v\beta_3$, en orange). Cette figure illustre le peu d'interaction entre les cellules astrocytaires (GFAP, en vert) et les magnétosomes (AMB1, fausse couleur blanc).

L'image B de la Figure 2.30 montre également la forte activation des microglies (Iba1+), qui envahissent complètement la tumeur. En effet, les cellules immunitaires jouent un rôle important dans la prolifération tumorale [Chen et Hambarzumyan, 2018]. Les macrophages associés aux tumeurs (TAMs, pour Tumor Associated Macrophages) sont souvent présentés en deux catégories : M1/M2 [Zheng *et al.*, 2015]. Le rôle des macrophages dans la prolifération tumorale a été considéré longtemps comme étant répartis entre les M1 (pro-inflammatoires, anti-tumoraux) et les M2 (anti-inflammatoires, pro-tumoraux) [Curren Smith, 2015], sans que ne soient identifiés les processus de détermination de l'un ou l'autre type, alors qu'il semble désormais que les macrophages puissent passer d'un type à l'autre au court du temps, suivant l'influence des cellules tumorales elles-mêmes, par le relarguage de cytokines [Martinez et Gordon, 2014, Ricard *et al.*, 2016]. De nombreux champs de recherche sont en cours concernant ces thématiques [Rong *et al.*, 2016, Pasqualini *et al.*, 2020].

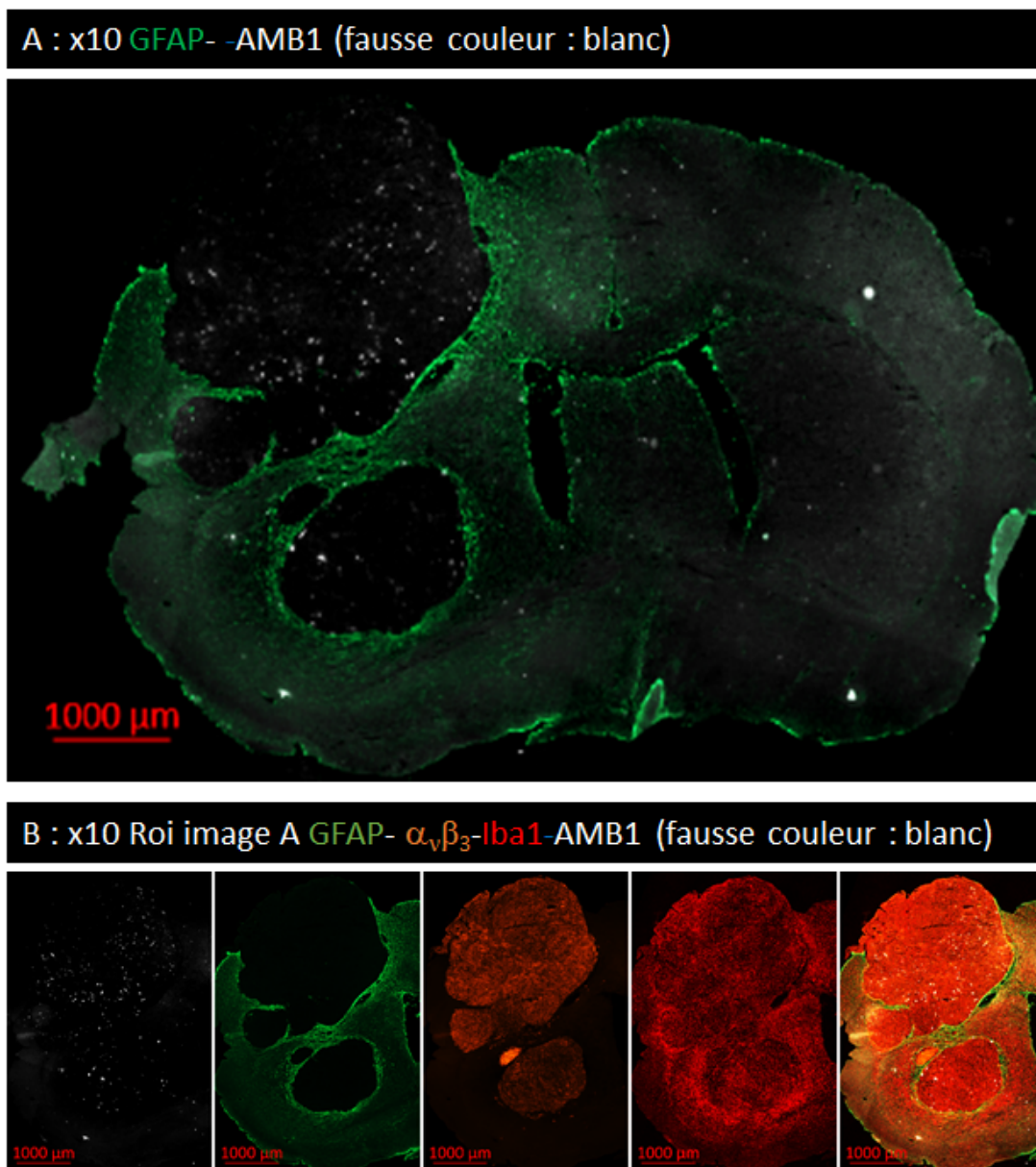


FIG. 2.30 – Immunomarquages sur souris traitée avec des magnétosomes AMB1-VRGD, 200 μ moles/kg en 2 injections, avec les anticorps anti-AMB1 (fausse couleur blanc) plus anti-GFAP (Alexa 488) plus anti-Iba1 (Alexa 647) plus anti- $\alpha_v\beta_3$ (PE), grossissement x 10

L'image A et l'image B de la Figure 2.31, à fort grossissement (x 63) en z-stack (MIP), montrent bien que les magnétosomes ne colocalisent que très épisodiquement avec les astrocytes. L'image C, ROI de l'image A, montre clairement la forme d'un vaisseau sanguin, contenant des magnétosomes mais pas d'interaction avec les astrocytes. L'image D, ROI de l'image B, montre que les magnétosomes peuvent être dispersés assez finement et largement autour des amas plus denses, une très faible proportion de ces magnétosomes isolés colocalisent avec les astrocytes. Les images C et D montrent également la présence de cellules $\alpha_v\beta_3$ + / GFAP+ en bordure de tumeur (flèches blanches). De façon intéressante, ces cellules doublement positives colocalisent partiellement avec les magnétosomes isolés.

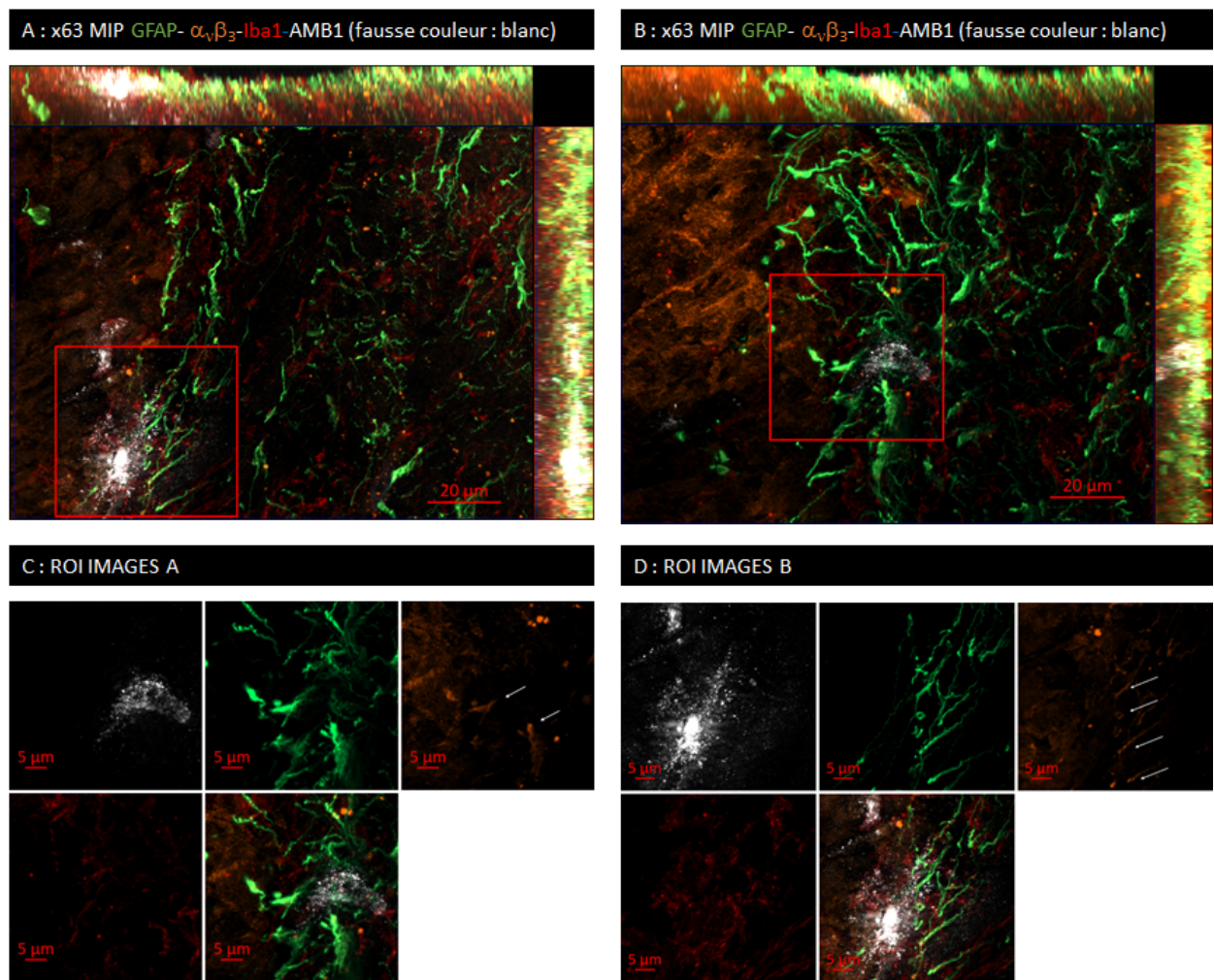


FIG. 2.31 – Immunomarquages sur souris traitée avec des magnétosomes AMB1-VRGD, 200 μ moles/kg en deux injections, avec les anticorps anti-AMB1 (fausse couleur : blanc) plus anti-GFAP (Alexa 488) plus anti-Iba1 (Alexa 647) plus anti- $\alpha_v\beta_3$ (PE), grossissement x 63

La Figure 2.32, reconstruction en 3D par le logiciel Imaris des images prises en profondeur, montre bien des cellules GFAP+/ $\alpha_v\beta_3$ +, ainsi que des magnétosomes s'échappant d'un amas vasculaire. L'anticorps anti-intégrine $\alpha_v\beta_3$ ne reconnaît que les cellules humaines, les cellules U87MG dans la masse tumorale n'expriment pas la GFAP, ces cellules doublement positives en bordure pourraient être des CSCs, les cellules souches pouvant exprimer la GFAP.

Afin de déterminer si les microglies dans les tumeurs capturent les magnétosomes, un triple immunomarquage a été réalisé avec l'anticorps anti-AMB1, un anticorps anti-Iba1 (microglie/macrophage) et l'anticorps anti-CD31 précédemment utilisé, sur les coupes de cerveaux des animaux traités avec les magnétosomes fonctionnalisés ou non.

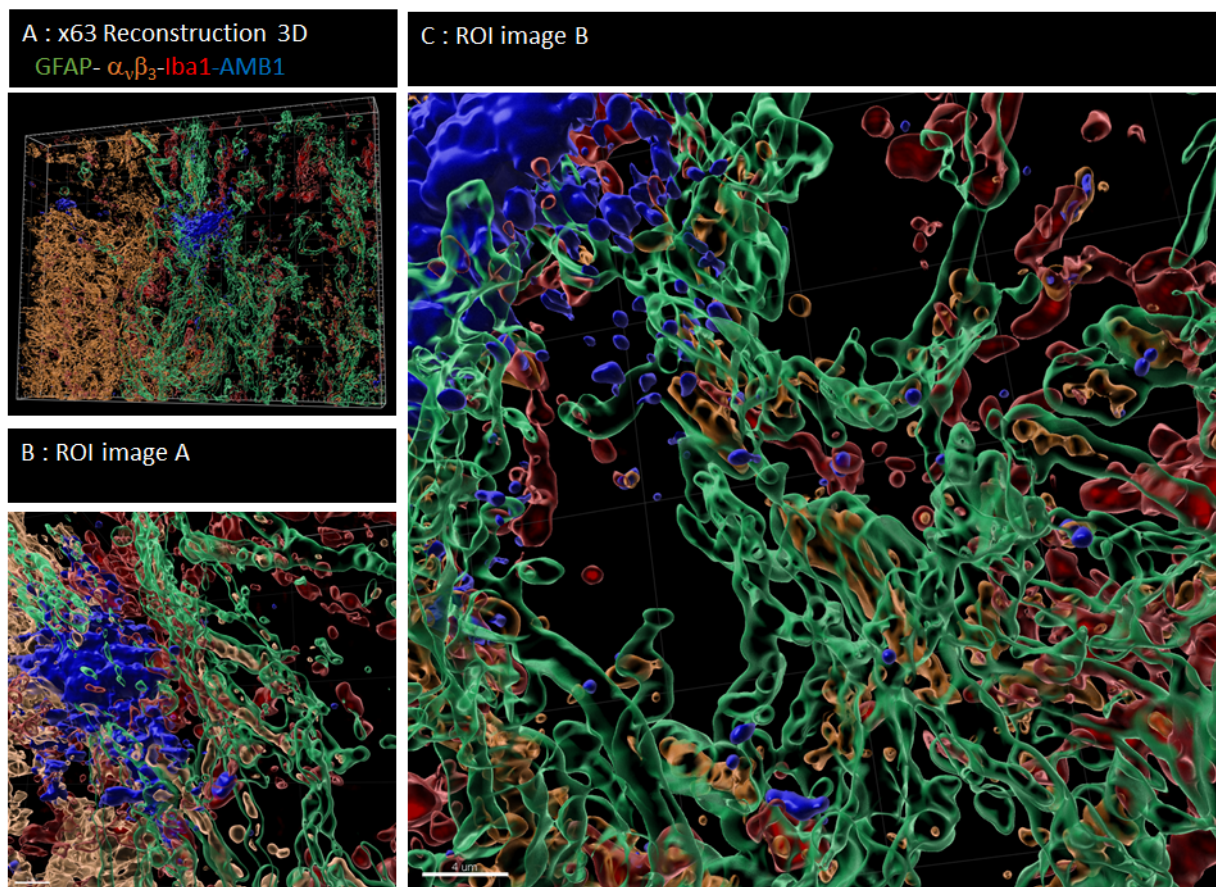


FIG. 2.32 – Reconstruction 3D de l'image B de la Figure 2.31 avec Imaris, grossissement x63

La Figure 2.33 illustre les résultats obtenus, que ce soit sur les animaux traités par les magnétosomes AMB1-VRGD ou par AMB1-V, après une injection de magnétosomes à 200 μ moles/kg, avec le triple marquage Iba1/CD31/AMB1. Les animaux traités avec les magnétosomes AMB1-V présentent beaucoup moins de magnétosomes résiduels, comme déjà décrit (voir Figure 2.25) mais la répartition est similaire, les magnétosomes sont retrouvés exclusivement dans la zone tumorale et pas dans le tissu sain.

L'image A illustre bien l'infiltration de la tumeur par les microglies/macrophages à un grossissement de x 20, qui apparaissent en blanc (fausse couleur), les vaisseaux sont marqués par l'anticorps anti-CD31 (Alexa 488, vert) et les magnétosomes par l'anticorps anti-AMB1 (Alexa 647, rouge). Une zone peu chargée en vaisseaux (flèche blanche) présente une plus grande quantité de magnétosomes. Cette zone a été identifiée comme une zone d'apoptose par un marquage anti-caspase 3 (image B, anti-caspase 3 Alexa 647, en rouge) dans le tumeur (marquage anti- $\alpha_v\beta_3$, PE, en orange). La rupture de vaisseaux sanguins dans cette zone de nécrose/apoptose a sans doute permis de retenir plus de magnétosomes. À noter que cette zone d'apoptose/nécrose est retrouvée dans 53% des tumeurs utilisées pour ce projet.

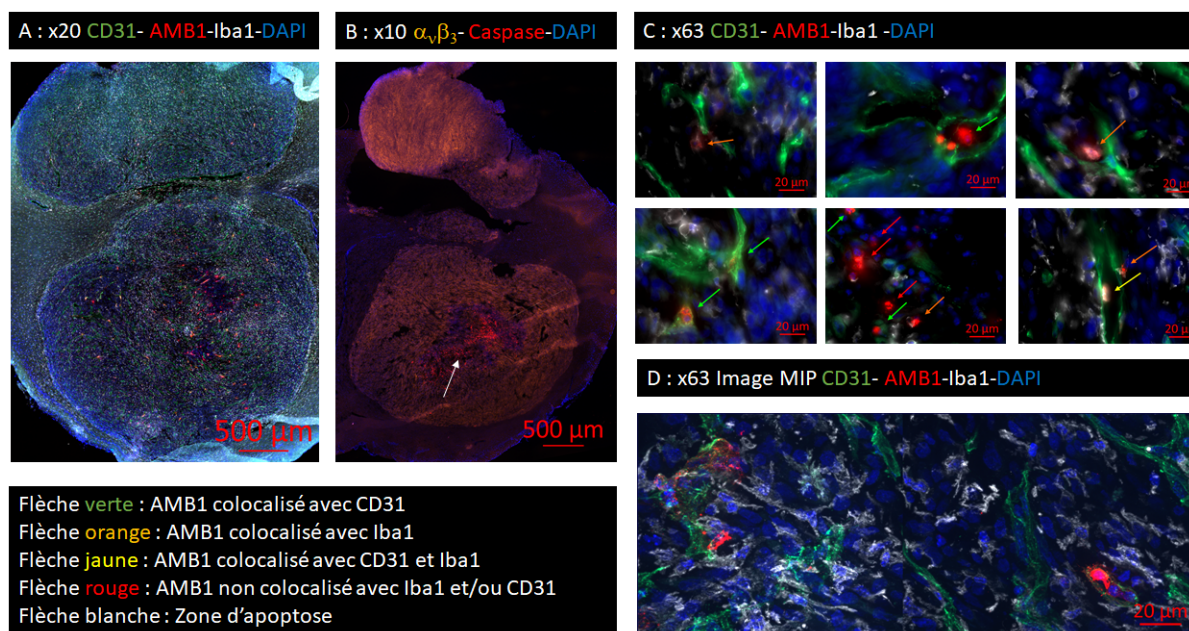


FIG. 2.33 – Immunomarquages sur souris traitées avec des magnétosomes AMB1-VRGD, 200 μ moles/kg une injection, avec les anticorps anti-AMB1 (Alexa 647) plus anti-CD31 (Alexa 488) plus anti-Iba1 (blanc, fausse couleur) Image A (grossissement x20), Images C et D (grossissement x63) et anti-Caspase3 (Alexa 647) plus anti- $\alpha_v\beta_3$ (PE), Image B (grossissement x10)

L'image C montre différents champs de vue à un grossissement de x 63 illustrant les cas de figures présents dans la tumeur : magnétosomes colocalisant avec les vaisseaux (flèche verte), avec les microglies/macrophages infiltrés (flèche orange), avec les macrophages circulants dans les vaisseaux (flèche jaune) ou ne colocalisant ni avec les vaisseaux ni avec les microglies/macrophages (flèche rouge). L'image D est une image prise à l'apoptome en z-stack et compilée sur toute la profondeur de la coupe (image MIP, grossissement de x 63), montrant la répartition des magnétosomes dans et hors des vaisseaux et/ou microglies dans la zone tumorale.

Les magnétosomes sont donc bien capturés partiellement par les microglies et les macrophages (infiltrés et circulants), en plus d'être retrouvés dans les vaisseaux sanguins. Les images montrent aussi une petite proportion de cellules ni microgliales, ni macrophages, ni endothéliales qui ont capturé les magnétosomes, dans la tumeur. Le triple marquage ne permettant pas de vérifier s'il s'agit bien de cellules tumorales, un quadruple marquage révélant les magnétosomes (AMB1, Alexa 350, bleu), les cellules tumorales ($\alpha_v\beta_3$, PE, orange), les microglies/macrophages (Iba1, Alexa 647, rouge) et les vaisseaux (CD31, Alexa 488, vert) a été réalisé sur une coupe de souris traitée avec des magnétosomes AMB1-VRGD pour confirmer l'incorporation par les cellules tumorales.

La Figure 2.34 montre que les magnétosomes, quoique majoritairement retrouvés dans les vaisseaux sanguins, sont aussi retrouvés dans les cellules microgliales, tumorales ou dans l'espace intercellulaire (Images A, B et C). L'image D est une reconstruction 3D par le logiciel Imaris, montrant sans équivoque des magnétosomes situés dans le tissu tumoral.

Ce quadruple marquage n'a pas été réalisé sur tous les animaux, cependant il sera très utile lors de la suite du projet, lorsque nous étudierons les possibilités d'optimisation de l'incorporation des magnétosomes.

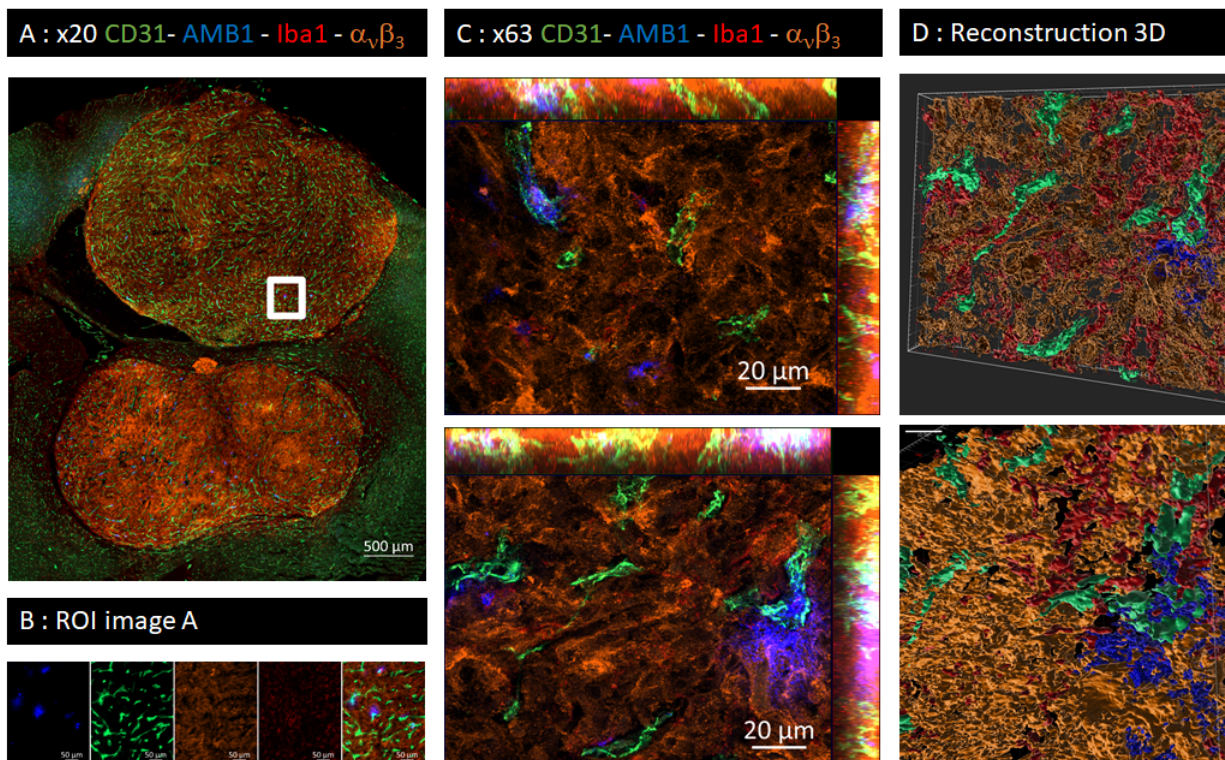


FIG. 2.34 – Immunomarkages sur souris traitées avec des magnétosomes AMB1-VRGD, 200 μ moles/kg délivrés en deux injections, avec les anticorps anti-AMB1 (Alexa 350) plus anti-CD31 (Alexa 488) plus anti-Iba1 (Alexa 647) plus anti- $\alpha_v\beta_3$ (PE), grossissement x20 (A), x63 (C)

AMB1-VRGD : Néo-vaisseaux

Les magnétosomes étant préférentiellement retrouvés dans les vaisseaux sanguins, une nouvelle étude a été réalisée pour déterminer la nature des vaisseaux impliqués. L'anticorps anti-intégrine $\alpha_v\beta_3$ ne reconnaissant que l'intégrine humaine, il ne permet pas de cibler les néo-vaisseaux murins. Les néo-vaisseaux expriment fortement la nestine, un marqueur également retrouvé dans les cellules souches, notamment au niveau du troisième ventricule [Rojczyk-Gołąbiewska *et al.*, 2014].

Un quadruple marquage révélant les vaisseaux matures (CD31, Alexa 647, rouge), les néo-vaisseaux (Nestine, Alexa 488, vert), les magnétosomes (AMB1, Alexa 350, bleu) et les cellules tumorales ($\alpha_v\beta_3$, PE, orange) a été réalisé afin de vérifier qu'il s'agit bien de néovaisseaux et si des vaisseaux en formation sont capables de capter les magnétosomes.

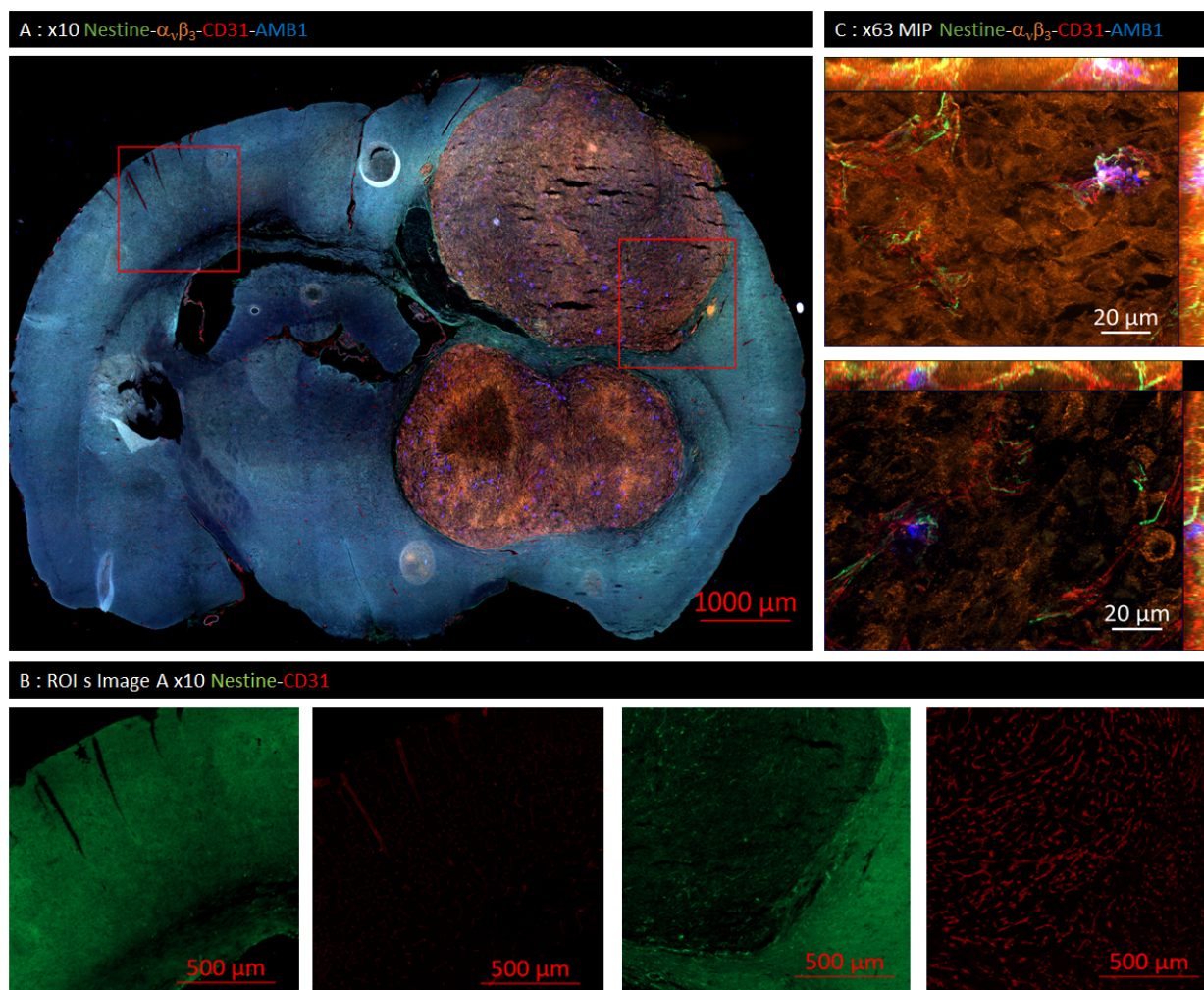


FIG. 2.35 – Quadruple immunomarquage avec les anticorps anti-Nestine (Alexa 488) plus anti- $\alpha_v\beta_3$ (PE) plus anti-CD31 (Alexa 647) plus anti-AMB1 (Alexa 350), sur souris traitée avec des magnétosomes AMB1-VRGD ($2 \times 100 \mu\text{moles fer/kg}$), grossissement x10

La Figure 2.35 illustre l'expression de la Nestine et la comparaison avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et avec le marqueur de cellules endothéliales matures CD31 (image A).

L'expression de la Nestine est retrouvée colocalisant avec la grande majorité des cellules endothéliales de la tumeur, alors que peu de vaisseaux Nestine+ sont retrouvés hors de la tumeur (images ROI B). Les vaisseaux tumoraux surexpriment également fortement CD31 par rapport au tissu sain contralatéral. Les vaisseaux sanguins identifiés avec CD31 dans la zone tumorale ont de plus un aspect plus tortueux, plus hétérogène, que ceux du tissu sain, soulignant la nature pathologique de ces vaisseaux.

L'image C prise à fort grossissement (x63), en apotome (MIP), montre la colocalisation des magnétosomes AMB1-VRGD avec les vaisseaux exprimant à la fois la Nestine et CD31. Les néo-vaisseaux Nestine +/CD31- ne colocalisent que très rarement avec les magnétosomes, leurs liaisons avec le système vasculaire mature n'étant sans doute pas suffisamment abouties.

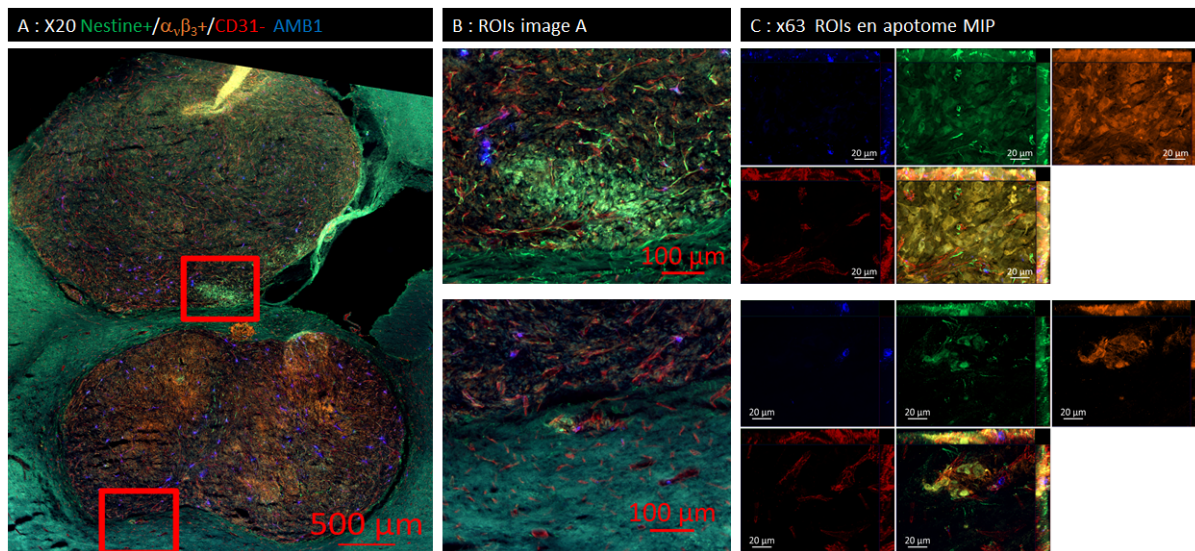


FIG. 2.36 – Niches de cellules Nestine⁺/α_vβ₃⁺, sur souris traitée avec des magnétosomes AMB1-VRGD (2x100 μmoles de fer/kg), grossissement x20

La Figure 2.36 réalisée à partir d'une mosaïque d'images à un grossissement de x20 prises sur une deuxième coupe du même animal, montre des cellules surexprimant la Nestine et l'intégrine α_vβ₃ mais CD31⁻, en périphérie, faisant fortement penser à des niches de CSCs, avec dans ces zones quelques micro-vaisseaux présentant des magnétosomes (images A et B). L'image C prise en apotome à fort grossissement x63 permet de mieux détailler les niches.

À noter que l'anticorps anti-Nestine utilisé (ab134017) n'est pas vendu comme pouvant être utilisé pour reconnaître les cellules humaines, mais un test réalisé sur les cellules U87MG en culture 2D et 3D montre une différence faible mais nette avec l'anticorps secondaire incubé seul, comme démontré en Figure B.11 (Annexe B.8). L'anticorps anti-α_vβ₃, lui, ne reconnaît que les cellules humaines.

Le ciblage de CSCs par nos magnétosomes, ou leur environnement immédiat, serait particulièrement intéressant pour empêcher les récurrences.

AMB1-VRGD : Marqueurs de cellules souches

Les résultats obtenus avec le marquage Nestin m'ont incité à m'intéresser à d'autres marqueurs des CSCs. Les CSCs sont fréquemment retrouvées dans des niches périvasculaires, en bordure de tumeur, microenvironnement différent du tissu normal, en hypoxie, fortement enrichi en cytokines, en facteurs de croissance, en cellules activées (gliose) entraînant un effet pro-tumoral.

La complexité des CSCs fait qu'il est difficile de les identifier, même avec un panel de biomarqueurs [Mitchell *et al.*, 2020]. Situées souvent en bordures des tumeurs primaires, chimiorésistantes et radiorésistantes, elles sont capables de régénérer les tumeurs après la résection et les thérapies. La colocalisation de magnétosomes et de niches de CSCs, ou dans leur entourage immédiat, permettrait d'espérer pouvoir détruire ces cellules par photothermie ou hyperthermie. Je me suis donc intéressée à d'autres marqueurs de cellules souches en plus de la Nestine, tels que CD133, Sox2, ABCG2/BCRP.

CD133 (Prominin1) est une glycoprotéine transmembranaire, marqueur de cellules souches neurales [Codega *et al.*, 2014], retrouvée dans les glioblastomes [Holmberg Olausson *et al.*, 2014]. La sur-expression de CD133 est associée à un cancer agressif et à un mauvais pronostic [Yan *et al.*, 2011, Wu *et al.*, 2015].

La Figure 2.37 illustre l'expression de CD133 et la comparaison avec notre marqueur d'intérêt l'intégrine $\alpha_\nu\beta_3$. L'anticorps anti-CD133 humain utilisé reconnaît une petite proportion de cellules CD133+, en bordure de tumeur.

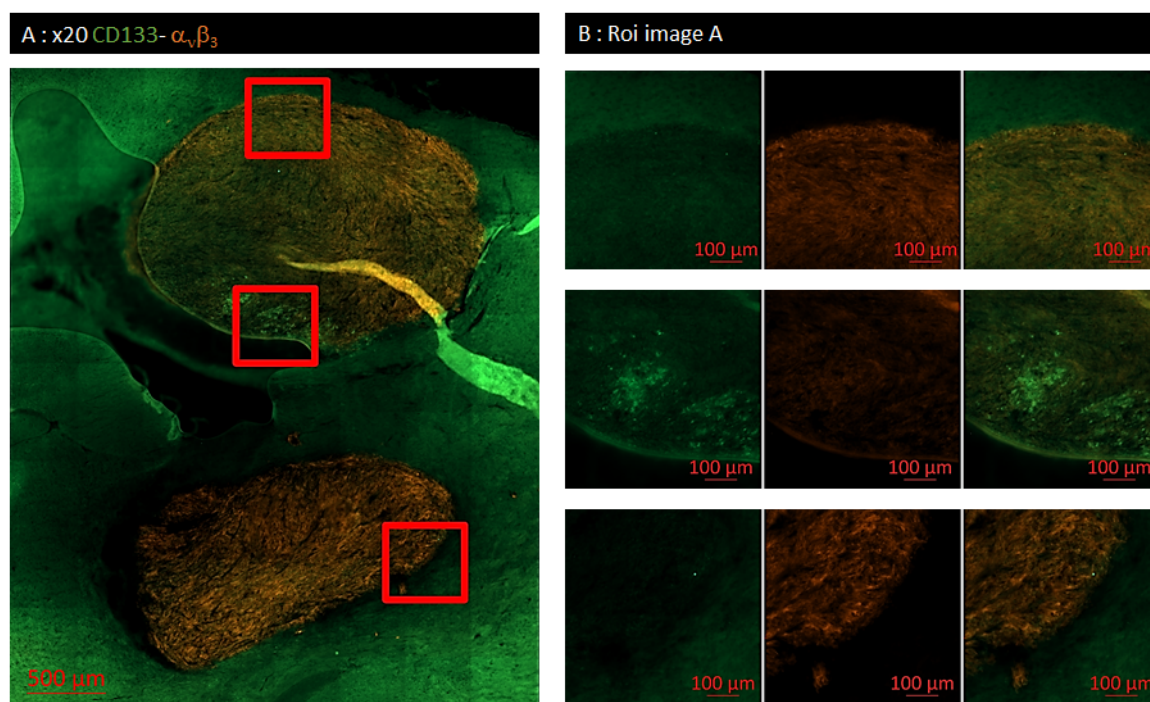


FIG. 2.37 – Immunomarquages avec les anticorps anti-CD133 (Alexa488) plus anti- $\alpha_\nu\beta_3$ (PE), grossissement x20

Sox2 ou (Sex determining region Y)-box2 est un facteur de transcription nucléaire, qui permet de maintenir la pluripotence des NSCs [Liu *et al.*, 2013a], également retrouvé dans les CSCs [Annovazzi *et al.*, 2011], dont la surexpression dans les GBM est un signe d'agressivité, entraînant un mauvais pronostic.

La Figure 2.38 illustre l'expression de Sox2 et la comparaison avec notre marqueur d'intérêt, l'intégrine $\alpha_\nu\beta_3$. L'anticorps anti-Sox2 utilisé reconnaît les cellules humaines et murines, illustrant la gliose importante entourant la tumeur.

Bien qu'ayant testé d'autres anticorps anti-Sox2 "spécifiques humains", il s'avère qu'ils reconnaissent aussi très bien les cellules murines, ce qui n'est guère surprenant, l'homologie étant forte entre les deux protéines (97,8%). Les tumeurs U87MG montrent quelques zones de cellules Sox2+/anti- $\alpha_v\beta_3$ +, la majorité des cellules Sox2+ semblent être des cellules murines, en bordure.

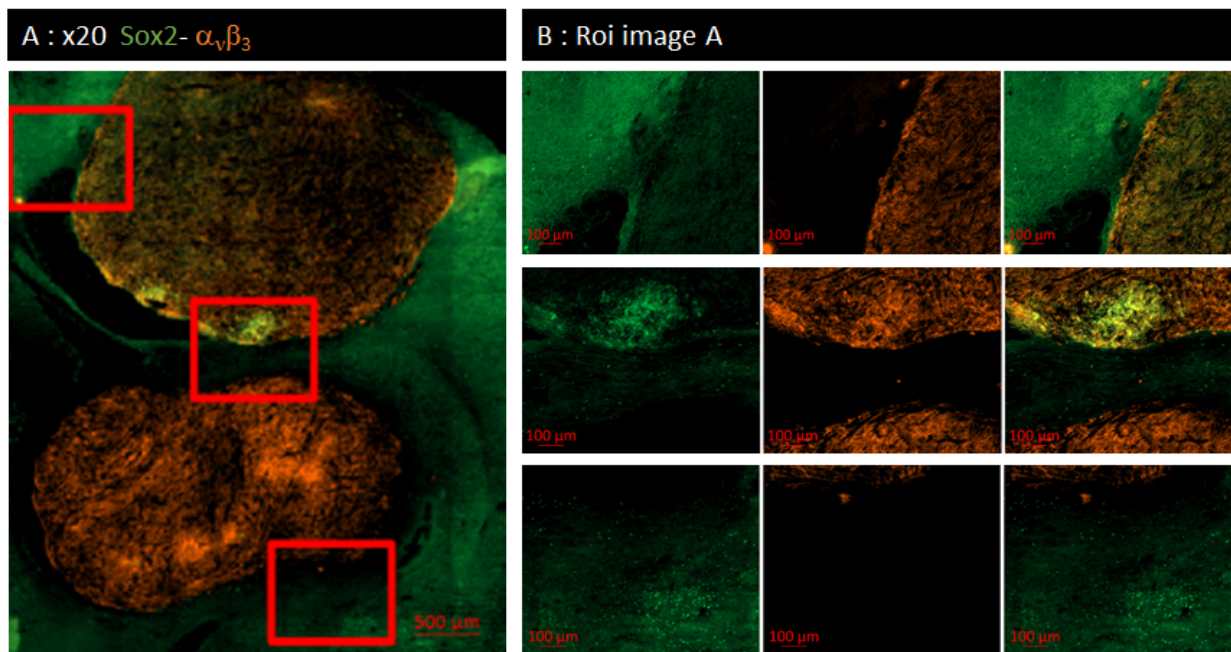


FIG. 2.38 – Immunomarquages avec les anticorps anti-SOX2 (Alexa488) plus anti- $\alpha_v\beta_3$ (PE), grossissement x20

La famille des protéines transmembranaires ABC (ABC, pour ATP-Binding Cassette) comprend de nombreuses pompes d'efflux, qui jouent un rôle important dans la résistance aux traitements, telles que la P-glycoprotéine (PgP, pour P-glycoProtein), la protéine MRP1 (MRP1, pour Multidrug Resistance 1) et la protéine BCRP (BCRP, pour Breast Cancer Resistance Protein).

La BCRP (aussi appelée ABCG2) a un nombre important de substrats, elle est présente dans de nombreux organes dont les microcapillaires du cerveau. Son rôle est de protéger le tissu de l'intrusion de molécules étrangères [Mao et Unadkat, 2014], participant à la barrière hémato-encéphalique (BHE) [Agarwal *et al.*, 2011]. La BCRP est aussi un marqueur des cellules souches [Natarajan *et al.*, 2012] et donc aussi des CSCs [Emery *et al.*, 2017]. La Figure 2.39 illustre l'expression de la BCRP et la comparaison avec notre marqueur d'intérêt l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. L'anticorps anti-BCRP utilisé reconnaît les cellules humaines et murines. L'immunomarquage nécessite un démasquage préalable des épitopes avec une étape de bain d'acide/éthanol, qui réduit l'intensité de l'immunomarquage avec l'anticorps anti- $\alpha_v\beta_3$, par rapport à l'intensité obtenue habituellement. Cependant, l'immunomarquage permet d'identifier la BCRP dans les vaisseaux sanguins mais aussi dans quelques cellules BCRP+/ $\alpha_v\beta_3$ + (Image B).

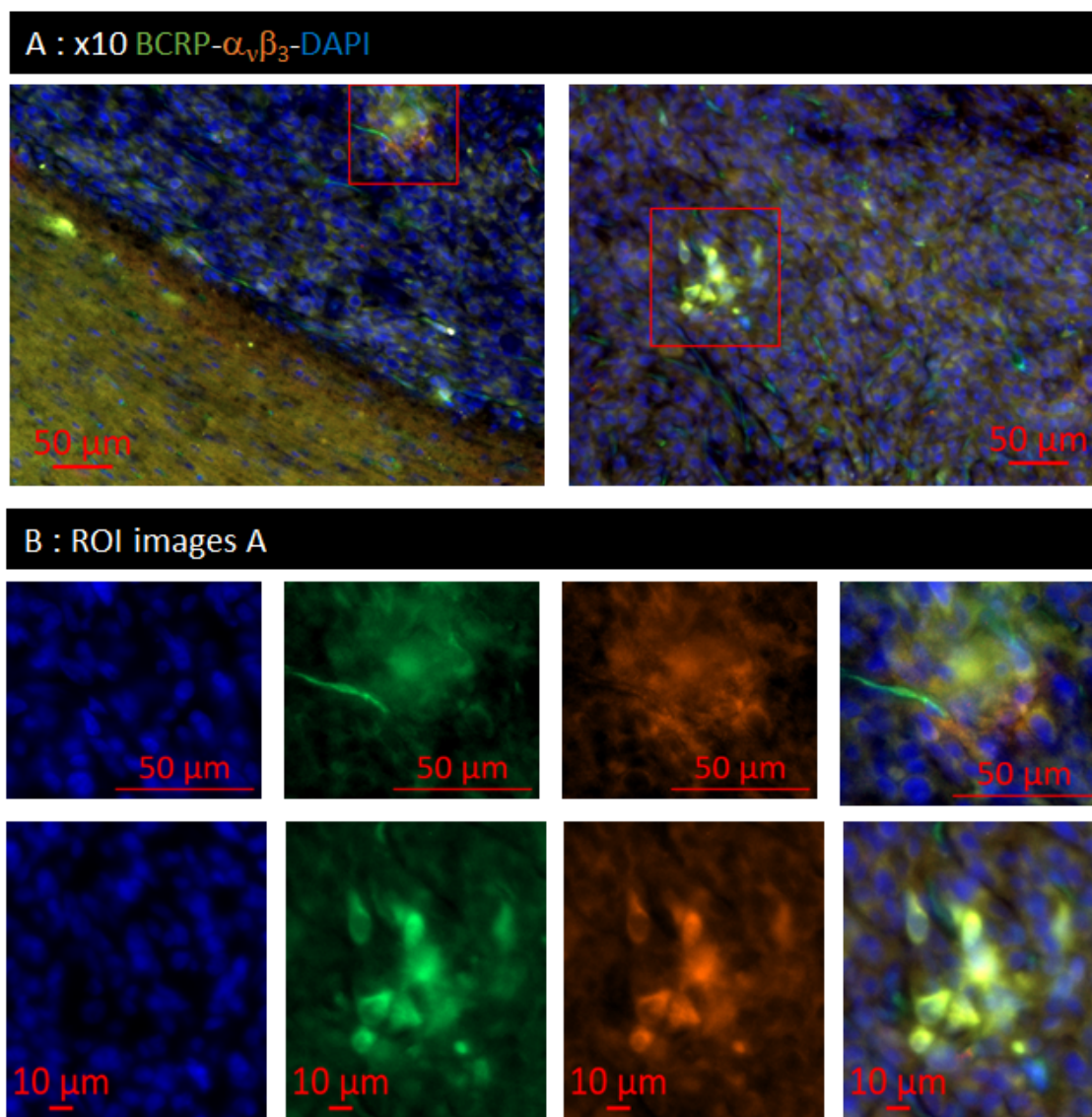


FIG. 2.39 – Immunomarquages avec les anticorps anti-BCRP (Alexa 488) plus anti- $\alpha_v\beta_3$ (PE), grossissement x10

AMB1-VRGD : Marqueurs d'EMT

Comme évoqué dans l'introduction, de nombreux mécanismes sont à l'œuvre pour promouvoir la migration cellulaire. Parmi ceux-ci, la transition entre cellules endothéliales et mésenchymateuse, (EMT) est fréquemment retrouvée dans les tumeurs de haut grade, augmentant les capacités de migration des cellules tumorales et donc le développement de métastases [Saitoh, 2018, Srivastava *et al.*, 2018, Bakir *et al.*, 2020]. Je me suis donc intéressée à des marqueurs d'EMT (ELDT1, Vimentine et S1004A).

La Vimentine est un filament intermédiaire de type III du cytosquelette, présent dans les cellules mésenchymateuses (os, muscles). Les cellules mésenchymateuses, au contraire des cellules endothéliales, sont capables de se déplacer durant le développement de l'embryon.

La surexpression de la Vimentine est associée à un mauvais pronostic et un profil agressif [Lin *et al.*, 2016, Nguemgo Kouam *et al.*, 2018]. Les glioblastomes expriment fortement la Vimentine [Nowicki *et al.*, 2019, Zottel *et al.*, 2020], ainsi que les astrocytes réactifs [Rao *et al.*, 2018].

La Figure B.12 en Annexe B.9 illustre l'expression de la Vimentine et la comparaison avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, avec un anticorps polyclonal anti-Vimentine reconnaissant les cellules humaines et murines sans distinction. L'expression de la Vimentine est retrouvée dans la tumeur ainsi qu'autour de la tumeur, montrant les cellules gliales réactives. L'activation astrocytaire est retrouvée même à distance de la tumeur, jusque dans l'hémisphère contra-latéral. Un anticorps monoclonal anti-Vimentine spécifique anti-humain a donc été choisi pour différencier les astrocytes réactifs des cellules tumorales.

La Figure 2.40 illustre bien la présence de cellules Vimentine +/-GFAP- dans et autour de la tumeur (Images A et B). L'expression de la Vimentine est variable d'une zone à l'autre, avec d'importantes variations d'intensité, certaines cellules l'exprimant très fortement. Des cellules Vimentine +/- GFAP+ sont également retrouvées en périphérie de tumeur (Image C). Ces cellules peuvent être des cellules métastatiques.

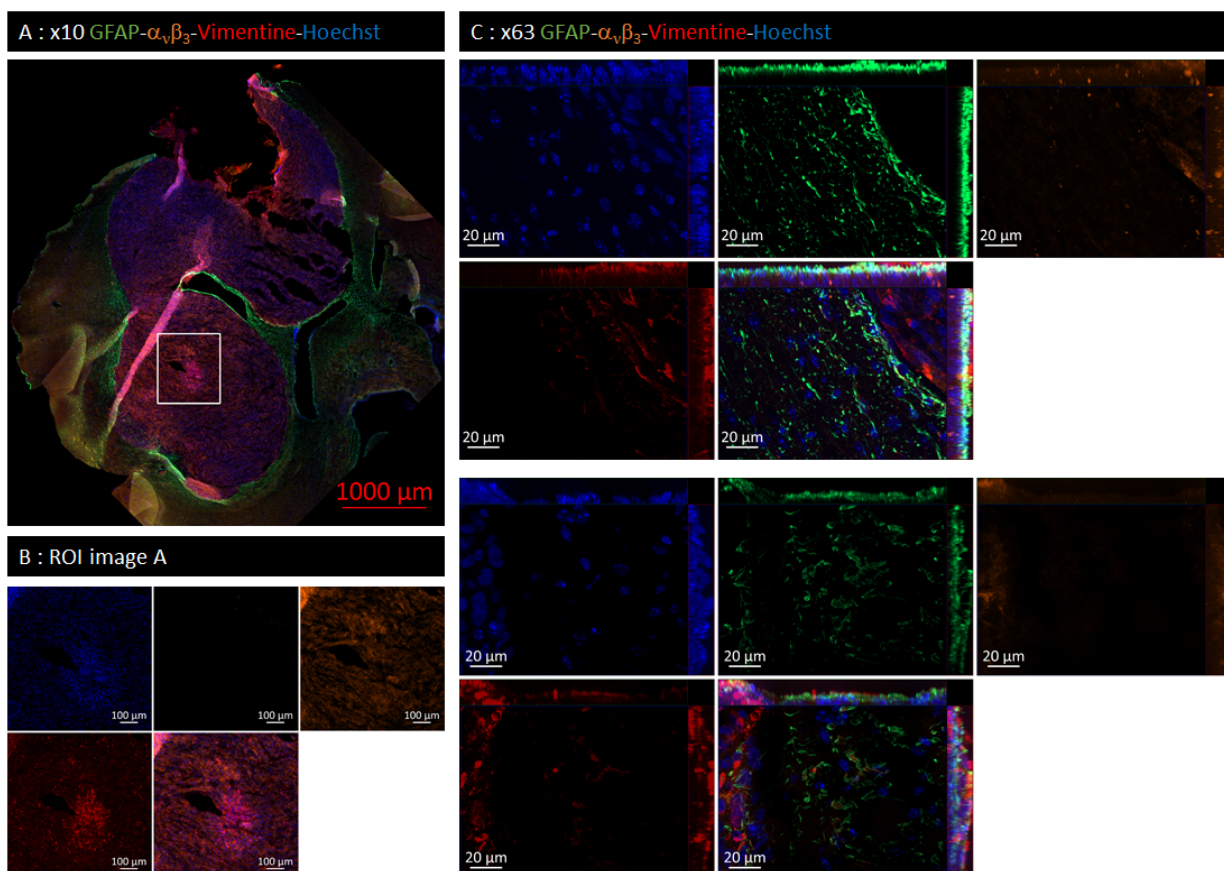


FIG. 2.40 – Immunomarquages avec les anticorps anti-Vimentine (Alexa647) plus anti-GFAP (Alexa488) plus anti- $\alpha_v\beta_3$ (PE) et coloration des noyaux (Hoechst), grossissement x10(A) et x63 (C)

S100A4 est une protéine appartenant à la grande famille des protéines qui se lient au calcium (calcium binding protein). Elle est impliquée dans l'angiogenèse, la migration et la transition EMT : c'est un marqueur métastatique retrouvé dans de nombreux cancers (colorectal, sein, vessie, ovaires ...) [Dahlmann *et al.*, 2016] et dans les glioblastomes [Chow *et al.*, 2017]. S100A4 semble jouer un grand nombre de fonctions, dans de nombreux organes. Au niveau du système nerveux central, elle joue un rôle dans la neurogenèse, la mobilité cellulaire, les voies de signalisation, l'inflammation, les pathologies neurodégénératives, les tumeurs [D'Ambrosi *et al.*, 2021]. C'est également un marqueur neuroprotecteur, retrouvé dans les neurones après une lésion [Pankratova *et al.*, 2018].

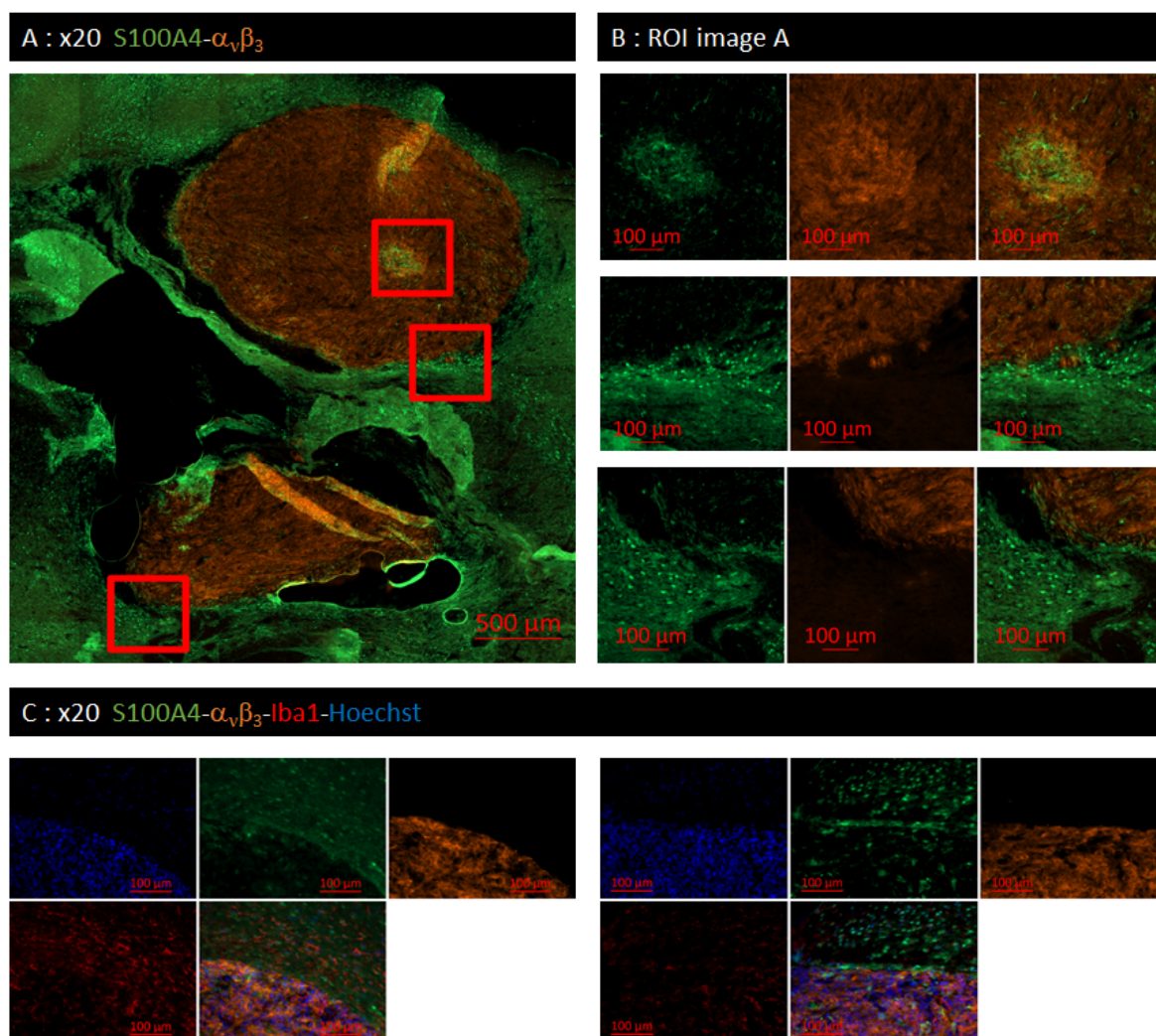


FIG. 2.41 – Immunomarquages avec les anticorps anti-S100A4 (Alexa 488) plus anti- $\alpha_v\beta_3$ (PE) seuls (A et B), et avec en plus l'anticorps anti-IBA (Alexa 647) et un marqueur nucléaire (Hoechst) (C), grossissement x20

La Figure 2.41 (images A et B) montre la forte présence de cellules exprimant S100A4, dans et autour de la tumeur, notamment les neurones en périphérie de la tumeur.

Un triple marquage incluant le marqueur des microglies, Iba1, a également été réalisé (Image C), afin de vérifier si les cellules positives dans la tumeur pouvaient être également des microglies, ce qui ne semble pas être le cas.

AMB1-VRGD : Marqueurs de métabolisme

Les cellules tumorales à croissance rapide utilisent préférentiellement la voie de la glycolyse pour produire de l'ATP plutôt que la respiration mitochondriale, c'est l'effet Warburg [Vaupel et Multhoff, 2021]. Cependant, les cellules CSCs quiescentes, avec un métabolisme plus faible que les cellules tumorales environnantes, situées dans des zones d'hypoxie, utilisent plus la respiration mitochondriale, ce qui participe à leur résistance à la radiothérapie. Les CSCs actives retrouvent un métabolisme de cellules à forte croissance [Sharanek *et al.*, 2020].

L'enzyme isocitrate déshydrogénase 1 (IDH1, pour Isocitrate DésHydrogénase 1) est un marqueur important du métabolisme, fortement exprimé dans les glioblastomes de grade IV et associé à un mauvais pronostic [Shen *et al.*, 2020]. Lorsque l'enzyme est mutée (IDH1mt), l'agressivité de la tumeur diminue [Bralten *et al.*, 2011, Cui *et al.*, 2016]. Le métabolisme des tumeurs IDH1wt et IDH1mt est différent [Khurshed *et al.*, 2017]. IDH1 convertit l'isocitrate et le coenzyme nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, NADP⁺, en α -ketoglutarate et NADPH alors qu' IDH1m convertit α -ketoglutarate et NADPH en D2-hydroxyglutarate et NADP⁺.

Cette différence de métabolisme des tumeurs IDHmt entraîne une cascade d'effets, conduisant à une croissance plus faible des tumeurs IDHmt [van Noorden *et al.*, 2021]. Il semble que les cellules à fort potentiel métastatique expriment fortement IDH1, l'expression d'IDH1 fait désormais partie du panel de marqueurs utilisés pour noter la gravité des tumeur chez les patients [Sanson, 2016].

La Figure 2.42 illustre la présence de cellules exprimant fortement IDH1 dans la tumeur, de façon très hétérogène. Cette figure montre trois coupes d'une même tumeur (image A). Une différence d'expression entre les coupes et sur une même coupe est nettement visible. L'expression est très forte autour d'une zone de nécrose, ainsi que dans quelques zones périphériques, illustrant la présence de cellules à forte croissance et potentiel migratoire.

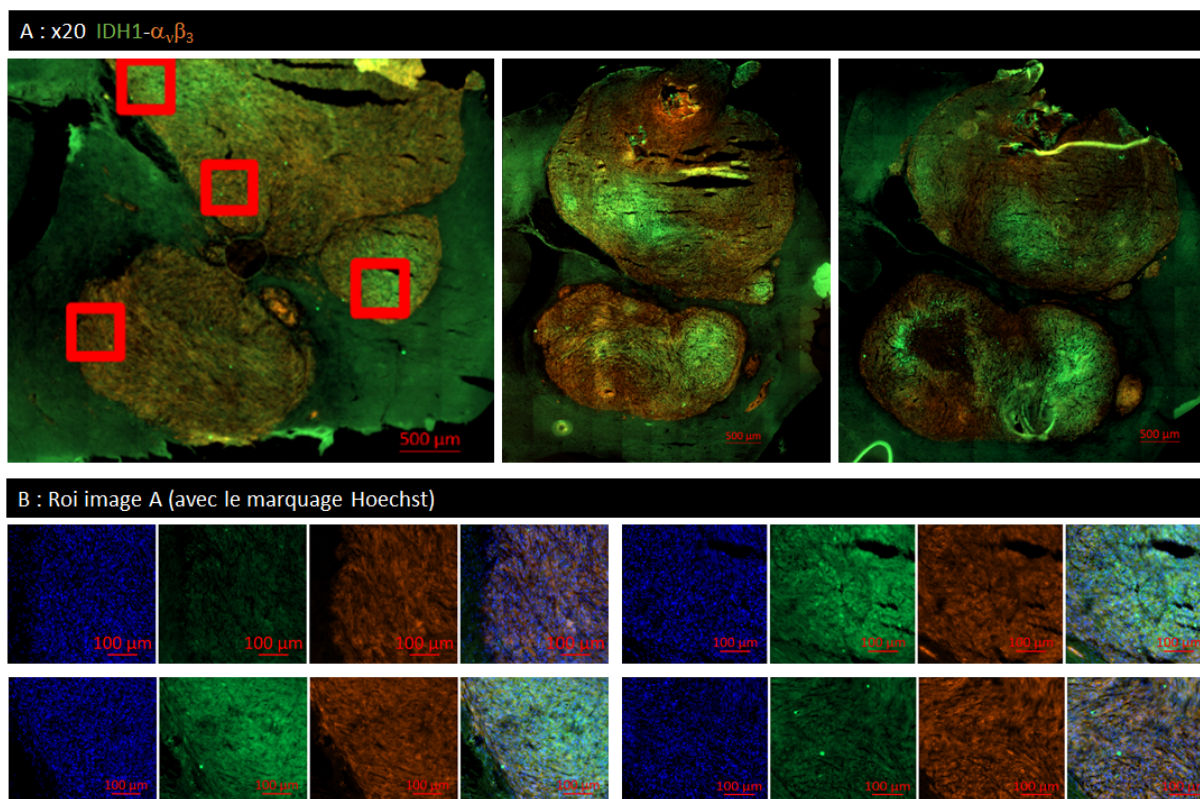


FIG. 2.42 – Immunomarquages avec les anticorps anti-IDH1 (Alexa 488) plus anti- $\alpha_v\beta_3$ (PE), grossissement x20

AMB1-VRGD : Multiples marquages avec les marqueurs CSC, d'EMT et du métabolisme

Après avoir vérifié les possibilités de combinaisons entre les anticorps reconnaissant les marqueurs de CSC et d'EMT, ainsi que de métabolisme, des combinaisons de marqueurs ont été réalisées. La difficulté des marquages multiples est de déterminer des combinaisons d'anticorps qui donnent des résultats spécifiques, dans les mêmes conditions d'immunomarquages.

Une des difficultés rencontrées dans le cas présent a été de trouver des anticorps spécifiquement anti-humains, qui ne soient pas produits chez le lapin, pour pouvoir co-localiser avec notre anticorps de lapin anti-AMB1. Les anticorps secondaires anti-souris ont révélé non spécifiquement les tumeurs et n'ont pu être utilisés. Les choix sont donc limités pour réaliser ces immunomarquages d'intérêt.

J'ai réalisé la mise au point de ces immunomarquages sur quelques échantillons et non sur tous les animaux parce que le nombre de coupes restantes ne le permettait pas. Les protocoles développés seront utilisés pour la suite du projet Mefisto, quand nous aurons optimisé l'incorporation des magnétosomes dans les tumeurs. Les marquages multiples visent à identifier la colocalisation des magnétosomes AMB1-VRGD avec plusieurs marqueurs de CSCs ou de cellules métastatiques en même temps.

Les protocoles de marquage et la compatibilité des anticorps entre eux font que certaines combinaisons sont impossibles, notamment les anticorps déjà couplés : les anticorps anti-Nestine, anti-CD133, anti-Sox2, le sont tous en Alexa 488. De plus, le démasquage des antigènes à l'aide d'une étape acide/éthanol, indispensable pour la révélation de la BCRP, éteint considérablement le signal de l'anticorps anti- $\alpha_v\beta_3$, par rapport au signal obtenu sans démasquage, et diminue probablement aussi l'intensité des anticorps déjà couplés en Alexa 488 (Nestine, CD133).

Les multiples marquages suivants ont cependant pu être réalisés :

- Figure 2.43 : AMB1 (lapin) + BCRP (rat) + Nestine (souris) + Hoechst 33342 (colorant nucléaire)
- Figure 2.44 : AMB1 (lapin) + BCRP (rat) + CD133 (souris) + Hoechst 33342 (colorant nucléaire)
- Figure 2.45 : AMB1 (lapin) + Nestine (souris) + S100A4 (chèvre) + Vimentine (cobaye)
- Figure 2.46 : AMB1 (lapin) + Sox2 (rat) + S100A4 (chèvre) + Vimentine (cobaye)
- Figure 2.47 : AMB1 (lapin) + IDH1 (rat) + $\alpha_v\beta_3$ (souris) + Vimentine (cobaye)

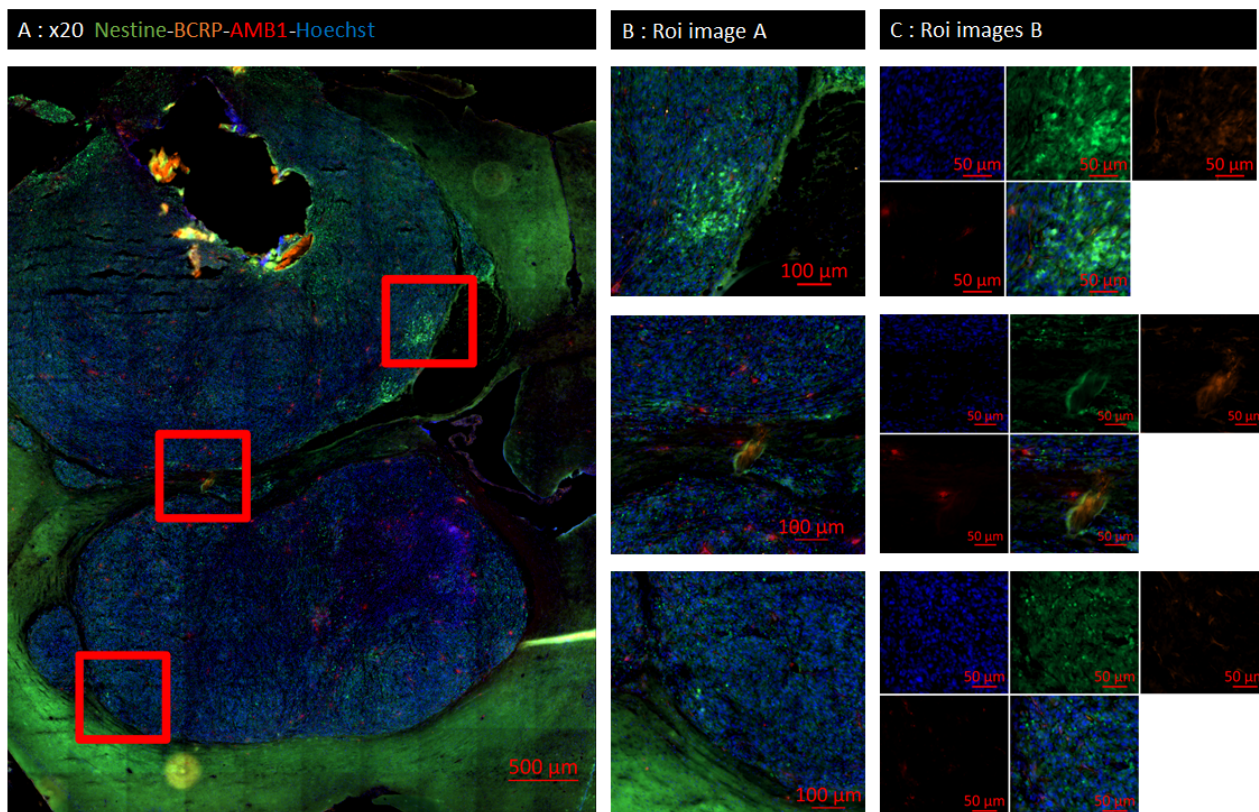


FIG. 2.43 – Immunomarquages sur souris porteuses de tumeurs avec les anticorps anti-Nestine (Alexa 488) plus anti-BCRP (Alexa 594) plus anti-AMB1 (Alexa 647) plus Hoechst 33342, grossissement x20

La Figure 2.43 montre que des zones de cellules BCRP⁺/Nestine⁺ sont présentes en bordure de tumeur, des magnétosomes AMB1-VRGD sont également présents dans ces zones. Des néo-vaisseaux (Nestin ⁺) exprimant la BCRP contiennent également des magnétosomes.

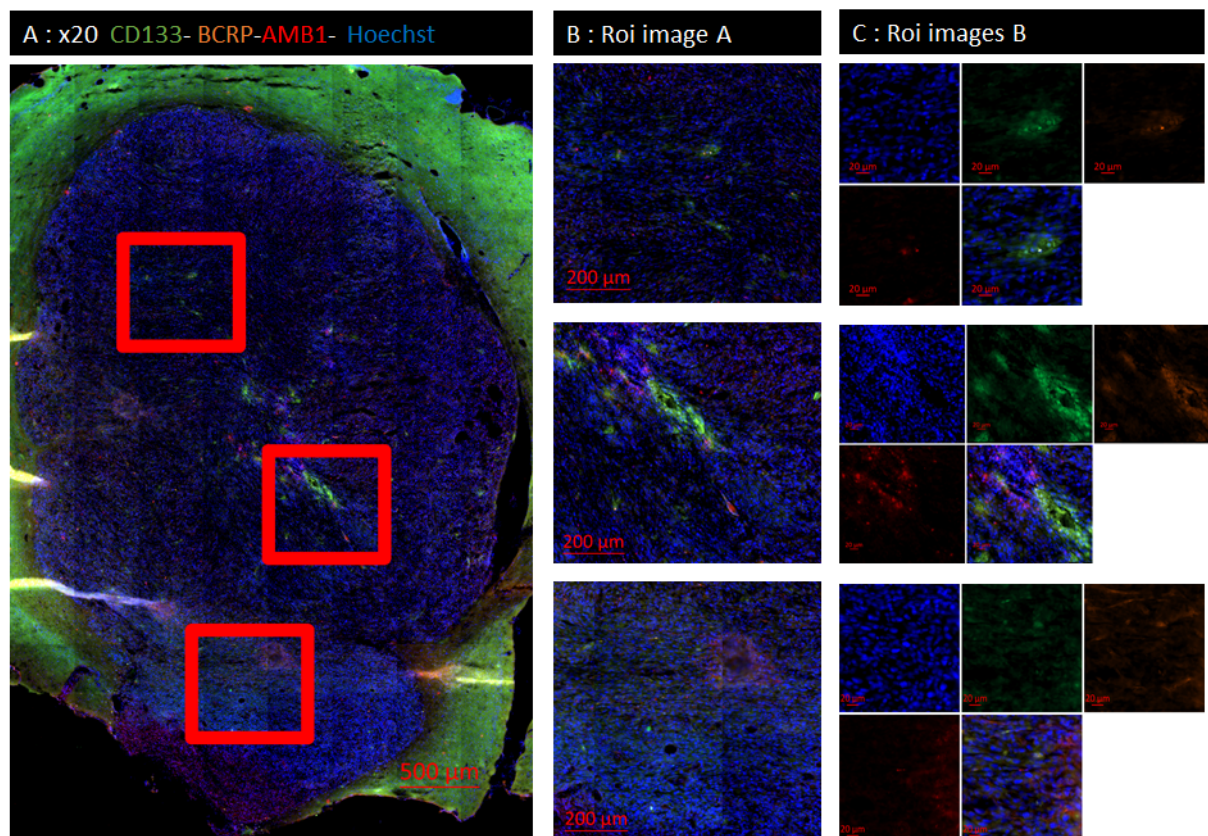


FIG. 2.44 – Immunomarquages sur souris porteuses de tumeurs avec les anticorps anti-CD133 (Alexa 488) plus anti-BCRP (Alexa 594) plus anti-AMB1 (Alexa 647) plus Hoechst 33342, grossissement x20

La Figure 2.44 montre que des zones de cellules BCRP⁺/CD133⁺ sont présentes dans la tumeur, probablement dans des zones hypoxiques, des magnétosomes AMB1 sont également présents dans ces zones. Ces images illustrent la capacité des magnétosomes à atteindre des niches de CSCs.

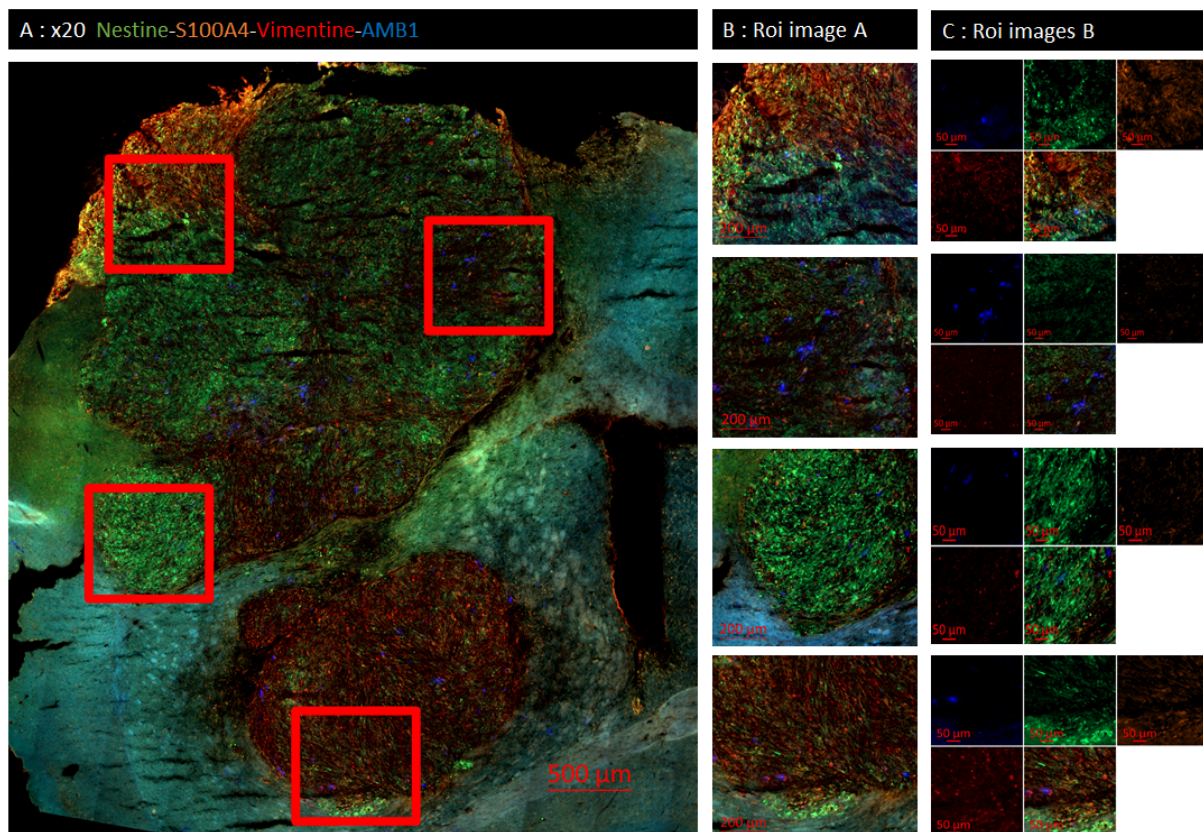


FIG. 2.45 – Immunomarquages sur souris porteuses de tumeurs avec les anticorps anti-Nestine (Alexa 488) plus anti-S100A4 (Alexa 594) plus anti-Vimentine (Alexa 647) plus anti-AMB1 (Alexa 350), grossissement x20

La Figure 2.45 illustre très bien l'hétérogénéité interne des tumeurs. Les marqueurs S100A4 et Nestine ne sont pas exprimés partout avec la même intensité. La zone la plus profonde exprime beaucoup moins S100A4 par exemple que la zone de surface, de même des sous-ensembles de cellules expriment fortement la Nestine alors que ce n'est pas le cas partout. L'expression de la vimentine est beaucoup plus ubiquitaire dans la tumeur même si la zone tumorale la plus basse l'exprime avec plus d'intensité.

La Figure 2.46 montre que des zones de cellules Sox2⁺/S100A4⁺/Vimentine⁺ sont présentes en bordure de la tumeur, alors que des magnétosomes AMB1-VRGD sont également présents dans ces zones.

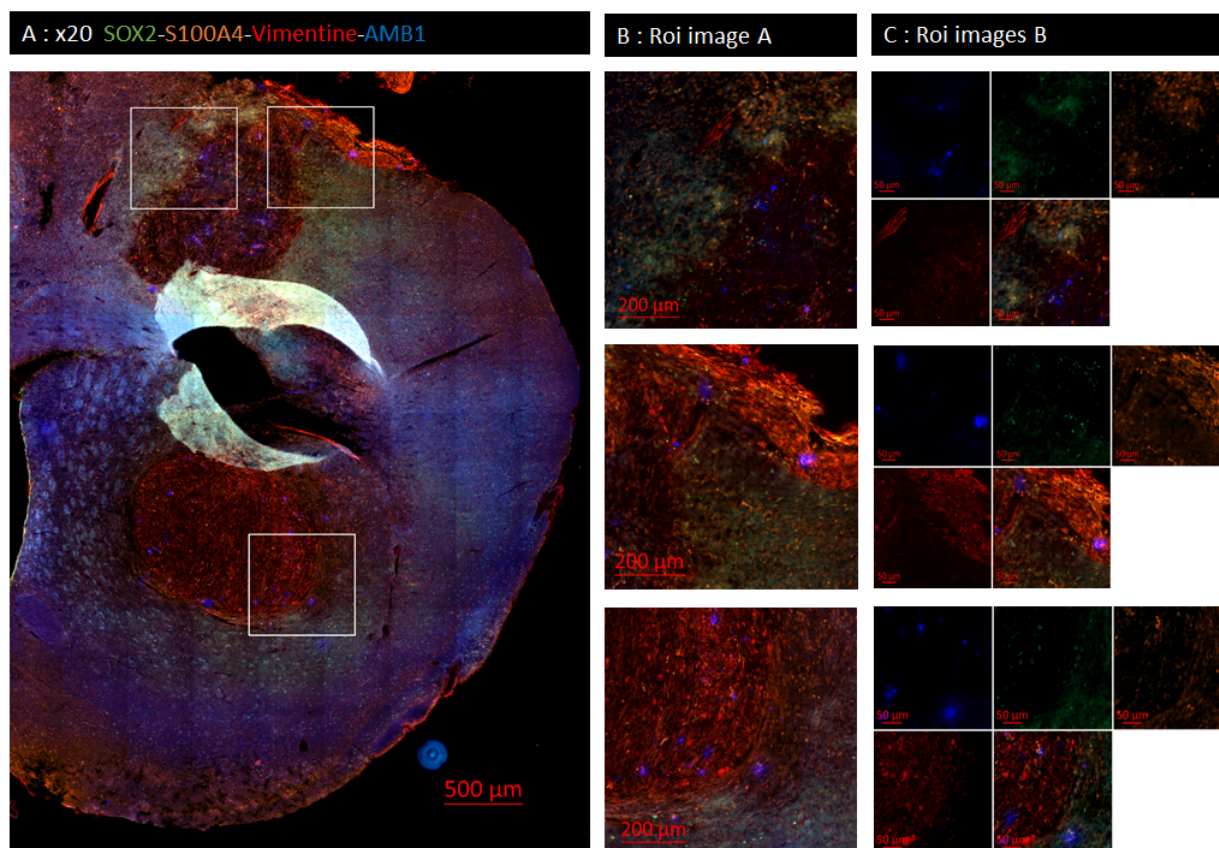


FIG. 2.46 – Immunomarquages sur souris porteuses de tumeurs avec les anticorps anti-Sox2 (Alexa 488) plus anti-S100A4 (Alexa 594) plus anti-Vimentine (Alexa 647) plus anti-AMB1 (Alexa 350), grossissement x20

Comme déjà évoqué à la Figure 2.42, l'expression du marqueur métabolique IDH1 est très hétérogène dans les tumeurs de cellules U87MG et semble proche des zones moins angiogéniques. La Figure 2.47 montre que des magnétosomes AMB1-VRGD sont présents dans les zones à forte expression IDH1, notamment en bordure d'une zone à faible expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, souvent identifiée comme une zone de nécrose, probablement par effet EPR. Ces images illustrent la capacité des magnétosomes à s'accumuler dans ces zones à fort potentiel métastatique. Une zone avec une très forte expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ montre un plus faible niveau d'expression du marqueur IDH1, mais également un ciblage effectif par les magnétosomes AMB1-VRGD.

Bien sûr, l'identification de la nature humaine des cellules sera grandement facilitée à l'avenir par l'utilisation de la lignée U87MG-E2 Crimson fluorescente en rouge, développée lors du Projet 3D (voir Chapitre 3, Paragraphe 4.5.1). Il est prévu d'étudier la croissance de ces cellules *in vivo* et de rechercher les marqueurs de CSCs et de cellules métastatiques.

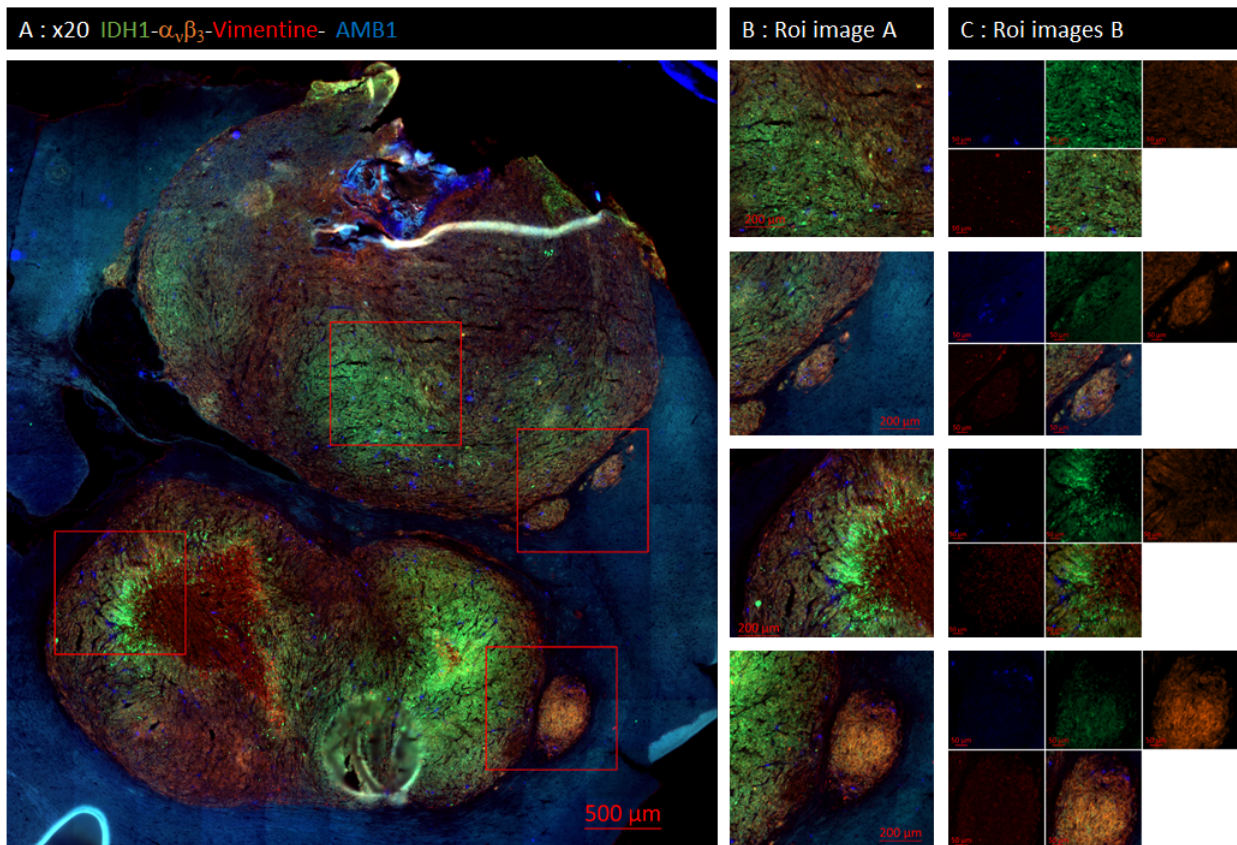


FIG. 2.47 – Immunomarquages sur souris porteuses de tumeurs avec les anticorps anti-IDH1 (Alexa 488) plus anti- $\alpha_v\beta_3$ (PE) plus anti-Vimentine (Alexa 647) plus anti-AMB1 (Alexa 350), grossissement x20

Les conclusions des expériences *ex vivo* sont donc :

- L’histologie confirme les résultats IRM concernant le ciblage de la tumeur
- Les magnétosomes sont retrouvés dans les vaisseaux sanguins, les microglies et les cellules tumorales.
- L’histologie confirme les résultats IRM concernant la meilleure incorporation des magnétosomes en plusieurs demi-doses plutôt qu’en une seule dose.
- Les niches périvasculaires regroupant des cellules tumorales de type stem cell like peuvent être ciblées par les magnétosomes.
- Les zones à fort potentiel métastatique sont également atteintes par les magnétosomes.

2.4.2 Toxicologie

Les animaux ayant reçu des injections de magnétosomes AMB1-WT, AMB1-V ou AMB1-VRGD lors des études IRM n'ont montré aucun signe clinique de douleur ou de toxicité, tout au long des expériences *in vivo*.

Une étude de toxicologie a été conduite avec l'aide d'un prestataire pour confirmer cette observation de façon plus précise. Mon rôle a été d'établir le cahier des charges et de réaliser le plan d'étude, conjointement avec Laurent Bellanger (CEA Marcoule).

Brièvement, des groupes de souris mâles CD-1 de 5 semaines ont reçu une injection intraveineuse de magnétosomes à différentes doses sous anesthésie, répétée trois fois (0, 6h et 24h) versus une seule injection, en aveugle. Les souris ont été euthanasiées à différents temps après l'injection pour chaque groupe (24, 48, 96 et 360 heures). Des prélèvements sanguins ont été réalisés avant l'euthanasie des animaux. Les organes ont été recueillis après exanguino-perfusion au PFA 4%. Les organes prélevés ont été : le cerveau, le foie, le coeur, la rate, les reins, un muscle (gastroméien) et de la peau (après rasage). Les organes ont été pesés et observés, puis séparés en deux morceaux pour deux études différentes.

Une moitié des organes a été congelée en azote liquide immédiatement pour la mesure du fer par spectroscopie ICP-AOS (étude réalisée par le MEM). L'autre partie des organes a été congelée en isopentane refroidi après deux bains successifs de sucrose (15 et 30%), pour éventuellement réaliser des études histologiques à NeuroSpin, si nécessaire. Les résultats de cette étude de toxicologie sont détaillés dans la thèse de Sandra Prévéral du MEM [Preveral, 2019].

La Figure 2.48 récapitule les résultats obtenus et la répartition des groupes. La Figure 2.49 reprend le résultat des dosages ICP-AOS réalisés par le MEM à Cadarache et la numération de la formule sanguine réalisée par le prestataire.

Brièvement, les magnétosomes n'ont pas montré de toxicité aigüe même en injectant trois fois la dose la plus forte (33 mg/kg), les souris n'ont montré aucun signe clinique et la progression pondérale a été la même pour tous les animaux. Les dosages ICP ont montré que les magnétosomes sont retrouvés essentiellement dans le foie et la rate, avec un retour proche de la normale après 16 jours pour les groupes injectés B, C et D, et une rétention du fer encore nette pour le groupe E (dose forte injectée trois fois). Ceci est en accord avec la littérature sur l'élimination des magnétosomes de fer [Weissleder *et al.*, 1989, Volatron *et al.*, 2017].

A : Etude de toxicologie-Groupes			
Groupe	Souris	Dose injectée mg/kg, 4ml/kg	Temps
A	3	Véhicule	48, 96 et 360h
B	12	11 mg/kg x1	24, 48, 96 et 360h
C	11	33 mg/kg x1	24, 48, 96 et 360h
D	9	11 mg/kg x3	48, 96 et 360h
E	9	33 mg/kg x3	48, 96 et 360h

B : Résultats		
Observations		Résultats
Comportement, poils, yeux, consommation de nourriture	2/j à J0 puis 1/j jusqu'au jour du prélèvement	Pas de signes cliniques (tous les groupes)
Pesée	T0, 72, 144 et 360h	Pas de différences entre les groupes
Prélèvements de sang	0.5 ml au moment de l'euthanasie Numération formule	Inversion de la formule : ratio Neutrophiles/Lymphocytes inversé à 24h avec un retour à la normale à 96h
Observation macroscopique des organes	Au moment de l'euthanasie, prélèvement des organes suivants : foie, cœur, rate, reins, cerveau, muscle, peau	Groupes B et C : foie sombre aux temps courts, normal à j16 Groupes D et E : foie reste légèrement sombre jusqu'au jour 16 et augmentation du volume de la rate à partir du temps 48h avec un retour à la normale au jour 16 Groupe E : poumons présentant des points noirs à 48h principalement

FIG. 2.48 – Résultats de l'étude de toxicologie

La rate a augmenté de volume après 48h (x3,7) et retrouve un volume normal après 16 jours. La réaction immunitaire observée (inversion de la formule sanguine et augmentation de la rate), transitoire, est corrélée avec l'étude de préparation des anticorps anti-AMB1 à Marcoule, réalisée sur le lapin et la souris. Elle est probablement exacerbée par la présence de la membrane bactérienne entourant le cœur de fer (réponse immunogène).

Le fer a été retrouvé dans les poumons d'une souris à dose forte à 48 heures, mais pas dans les autres animaux. Suite aux résultats obtenus par ICP il n'a pas été jugé utile de réaliser une étude histologique sur les organes prélevés.

Les conclusions de cette étude sont donc :

- Les magnétosomes n'entraînent pas de toxicité aiguë, ni d'effets persistants à court terme (15 jours)
- Une réaction inflammatoire transitoire a été observée mais elle n'entraîne pas de conséquences sur la santé des animaux.

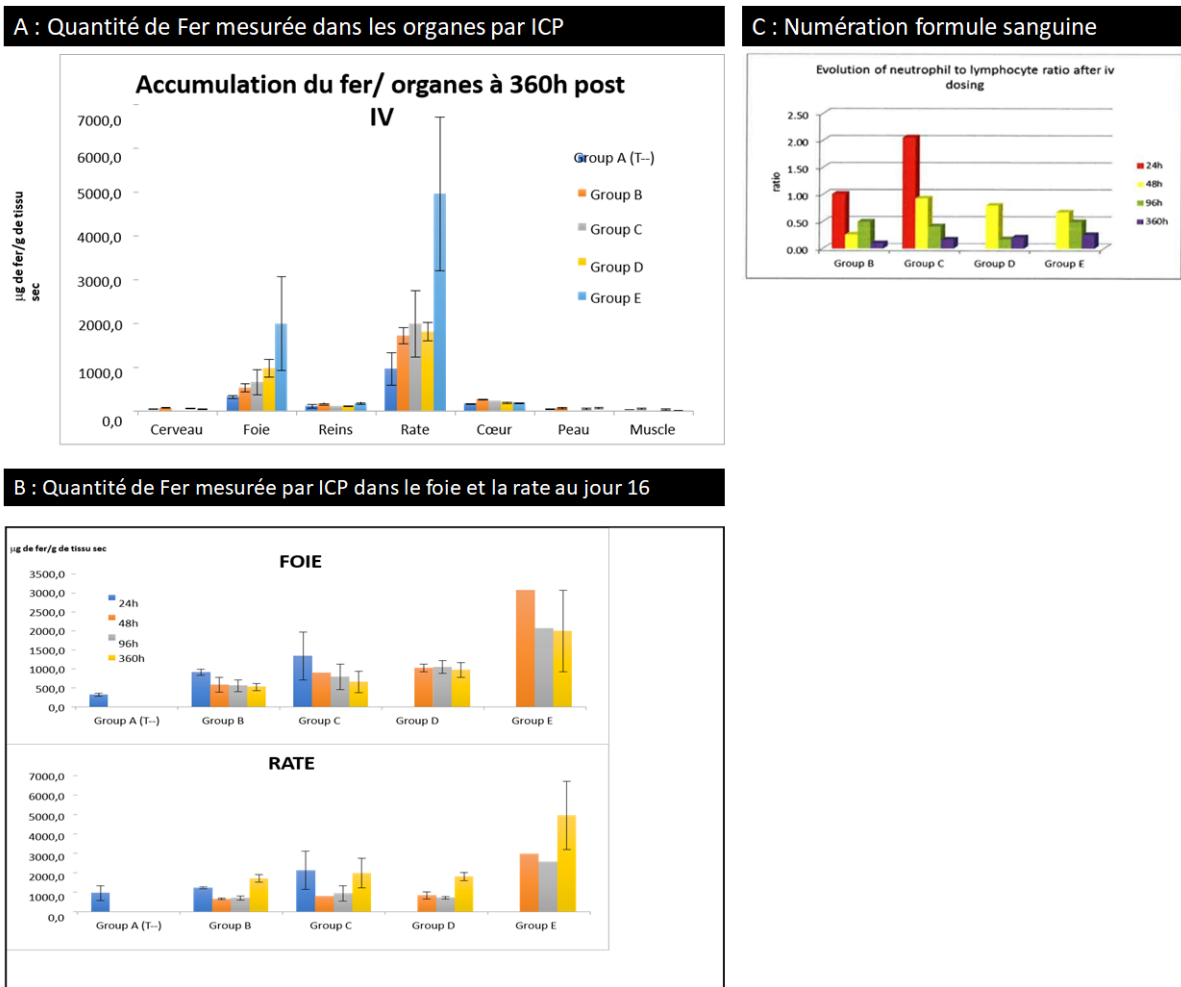


FIG. 2.49 – Etude de toxicologie (ICP et numération de la formule sanguine)

Ceci est en accord avec ce qui a été observé par d'autres équipes dans la littérature [Sun *et al.*, 2010, Qi *et al.*, 2016, Revathy *et al.*, 2017].

2.5 Conclusion et perspectives

Nous avons démontré lors de ce travail que les magnétosomes présentent un grand intérêt comme agent de contraste IRM. Nous avons également montré *in vitro* que les magnétosomes AMB1-VRGD sont incorporés préférentiellement dans les cellules tumorales par rapport aux magnétosomes non fonctionnalisés, démontrant ainsi la pertinence du ciblage des intégrines $\alpha_\nu\beta_3$ par le peptide RGD.

Nous avons démontré également *in vivo* et *ex vivo* le ciblage des tumeurs par les magnétosomes AMB1-VRGD. La quantité de magnétosomes qui est capturée par les tumeurs est aussi fonction de la façon dont les magnétosomes sont injectés, une même dose apportée en deux fois est plus efficace qu'injectée en une seule fois. Nous avons démontré également *ex vivo* la colocalisation des magnétosomes AMB1-VRGD avec des niches de cellules de types CSCs et avec des zones à fort pouvoir métastatique, ce qui est particulièrement prometteur pour des applications thérapeutiques à venir.

Nous envisageons à l'avenir de traiter les souris par perfusion, hors IRM, afin d'apporter les magnétosomes de façon progressive et ainsi améliorer l'incorporation dans les cellules tumorales. Parallèlement une étude de dose avec des concentrations supérieures de magnétosomes nous semble intéressante.

Nous pensons également étudier l'incorporation des magnétosomes à un stade plus précoce du développement tumoral, juste au début de la phase de croissance exponentielle, où la néo-angiogenèse est la plus importante. Nous souhaitons aussi utiliser des techniques de photothermie ou d'hyperthermie pour faire chauffer les cœurs de fer incorporés dans les cellules tumorales et les néo-vaisseaux, et ainsi induire l'apoptose de ces cellules. Cette partie pourrait être testée en amont sur des sphéroïdes, déterminant ainsi les paramètres de traitement avant de passer chez l'animal, réduisant donc le nombre d'animaux nécessaire. Un guidage magnétique des magnétosomes est également une des études en prévision.

Nous prévoyons d'utiliser une lignée de cellules U87MG fluorescentes, permettant de déterminer avec plus de précision si les cellules en bordure de tumeur, potentielles niches de CSCs, ainsi que les zones métastatiques, sont bien ciblées par les magnétosomes fonctionnalisés.

Enfin, nous pourrions retravailler sur la construction elle-même, un peptide RGD cyclique par exemple pourrait donner de meilleurs résultats d'affinité pour l'intégrine $\alpha_\nu\beta_3$ [Li *et al.*, 2021], ou le peptide iRGD [Sugahara *et al.*, 2009, Ruoslahti, 2017]. Les magnétosomes peuvent également être fonctionnalisés pour porter un radioélément, ou une molécule d'intérêt, un inducteur de ferroptose par exemple [Moosmayer *et al.*, 2021]. Il est également possible d'injecter les bactéries magnétotactiques directement comme cela a déjà été publié [Martel *et al.*, 2009, Taherkhani *et al.*, 2014], du fait de leur faible toxicité.

Chapitre 3

Orano

- 3.1 Contexte scientifique du projet
- 3.2 Lignées cellulaires utilisées lors du projet
- 3.3 Résultats *in vitro*
 - 3.3.1 Culture cellulaire en 2D
 - Incubation sur cellules vivantes, en statique
 - Incubation sur cellules vivantes, sous agitation
 - Incubation sur cellules fixées
 - 3.3.2 Culture cellulaire en 3D
- 3.4 Résultats *in vivo*
 - 3.4.1 Modèle tumoral
 - 3.4.2 Résultats IRM *in vivo*
- 3.5 Résultats *ex vivo*
- 3.6 Conclusion et perspectives

3.1 Contexte scientifique du projet

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme, quelques hommes étant aussi concernés, bien que l'incidence soit minime par rapport aux femmes (2650 hommes pour 284 200 femmes en 2021 aux USA) [Siegel *et al.*, 2021]. Le cancer du sein est en réalité une multitude de cancers du sein car l'hétérogénéité inter-patients et intra-tumorale est très importante [McCarthy *et al.*, 2021], augmentant d'autant plus la variabilité d'efficacité des stratégies thérapeutiques.

De nombreuses études épidémiologiques ont été réalisées pour déterminer les causes du cancer du sein, l'hygiène de vie est la plus souvent citée. Les habitudes alimentaires [Kazemi *et al.*, 2020], l'obésité [Harvie *et al.*, 2003, Houghton *et al.*, 2020], le tabac [Jones *et al.*, 2017], les traitements hormonaux [Rosenberg *et al.*, 2021] sont des facteurs identifiés depuis longtemps. L'exposition à la lumière artificielle [Urbano *et al.*, 2021] est un paramètre plus récent, cibant l'augmentation du cancer du sein chez les femmes travaillant de nuit. Dans environ 10% des cas, un facteur génétique est mis en cause, avec l'apparition de risques supplémentaires dans certaines familles [Litton *et al.*, 2019]. Ainsi, les profils génétiques et épigénétiques des différents cancers du sein sont étudiés pour le développement de nouvelles thérapies [Byler *et al.*, 2014].

Les sous-types de cancers du sein sont définis par leur aspect histologique (canalaire, lobulaire, mamelon ou non spécifique) et par les biomarqueurs retrouvés : les récepteurs aux œstrogènes (ER, pour Estrogen Receptor), les récepteurs à la progestérone (PR, pour Progesteron Receptor) et le récepteur HER2 (HER2, pour Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) [Subik *et al.*, 2010]. Les cancers les plus agressifs sont les cancers HER2+ et les cancers TNBC (TNBC, pour Triple Negative Breast Cancer), qui n'expriment ni les récepteurs hormonaux (progestérone, œstrogènes), ni HER2 [Deng *et al.*, 2021].

Le récepteur HER2 est un marqueur fortement associé avec l'agressivité du cancer du sein, retrouvé dans 15-20% des cancers du sein [Ménard *et al.*, 2000, Wolff *et al.*, 2013]. C'est un oncogène [Seshadri *et al.*, 1989, Moasser, 2007], associé à un mauvais pronostic pour le cancer du sein, mais aussi pour les cancers gastriques, gastro-œsophagiens [Boku, 2014] et ovariens [Chung *et al.*, 2019]. HER2 est aussi associé à la résistance à la radiothérapie [Candas-Green *et al.*, 2020] et à la résistance au tamoxifène, inhibiteur des récepteurs ER utilisé pour traiter les tumeurs ER+ [Osborne *et al.*, 2003]. L'inhibition de HER2 peut donc à la fois limiter la croissance du cancer, mais également améliorer la sensibilité à la radiothérapie [Huang *et al.*, 2020, Page *et al.*, 2022].

Le dépistage massif, la surveillance accrue des familles à risque, les démarches de prévention [Howell *et al.*, 2014] et les traitements ciblés ont considérablement amélioré le taux de survie des patientes, surtout dans les pays développés (80%), beaucoup moins dans les autres pays (40%) [Genuino *et al.*, 2019]. La chirurgie et les traitements (immunothérapie, chimiothérapie et radiothérapie) ne suffisent cependant pas pour éviter toute résurgence du cancer. Le cancer du sein métastase fréquemment dans le cerveau avec 10 à 30% des patientes développant des métastases cérébrales, et les cancers HER2+ et TNBC montrent un risque accru de métastases cérébrales par rapport aux autres sous-types [Garcia-Alvarez *et al.*, 2021].

Le récepteur HER2 est fortement associé au risque de métastases cérébrales, portant à 25-50% le taux d'incidence chez les patientes HER2+ [Zimmer *et al.*, 2020]. Le récepteur HER2 est donc une cible intéressante pour la mise en place de thérapies ciblant les tumeurs primaires et secondaires.

Le Trastuzumab, aussi appelé Herceptine, est le premier anticorps ciblant HER2, utilisé depuis 1998 [Beuzeboc *et al.*, 1999] et développé par Roche. Les anticorps anti-HER2 sont utilisés désormais en routine clinique comme adjuvants aux chimiothérapies, leur efficacité a permis de diminuer les récurrences [Escrivá-de Romaní *et al.*, 2018, Goutsouliak *et al.*, 2020]. Malgré ces effets positifs, l'utilisation des anticorps anti-HER2 n'est pas sans conséquences, pouvant entraîner des cardiopathies chez les patientes. De plus, une étude a montré qu'un traitement de longue durée (2 ans) n'apporte pas d'effets bénéfiques supplémentaires par rapport au traitement classique (1 an) [Cameron *et al.*, 2017], en association avec la chimiothérapie. Cela est corrélé avec une résistance apparaissant fréquemment après un an de traitement [Papadakis *et al.*, 2016]. Un nombre accru de métastases a aussi été retrouvé après une année de traitement [Bai *et al.*, 2021], bien que la survie soit meilleure chez les patientes ayant reçu le Trastuzumab en adjuvant des chimiothérapies, en comparaison des patientes ayant uniquement reçu la chimiothérapie.

Les anticorps anti-HER2 (Trastuzumab, Pertuzumab...) sont désormais associés à des molécules ciblant d'autres récepteurs (inhibiteur de la tyrosine kinase par exemple) afin d'augmenter l'efficacité des traitements, en même temps ou après la chimiothérapie [Papadakis *et al.*, 2016, Escrivá-de Romaní *et al.*, 2018, Al-Zeheimi et Adham, 2020, Jackisch *et al.*, 2021], ainsi qu'en combinaison avec la radiothérapie [Page *et al.*, 2022]. Des peptides ciblant HER2 ont été également développés [Geng *et al.*, 2015, Xiang *et al.*, 2017]. Les peptides sont de taille plus réduite que les anticorps et sont davantage capables de passer les membranes cellulaires, ils sont également plus faciles à produire et moins onéreux.

Dans le contexte actuel de développement d'une médecine dite "personnalisée", les traitements du cancer du sein sont constamment ré-évalués en fonction des données recueillies chez les patients. Ainsi des études récentes se focalisent sur la limitation de la chimiothérapie au profit de l'immunothérapie anti-HER2 [Goutsouliak *et al.*, 2020]. La nanomédecine, utilisant des nanoparticules pouvant passer la BHE, est une des voies explorées pour augmenter l'effet des thérapies pour traiter les cancers du cerveau, notamment ceux dérivant du cancer du sein [Carney *et al.*, 2021, Fraguas-Sánchez *et al.*, 2022]. Parmi les différents types de nanoparticules utilisées, les magnétosomes ont déjà été utilisés pour cibler HER2 [Xiang *et al.*, 2017, Zhang *et al.*, 2019]. L'imagerie par IRM montre un réhaussement du signal dans les tumeurs, permettant d'envisager une thérapie par hyperthermie magnétique en plus de l'immunothérapie.

La radiothérapie ciblée, utilisant des nanoparticules couplées à un émetteur de rayonnement α ou β , est également l'une des pistes de recherche en nanomédecine [Kempson, 2022]. En effet, apporter le radioélément directement à la cible permettrait d'éviter ou de limiter une exposition des cellules saines à la radiothérapie. De plus, la construction de nanoplateformes fonctionnalisées permet de cumuler plusieurs possibilités de thérapie (immunothérapie, chimiothérapie, radiothérapie, hyperthermie magnétique ou photothermie) grâce à un seul outil.

Des nanoparticules sont développées depuis quelques années, ciblant un récepteur d'intérêt tel que HER2 [Xiang *et al.*, 2017, Žuk *et al.*, 2021, Karahaliloğlu *et al.*, 2022] ou EGFR [Xiang *et al.*, 2017, Erdal *et al.*, 2018]. Elles peuvent être associées à un anti-cancéreux comme la doxorubicine [Jabalera *et al.*, 2020] et/ou un radioélément tel que le Rhénium-188 [Akbari-Karadeh *et al.*, 2020], le Lutétium-177 [Cai *et al.*, 2017] ou l'Indium-111 [Zolata *et al.*, 2016]. Lorsque la nanoparticule contient un cœur de fer ou d'or, il est possible d'ajouter l'hyperthermie magnétique ou la photothermie à la thérapie multi-modale [Cai *et al.*, 2017, Dziawer *et al.*, 2019, Žuk *et al.*, 2021].

C'est dans cette approche multi-thérapies que nous avons mis en œuvre le projet Orano, la société Orano-Med étant notre partenaire industriel. Le but de notre projet est de développer une thérapie multimodale en associant l'anticorps Trastuzumab aux magnétosomes, puis d'accrocher un chélate de Plomb radioactif. Cette construction, permettant un ciblage des récepteurs HER2, pourrait à la fois servir d'agent de contraste IRM et d'agents de double thérapies (immunothérapie et radiothérapie).

Le Plomb 212 est un émetteur de particules α , qui a déjà été associé avec succès à l'anticorps Trastuzumab [Meredith *et al.*, 2014]. Les particules α sont constituées de deux protons et de deux neutrons, elles sont plus grosses que les électrons et bien plus énergétiques (100KeV. μm^{-1} contre 0,1 pour les électrons, particules β^-) mais leur propagation se limite à quelques centaines de microns dans le corps alors que les électrons peuvent parcourir quelques millimètres. Cette faible propagation permet de limiter potentiellement les rayonnements aux cellules ayant incorporé les particules. Elles peuvent donc dégrader l'ADN d'une cellule cancéreuse, la zone irradiée étant comparable à la taille de la cellule que l'on veut ioniser sans que les cellules saines à côté ne soient touchées. Cette approche permettrait à la fois de mieux visualiser la zone tumorale grâce aux magnétosomes, d'apporter l'anticorps anti-HER2 à sa cible et de réaliser une radiothérapie ciblée limitant l'exposition des cellules saines.

3.2 Lignées cellulaires utilisées lors du projet

Pour tester la fonctionnalité des magnétosomes fonctionnalisés avec le Trastuzumab, plusieurs lignées cellulaires ont été utilisées. Les références des cellules et les autorisations réglementaires associées sont présentées en Annexe D.2. Les conditions de culture sont présentées en Annexe A.3. Les protocoles d'immunomarquages sont présentés en Annexe A.6.2.

En première intention, nous avons décidé d'utiliser des cellules de cancer du sein sélectionnées sur leur niveau d'expression d'HER2 [Subik *et al.*, 2010, Holliday et Speirs, 2011]. Les cellules SKBR3 [Holliday et Speirs, 2011] HER2+++ ont été comparées avec des cellules TNBC (HER2-), la lignée MDA-MB-231 [Chavez *et al.*, 2010]. Puis nous nous sommes aussi intéressés aux cellules A431 de cancer de peau HER2++ [Waterhouse *et al.*, 2011]. Nous avons également utilisé les cellules de cancer de sein MCF7, exprimant très faiblement HER2 [Deken *et al.*, 2019], puis pour finir une lignée de cellules épithéliales de sein non cancéreuses mais immortalisées (MCF12a) a été utilisée, exprimant également très peu HER2 [Subik *et al.*, 2010].

Une première étude a consisté à vérifier l'expression du récepteur HER2 dans les lignées cellulaires choisies. La Figure 3.1 montre l'expression d'HER2 sur chacune des lignées. Comme décrit dans la littérature, les cellules SKBR3 surexpriment fortement HER2 (image A), alors que les cellules MDA-MB-231 ne l'expriment pas du tout (image B). Les cellules A431 l'expriment toutes mais de façon plus hétérogène et nettement moins importante que les SKBR3 (image C). Les cellules MCF7 (image D) ne l'expriment que ponctuellement et très faiblement (quelques cellules par puits de chambre de culture LabTek), les cellules MCF12a ne l'expriment qu'épisodiquement (image E).

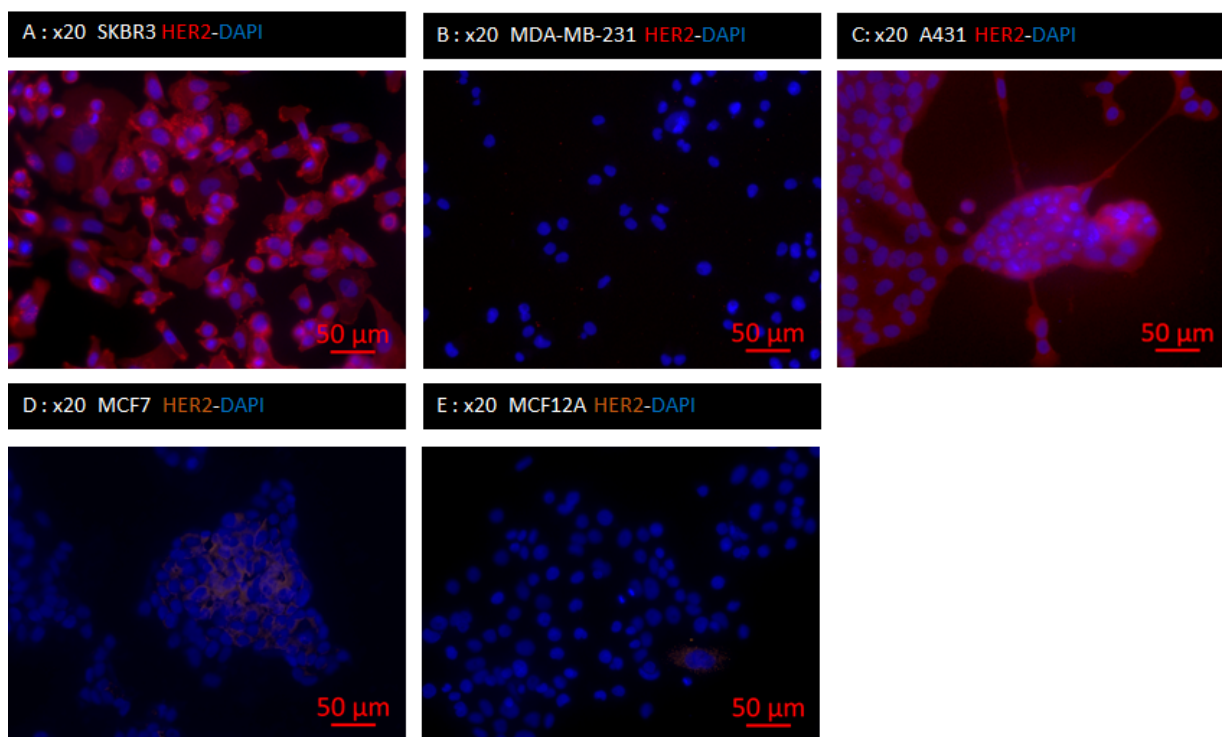


FIG. 3.1 – Expression d'HER2 sur les lignées cellulaires SKBR-3 (A), MDA-MB-231 (B), A431 (C), MCF7 (D) et MCF12a (E), grossissement x20

3.3 Résultats *in vitro*

Pour les études *in vitro*, les magnétosomes AMB1 ont été préparés par l'équipe du MEM sous deux formes, une forme non conjuguée (AMB1-WT) et une forme conjuguée avec le Trastuzumab et le TCMC (AMB1-TzTCMC). Le plomb n'a pas été ajouté dans la construction à ce stade.

3.3.1 Culture cellulaire en 2D

Les lignées cellulaires ont été mises en contact avec les magnétosomes conjugués et non conjugués à différents temps d'incubation et à différentes concentrations, sur cellules vivantes en culture et sur cellules fixées sur lame.

Dans toutes les conditions, l'anticorps anti-AMB1 développé précédemment (voir Chapitre Mefisto, Paragraphe 2.2.3) a permis de révéler les magnétosomes (protocole in&out).

L'anticorps Trastuzumab a été révélé grâce à des anticorps anti-Trastuzumab (MAB95471 produit chez le lapin, MAB9547 produit chez la souris). Les protocoles d'immunomarquages sont regroupés en Annexe A.6.2.

La coloration Perl's a été utilisée pour révéler le fer (même protocole que celui utilisé pour le projet Mefisto, voir Annexe A.9).

Incubation sur cellules vivantes, en statique

Les premières études ont été réalisées conjointement sur les cellules SKBR3 et MDA-MB-231, puis les cellules A431, MCF7 et MCF12a ont également été mises en contact avec les magnétosomes conjugués et non conjugués. Plusieurs études ont été menées sur plusieurs lots de magnétosomes conjugués et non conjugués.

Pour chacune des études, les cellules ont étéensemencées sur LabTek trois jours avant traitement. Les magnétosomes ont été dilués dans le milieu de culture (1000 ou 2000 $\mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$), puis soniqués 10 ou 20 minutes. Des milieux de culture différents ont été testés (normal ou de dispersion), le milieu de dispersion reprenant des caractéristiques de celui utilisé pour le projet Mefisto (citrate 1 mM, glycérol 1%, sans sérum). Des dilutions sont ensuite réalisées, pour mettre en contact les magnétosomes avec les cellules à différentes concentrations (100, 250, 500, 1000, 2000 $\mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$). Plusieurs temps d'incubation ont également été testés, courts (2, 4 et 6 heures), puis plus longs (24, 48, 72 et 96 heures). Puis les cellules ont été fixées 15 minutes au PFA 4%.

Les lames ont ensuite été utilisées en immunomarquages pour révéler les magnétosomes avec l'anticorps anti-AMB1 ou en coloration pour révéler le fer. Les études à temps court (moins de six heures) ne permettent pas de voir une incorporation dans les cellules de façon importante (résultats non montrés). L'utilisation du milieu de dispersion ne donne pas une meilleure incorporation des magnétosomes dans les cellules SKBR3 et n'a pas été jugé utile sur ces cellules (résultats non montrés). De même, une sonication de 20 minutes n'améliore pas significativement la dispersion des magnétosomes par rapport à une sonication de 10 minutes (résultats non montrés). Les études suivantes ont donc été réalisées en milieu normal, avec une sonication de 10 minutes et une incubation de 24h minimum. Un tableau récapitulatif des résultats obtenus sur les différents lots est présenté à la Figure 3.2.

Incorporation dans les cellules																								
			Lot WT30L-1				Lot WT30L-2								Lot WT30L-3									
			sur lames, 1 traitement, sans agitation				sur lames, 1 traitement, sans agitation				sur boîte avec multi-traitements, sous agitation				sur lames, 1 traitement, sans agitation				sur boîte avec multi-traitements, sous agitation					
			100, 250, 500 µg/L		1000, 1500 et 2000 µg/L		100, 250, 500 µg/L		1000, 1500 et 2000 µg/L		100, 250, 500 µg/L		1000, 1500 et 2000 µg/L		100, 250, 500 µg/L		1000, 1500 et 2000 µg/L		100, 250, 500 µg/L		1000, 1500 et 2000 µg/L			
Lignées	Type de cancer	HER2	NC	C	NC	C	NC	C	NC	C	NC	C	NC	C	NC	C	NC	C	NC	C	NC	C		
SKBR3	sein	+++	+	+	++	++		+		++		++		+++						++		++++		
MDA-MB-231	sein	-	+	+	+++	++				+++		++								++	+	++++	++++	
A431	peau	++			+/-	+											+/-	+	+	++	+/-	++	++	++++
MCF7	sein	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-																		
MCF12a	sein "sain" - (littérature)																+	+	++	++			++++	++++

- +/- qq cellules par puits avec qq amas de magnétosomes/cell
- +
- ++ nombreuses cellules (40-60%)/ champs de vue (x10) avec quelques amas/cell au minimum et quelques cellules surchargées
- +++ très nombreuses cellules((70-90%)/ champs de vue (x10) avec quelques amas/cell au minimum et des cellules surchargées
- ++++ toutes les cellules, avec une quantité importante de magnétosomes/cell

FIG. 3.2 – Récapitulatif des résultats *in vitro* des différents lots de magnétosomes Projet Orano

La Figure 3.3 et la Figure 3.4 illustrent les résultats obtenus en comparant les magnétosomes conjugués et non conjugués à la concentration de 1000 $\mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$, 24 heures d’incubation en statique sans agitation, sur les lignées SKBR3 (Figure 3.3) et MDA-MB-231 (Figure 3.4).

La Figure 3.3 montre que les cellules SKBR3 incorporent les magnétosomes conjugués ou non. Cependant, le marquage obtenu avec l’anticorps anti-AMB1 montre que les magnétosomes AMB1-WT (image C) restent assez nombreux à l’extérieur (out, marqueur rouge) contrairement aux magnétosomes conjugués (image A). Les magnétosomes conjugués montrent beaucoup moins de signal AMB1 au total que les magnétosomes non conjugués (in&out, marqueur vert). Cependant, les images prises en fond clair montrent des particules de fer (amas noirs) dans les cellules, quelque soit le type de magnétosomes. Les amas de magnétosomes conjugués semblent de taille légèrement plus importante que les non conjugués (images ROI B et D). L’anticorps anti-AMB1 semble reconnaître moins les magnétosomes AMB1-TzTCMC, peut-être en raison de la conformation spatiale des magnétosomes conjugués, ou parce que les magnétosomes AMB1-TzTCMC sont incorporés plus vite dans les cellules que les magnétosomes AMB1-WT et que leur membrane est déjà dégradée.

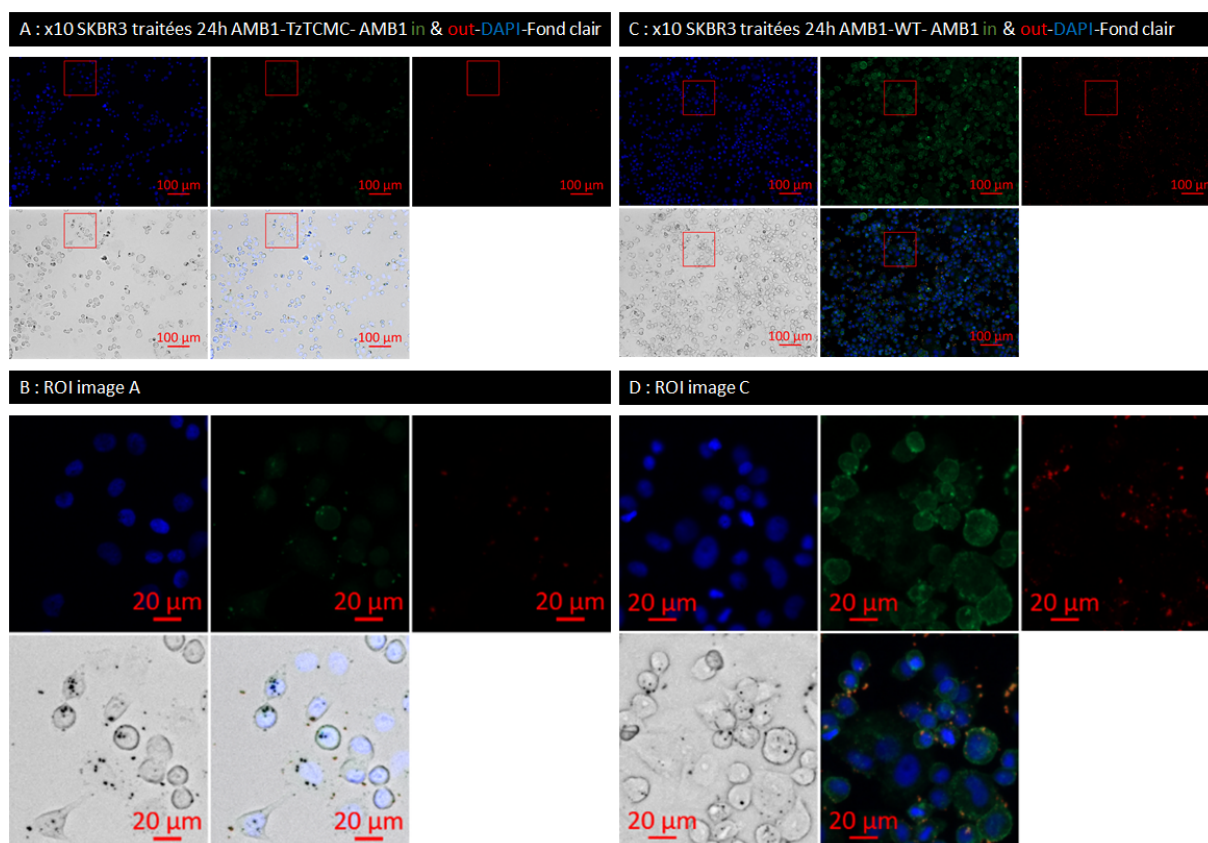


FIG. 3.3 – Incubation des cellules SKBR3 avec les magnétosomes AMB1-WT et AMB1-TzTCMC, 24h, $1000 \mu\text{g}_{\text{Fe}}/\text{L}$, grossissement x10

La Figure 3.4 montre que les cellules MDA-MB-231 (HER2-) incorporent les magnétosomes conjugués ou non, de façon encore plus importante que les cellules SKBR3. Cependant, le marquage obtenu avec l'anticorps anti-AMB1 montre que les magnétosomes AMB1-WT (image C) restent nombreux à l'extérieur (out, marqueur rouge) contrairement aux magnétosomes conjugués (image A). Les magnétosomes conjugués montrent un peu moins de signal AMB1 au total que les magnétosomes non conjugués (in&out, marqueur vert). Les images prises en fond clair montrent des particules de fer (amas noirs) dans les cellules, quelque soit le type de magnétosomes, et contrairement aux cellules SKBR3, les magnétosomes non conjugués semblent avoir été plus internalisés que les conjugués (ROI images B et D).

Ce résultat nous a surpris car nous ne nous attendions pas à ce que les cellules MDA-MB-231 soient capables d'internaliser les magnétosomes conjugués et non conjugués, ni à ce que les cellules SKBR3 incorporent autant de magnétosomes non conjugués.

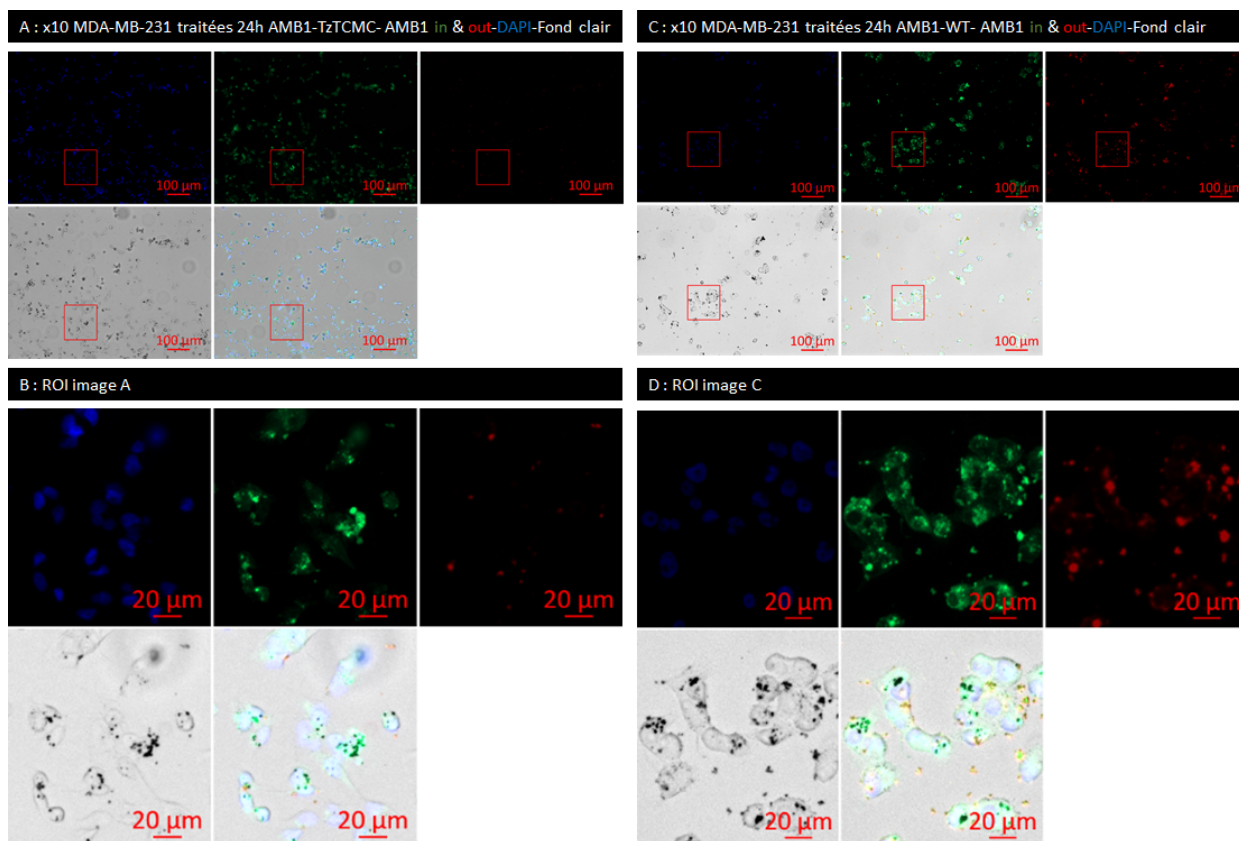


FIG. 3.4 – Incubation des cellules MDA-MB-231 avec les magnétosomes AMB1-WT et AMB1-TzTCMC, 24h, $1000 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$, grossissement x10

Pour rappel, lors du projet Mefisto, les magnétosomes AMB1-WT n'étaient internalisés dans les cellules U87MG que de façon épisodique. Ce résultat nous apprend qu'il y existe des voies d'internalisation des magnétosomes WT dans les cellules de cancer de sein MDA-MB-231 et SKBR3.

Les voies d'endocytose sont multiples [Doherty et McMahon, 2009, Mandarinini *et al.*, 2020] et il serait nécessaire d'étudier l'inhibition des voies principales pour déterminer lesquelles peuvent être impliquées. Les protéines qui transportent le fer dans/hors des cellules telles que la transferrine 2 et la ferroportine [Ma *et al.*, 2016, Shan *et al.*, 2018] peuvent également être impliquées. Il semble que les cellules TNBC ont une appétence pour le fer [Müller *et al.*, 2020], ce qui peut être une voie thérapeutique à explorer [Rodriguez *et al.*, 2022].

Nous avons testé les lignées A431, MCF7 et MCF12a afin de déterminer si l'incorporation des magnétosomes WT est liée au type cellulaire et/ou à leur tumorigénicité.

La Figure 3.5 illustre les résultats obtenus en comparant les magnétosomes conjugués et non conjugués à la concentration de $1000 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$, 24h d'incubation, sur la lignée A431. Les magnétosomes conjugués ont été incorporés aux cellules A431 de façon plus importante que les non conjugués, qui ont tendance à s'agglutiner en amas hors des cellules. Il semble que les magnétosomes conjugués montrent une meilleure spécificité par rapport aux non conjugués même si les magnétosomes AMB1-WT sont retrouvés aussi internalisés dans quelques cellules.

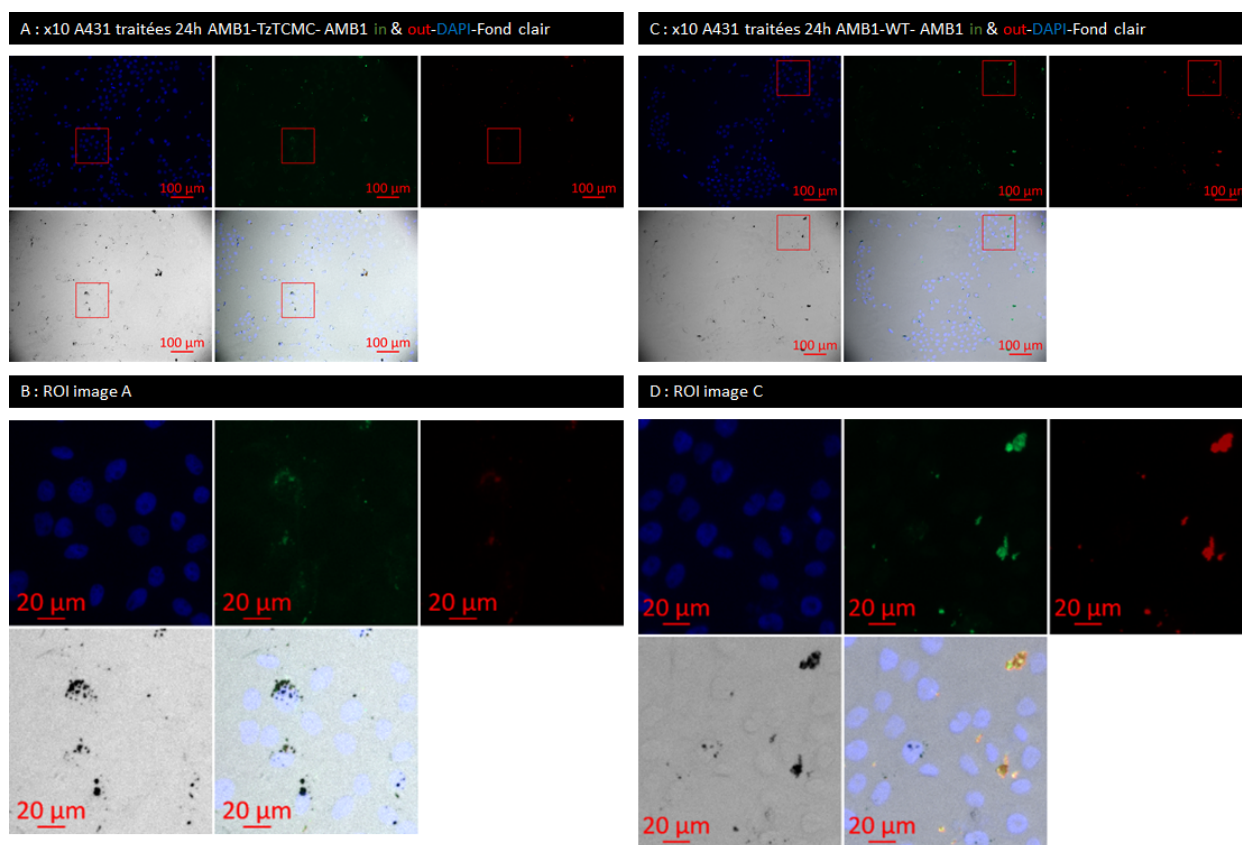


FIG. 3.5 – Incubation des cellules A431 avec les magnétosomes AMB1-WT et AMB1-TzTCMC, 24h, $1000 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$, grossissement x10

La Figure 3.6 illustre les résultats obtenus en comparant les magnétosomes conjugués et non conjugués à la concentration de $1000 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$, 24h d'incubation, sur la lignée MCF7. Seules quelques cellules éparses ont incorporées les magnétosomes conjugués et non conjugués. Il semble que les cellules MCF7 n'expriment pas la voie d'endocytose existant dans la majorité des cellules SKBR3 et MDA-MB-231. Cette lignée de cancer de sein MCF7, exprimant faiblement le récepteur HER2, nous apprend que la nature mammaire des cellules n'est pas forcément en cause en ce qui concerne l'incorporation des magnétosomes non conjugués.

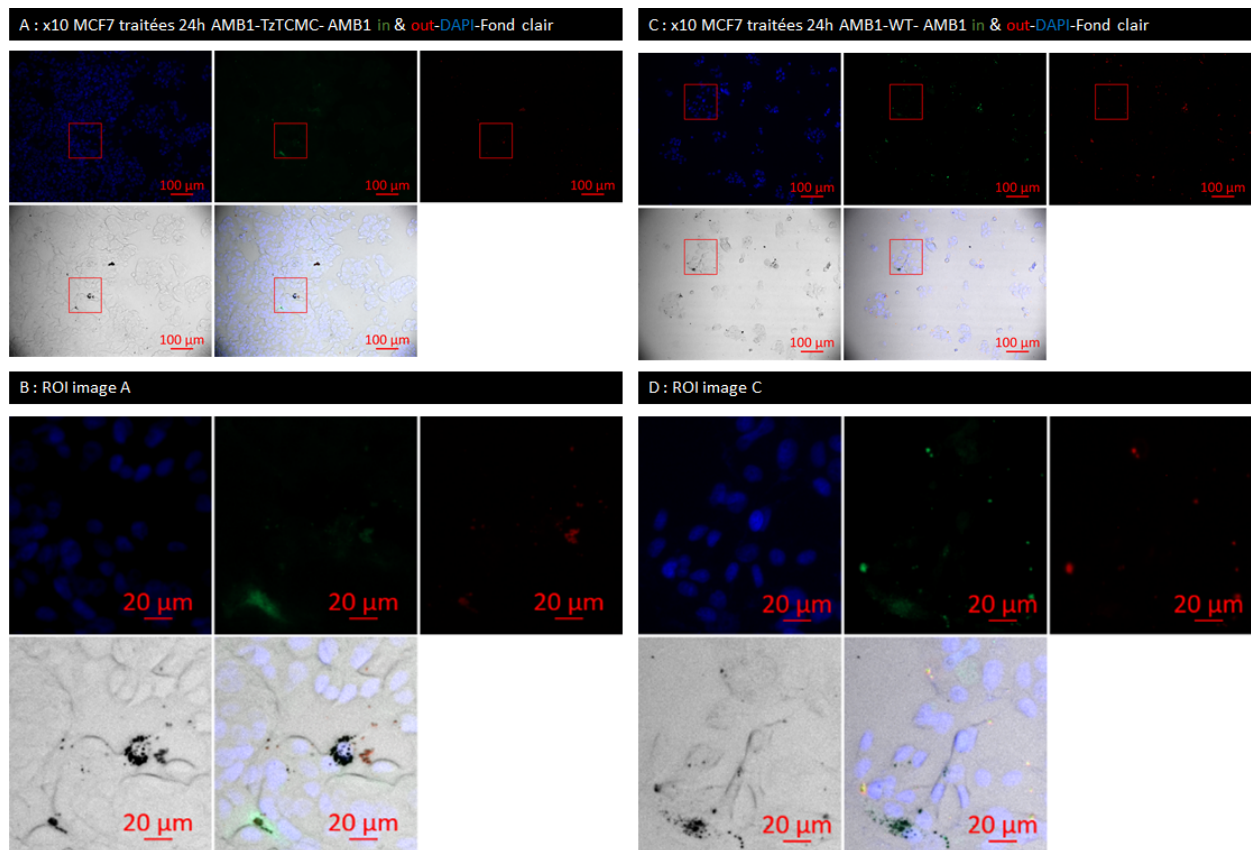


FIG. 3.6 – Incubation des cellules MCF7 avec les magnétosomes AMB1-WT et AMB1-TzTCMC, 24h, $1000 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$, grossissement x10

La Figure 3.7 illustre les résultats obtenus en comparant les magnétosomes conjugués et non conjugués à la concentration de $1000 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$, 24h d'incubation, sur la lignée MCF12a. Les cellules MCF12a incorporent les magnétosomes conjugués et non conjugués, de façon hétérogène, pour un pourcentage assez important de cellules, visuellement. Cette lignée, non cancéreuse, nous apprend que la nature tumorigène des cellules n'est pas forcément en cause lors de l'incorporation des magnétosomes non conjugués observée par les cellules MDA-MB-231.

Bien que non tumorigène, cette lignée est issue d'une patiente atteinte de maladie fibrokystique du sein et cela ne permet pas de conclure quant à la possible incorporation des magnétosomes dans les cellules mammaires saines. Les différences entre les lignées testées pourront peut-être nous donner des pistes sur les voies d'incorporation des magnétosomes WT dans les lignées SKBR3 et MDA-MB-231. Nous souhaitons initier un nouveau projet pour étudier en détails les voies d'incorporation des magnétosomes dans les cellules MDA-MB-231.

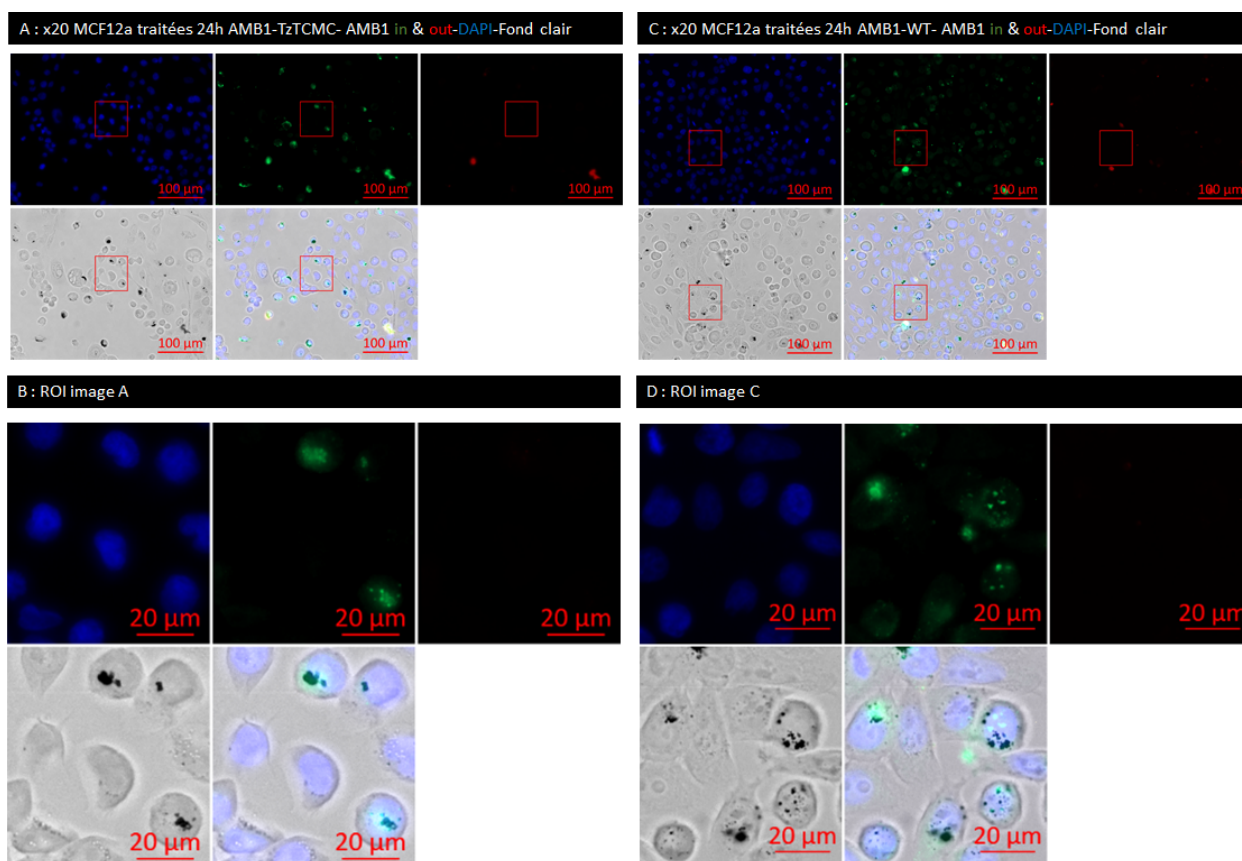


FIG. 3.7 – Incubation des cellules MCF12a avec les magnétosomes AMB1-WT et AMB1-TzTCMC, 24h, $1000 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$, grossissement x20

Tout d'abord, nous nous sommes intéressés aux interactions potentielles des magnétosomes avec des lignées cellulaires exprimant le récepteur HER2 à différents degrés. Ensuite, nous avons étudié la dynamique d'interaction des magnétosomes avec ces lignées cellulaires.

Des cinétiques d'incubation ont été réalisées sur les cellules SKBR3 et MDA-MB-231, avec les magnétosomes AMB1-TzTCMC uniquement, aux concentrations de 250, 500 et $1000 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$. Les cellules ont étéensemencées à faible densité trois jours avant de débuter les traitements, une lame a été fixée chaque jour afin de pouvoir comparer les temps 24, 48, 72 et 96 heures.

La Figure 3.8 illustre les résultats obtenus sur les cellules SKBR3 incubées avec les magnétosomes AMB1-TzTCMC à la concentration de $1000 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$, en révélant les magnétosomes par l'anticorps anti-AMB1 (protocole in&out).

La Figure 3.9 illustre les résultats obtenus sur des cellules SKBR3 incubées avec les magnétosomes AMB1-TzTCMC à la concentration de $1000 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$, en révélant les magnétosomes par l'anticorps anti-Trastuzumab (MAB95471, protocole in&out).

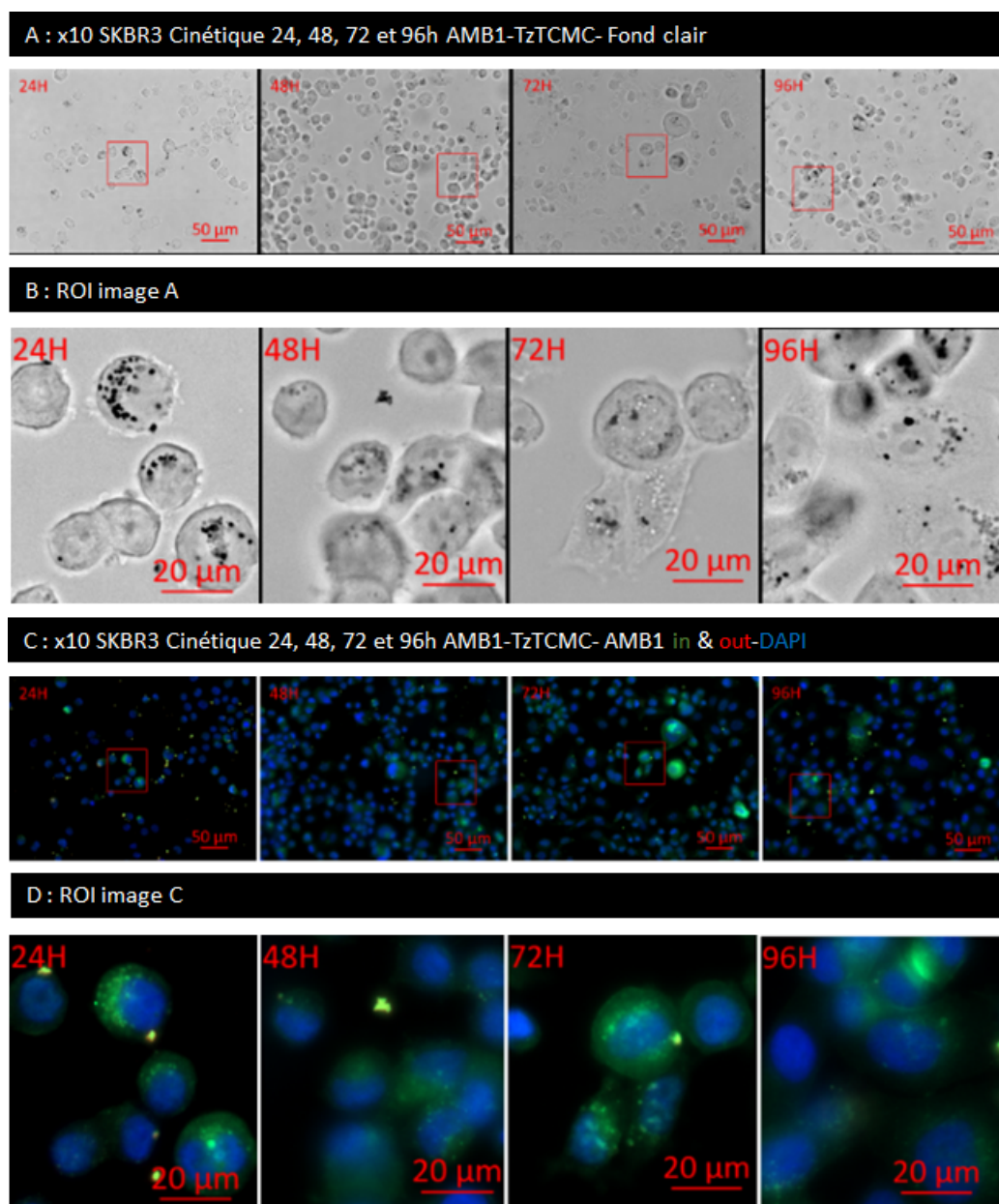


FIG. 3.8 – Immunomarkage avec l'anticorps anti-AMB1 sur des cellules SKBR3 incubées avec les magnétosomes AMB1-TzTCMC, 1000 $\mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$, 24, 48, 72 et 96h, grossissement x10

Ces Figures 3.8 et 3.9 montrent que l'incorporation des magnétosomes AMB1-TzTCMC dans les cellules SKBR3 n'augmente pas après 24 heures, les magnétosomes sont bien visibles en fond clair et avec l'anticorps anti-AMB1, beaucoup moins avec l'anticorps anti-Trastuzumab et plus du tout après 48 heures. Ces données suggèrent une dégradation du Trastuzumab assez rapide après incorporation.

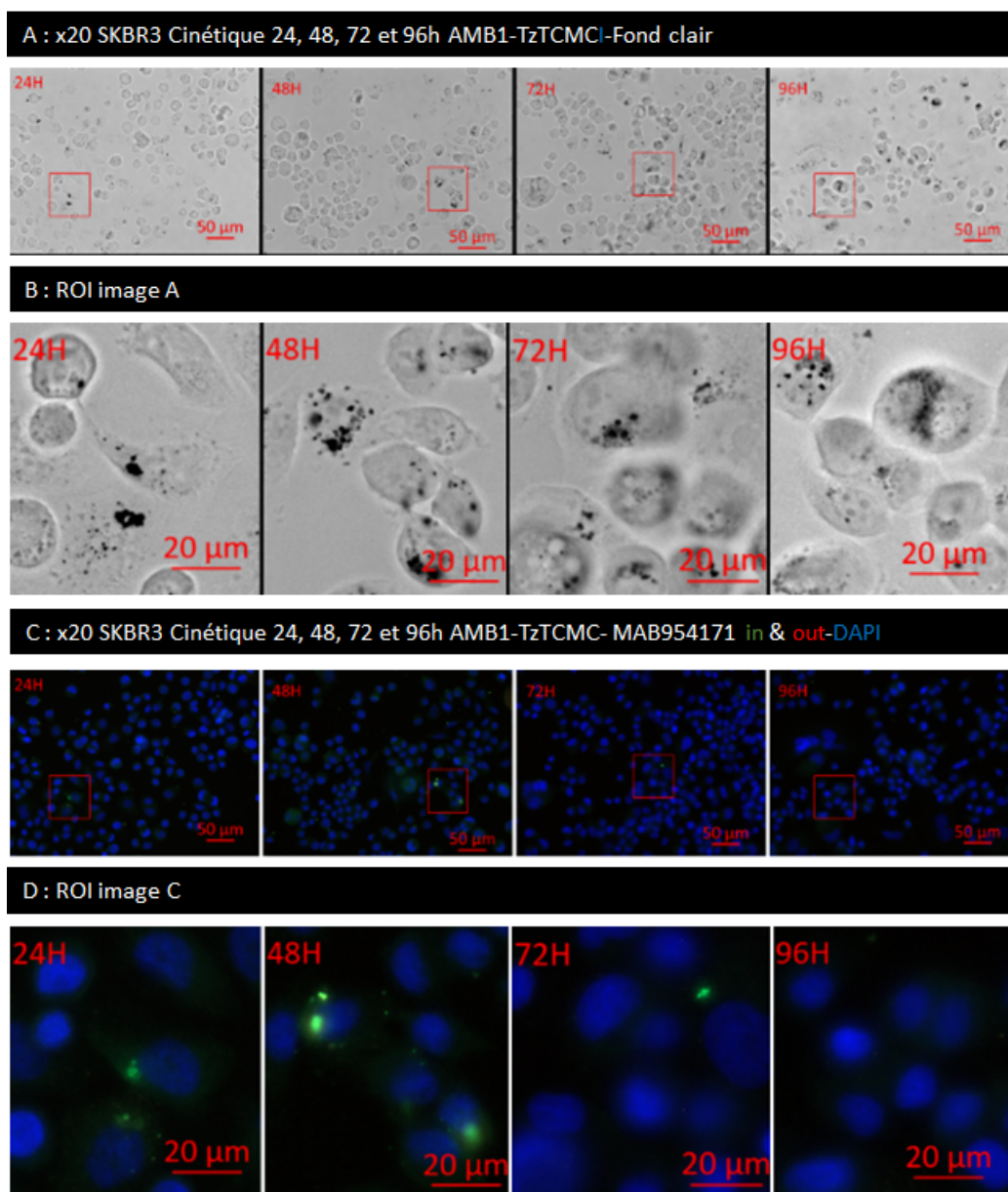


FIG. 3.9 – Immunomarkage avec l'anticorps anti-Trastuzumab sur cellules SKBR3 incubées avec les magnétosomes AMB1-TzTCMC, 1000 $\mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$, 24, 48, 72 et 96h, grossissement x20

La Figure 3.10 illustre les résultats obtenus sur les cellules MDA-MB-231 incubées avec des magnétosomes AMB1-TzTCMC à la concentration de 1000 $\mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$ en révélant les magnétosomes par l'anticorps anti-AMB1 (in&out).

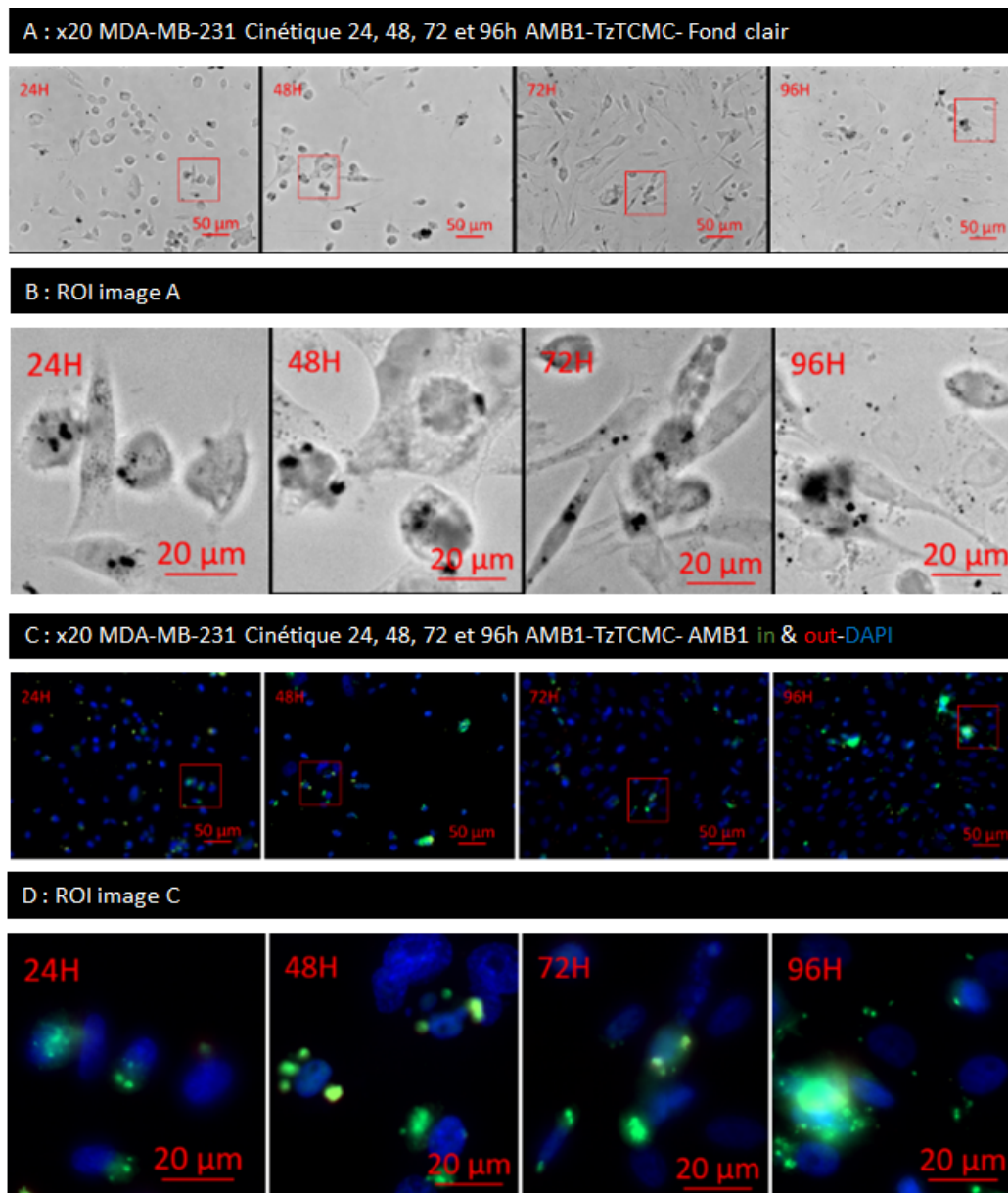


FIG. 3.10 – Immunomarkage avec l'anticorps anti-AMB1 sur des cellules MDA-MB-231 avec les magnétosomes AMB1-TzTCMC, $1000 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$, 24, 48, 72 et 96h, grossissement x20

La Figure 3.11 illustre les résultats obtenus sur les cellules MDA-MB-231 incubées avec des magnétosomes AMB1-TzTCMC à la concentration de $1000 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$ en révélant les magnétosomes par l'anticorps anti-Trastuzumab (MAB95471, protocole in&out).

Ces Figures 3.10 et 3.11 montrent que l'incorporation des magnétosomes dans les cellules MDA-MB-231 augmente un peu entre 24 et 48 heures mais n'évolue pas à 72 et 96 heures. Comme observé sur les cellules SKBR3, les magnétosomes sont visibles en fond clair et avec le marquage par l'anticorps anti-AMB1 mais très peu avec le marquage par l'anticorps anti-Trastuzumab.

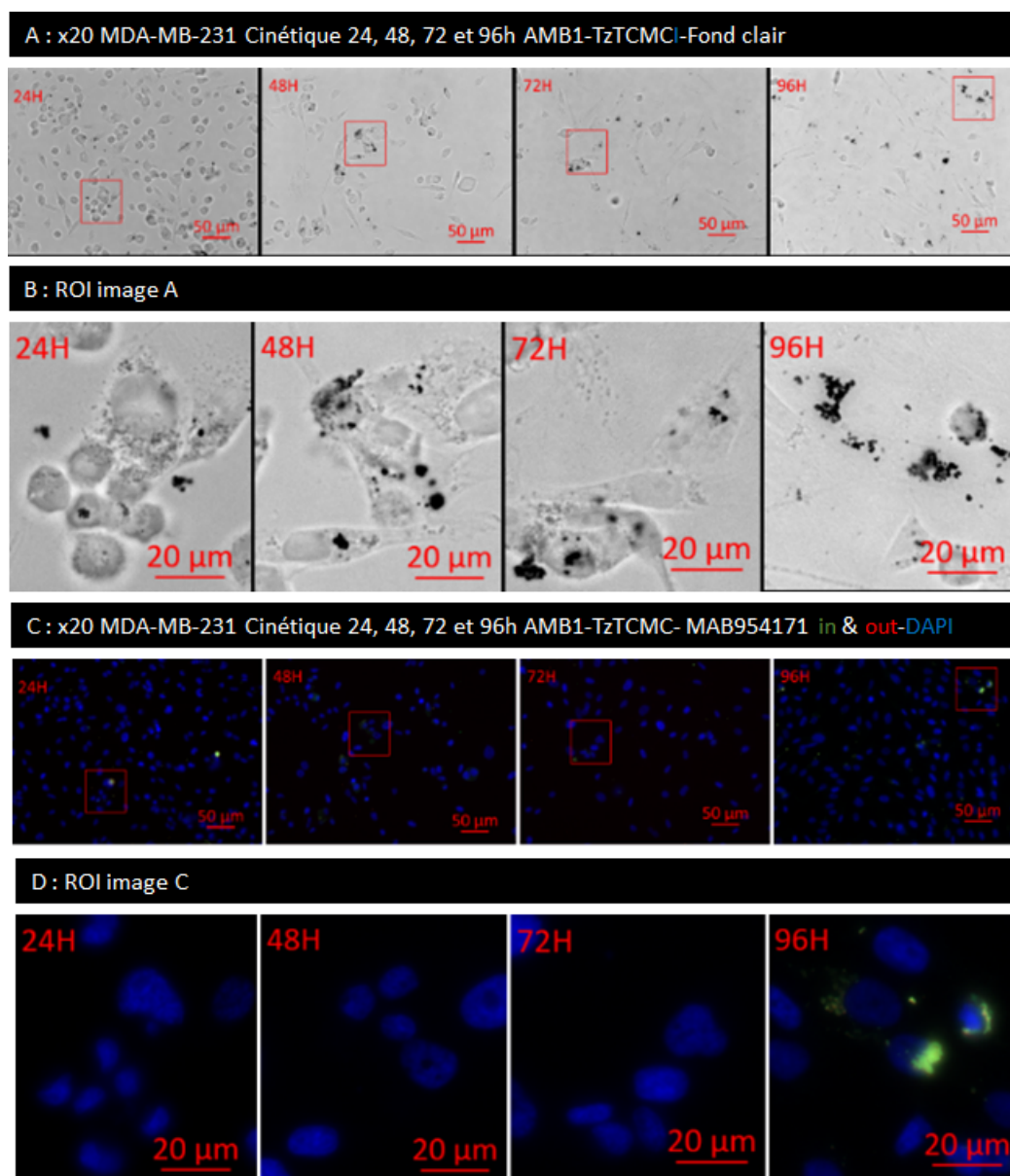


FIG. 3.11 – Immunomarkage avec l'anticorps anti-Trastuzumab sur cellules MDA-MB-231 avec les magnétosomes AMB1-TzTCMC, $1000 \mu\text{g}_{\text{Fe}}/\text{L}$, 24, 48, 72 et 96h, grossissement x20

Ces données suggèrent que l'incorporation se fait assez rapidement durant les 24 premières heures de mise en contact. Les cellules MDA-MB-231 se déplacent un peu dans la boîte de culture, pouvant incorporer lors des déplacements quelques particules supplémentaires, alors que les cellules SKBR3 sont très statiques, elles ne sont en contact qu'avec les magnétosomes qui se sont déposés à leur surface.

Incubation sur cellules vivantes, sous agitation

Les traitements apportés sous agitation, gardant les magnétosomes en suspension, permettent une mise en contact plus longue avec les cellules pour une même concentration, mimant, toute proportion gardée, le flux des magnétosomes dans les organes. En effet, sans agitation, les magnétosomes tombent indifféremment sur le fond de la boîte et sur les cellules. Or les cellules de sein étant peu mobiles (comparées aux cellules de glioblastome du projet Mefisto) elles n'incorporent que peu de ces magnétosomes tombés au fond des boîtes.

Pour ces études, les cellules SKBR3 et MDA-MB-231 ont étéensemencées à faible densité trois jours avant traitement, sur boîtes à fond de verre, où le milieu bouge plus facilement qu'en LabTek du fait de la taille de la boîte. Puis les magnétosomes ont été laissés trois jours en contact sous agitation, avant rinçage et fixation. Le choix d'une densité plus faible a été fait pour éviter une surpopulation cellulaire après six jours de croissance.

La Figure 3.12 et la Figure 3.13 illustrent les résultats obtenus en comparant les magnétosomes conjugués et non conjugués à la concentration de $500 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$, après trois jours d'incubation sous agitation, sur les lignées SKBR3 (Figure 3.12) et MDA-MB-231 (Figure 3.13).

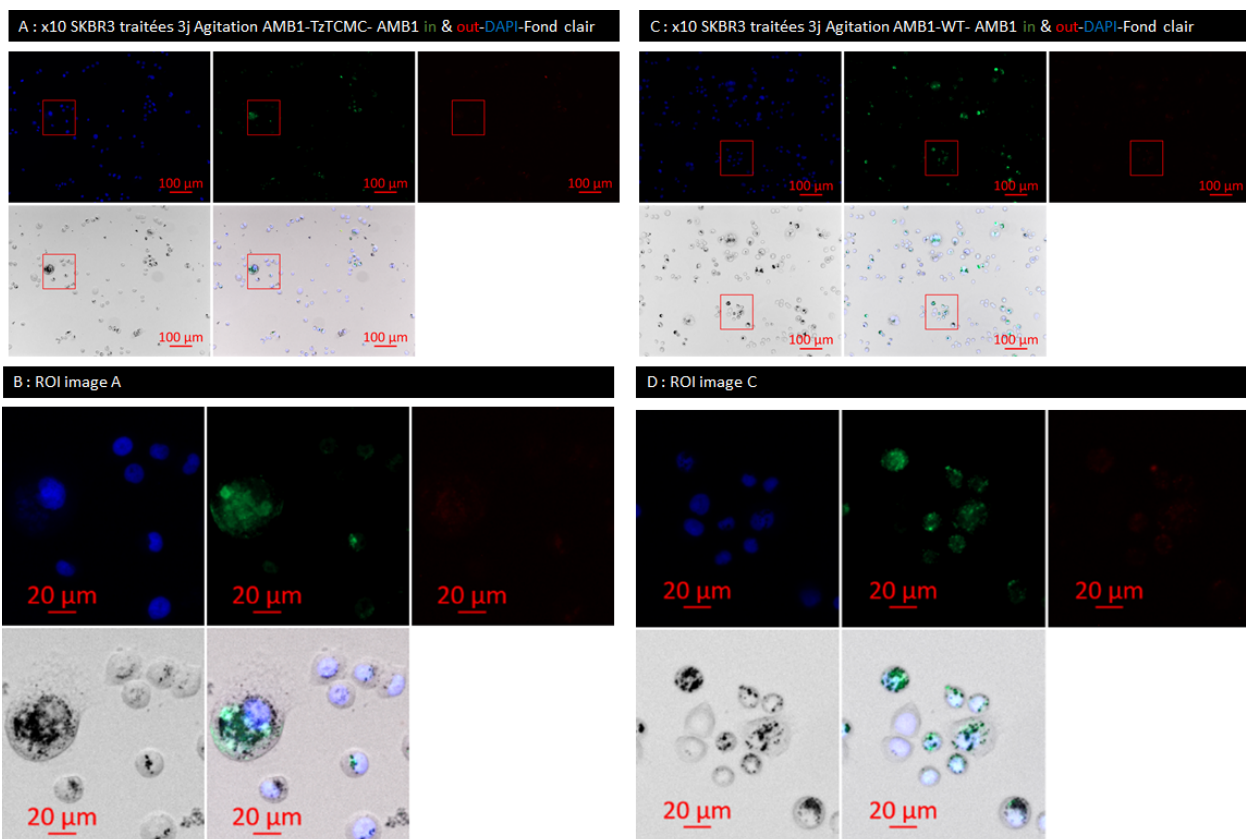


FIG. 3.12 – Incubation des cellules SKBR3 avec les magnétosomes AMB1-WT et AMB1-TzTCMC, 3 jours sous agitation, $500 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$, grossissement x10

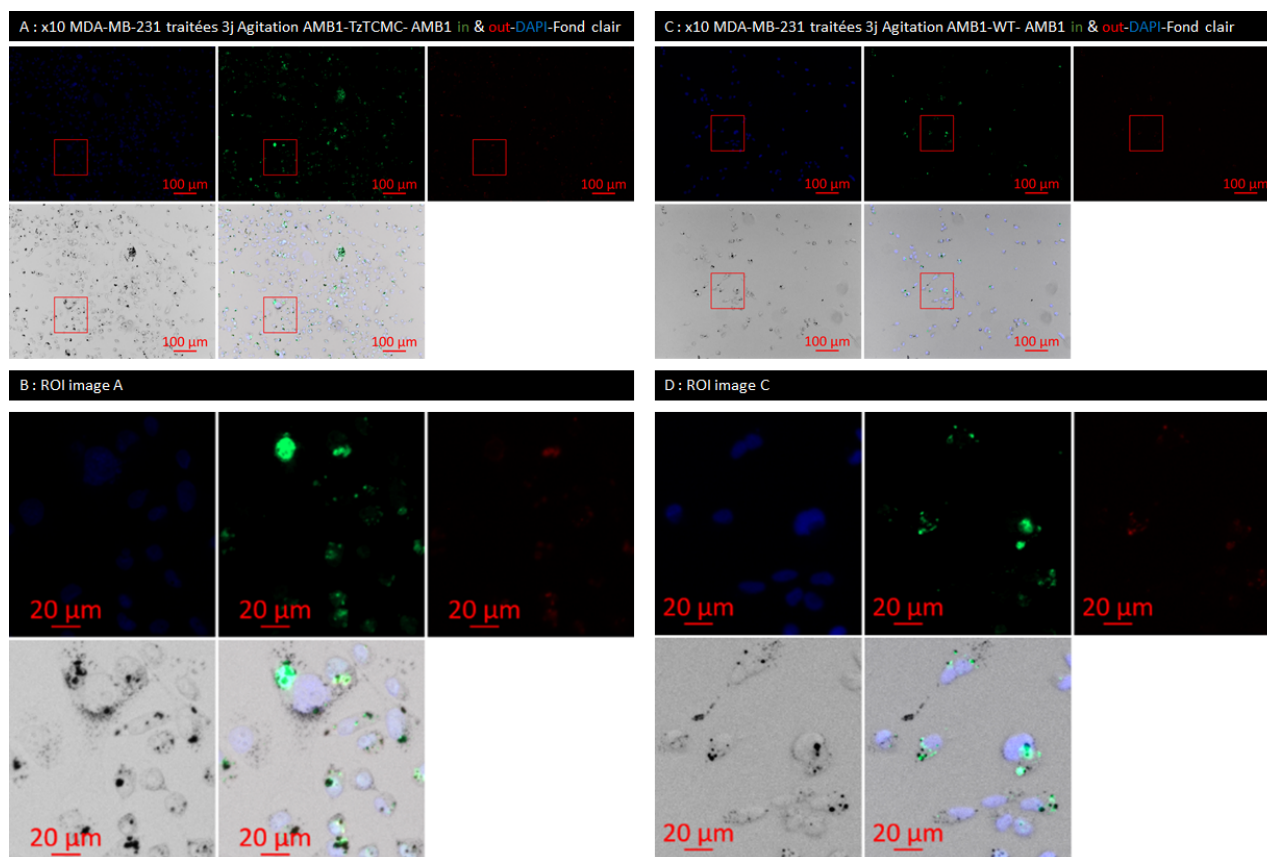


FIG. 3.13 – Incubation des cellules MDA-MB-231 avec les magnétosomes AMB1-WT et AMB1-TzTCMC, 3 jours sous agitation, $500 \mu\text{g}_{\text{Fe}}/\text{L}$, grossissement x10

Ces figures sont à comparer avec la Figure 3.14 réalisée à partir des données des études cinétiques précédentes, sans agitation, à la concentration de $500 \mu\text{g}_{\text{Fe}}/\text{L}$ à 72 heures. Ces images permettent de confirmer que sous agitation l'incorporation des magnétosomes au cours du temps est plus élevée qu'en incubation classique, statique.

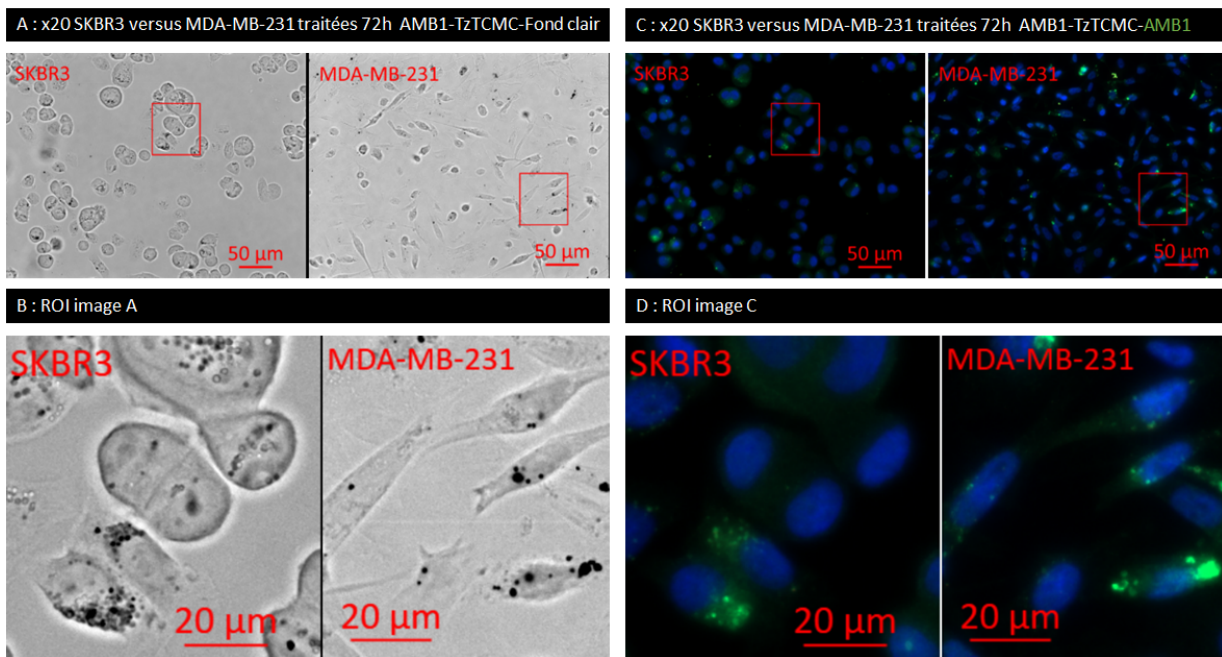


FIG. 3.14 – Incubation des cellules SKBR3 et MDA-MB-231 avec les magnétosomes AMB1-TzTCMC, 72h, $500 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$, en condition statique, grossissement x20

Lors du projet Mefisto, nous avons remarqué que les magnétosomes s'incorporaient mieux en les ajoutant en plusieurs fois. Nous avons donc réalisé un essai de traitements multiples sur les cellules SKBR3, à deux concentrations 100 et $1000 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$. Les magnétosomes AMB1-TzTCMC sont ajoutés en trois fois sous agitation, en les laissant en incubation 3 à 4 jours entre deux ajouts.

La Figure 3.15 illustre l'incorporation au cours du temps et des ajouts des magnétosomes. À la concentration de $100 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$, les magnétosomes s'incorporent de plus en plus au fil des traitements. À la concentration de $1000 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$, les magnétosomes sont déjà très nombreux au premier traitement, l'augmentation de l'incorporation est cependant visible après le deuxième traitement. Au troisième ajout, les cellules sont saturées de magnétosomes, mais le nombre de cellules a diminué fortement.

La perte cellulaire peut provenir d'un effet cytotoxique des magnétosomes, mais aussi simplement être due à une moindre résistance aux lavages, liée à la surcharge des cellules. Un immunomarquage anti-AMB1 a été réalisé mais la fluorescence observée est beaucoup plus faible que l'image en fond clair (résultat non montré), sans doute en raison d'une dégradation de la membrane des magnétosomes, comme déjà observé précédemment.

Les cellules SKBR3 et MDA-MB-231 ont ensuite été incubées avec l'anticorps Trastuzumab (ref. MAB9589) ou l'anticorps Trastuzumab couplé TCMC fourni par OranoMed. Un anticorps anti-Trastuzumab produit chez la souris (ref. MAB9547) et un anticorps anti-Trastuzumab produit chez le lapin (MAB95471) ont permis de révéler l'anticorps Trastuzumab sur les cellules SKBR3 et MDA-MB-231. Deux anticorps différents ont été utilisés car les cellules MDA-MB-231 réagissent de façon non spécifique à l'anticorps secondaire anti-souris, le MAB9547 n'est donc pas utilisable avec ces cellules (résultat non montré).

La Figure 3.17 illustre la fixation de l'anticorps Trastuzumab sur les cellules SKBR3 et MDA-MB-231. Un réhaussement significatif de la fluorescence est observé sur les cellules incubées avec l'anticorps Trastuzumab couplé TCMC par rapport à l'anticorps Trastuzumab non couplé.

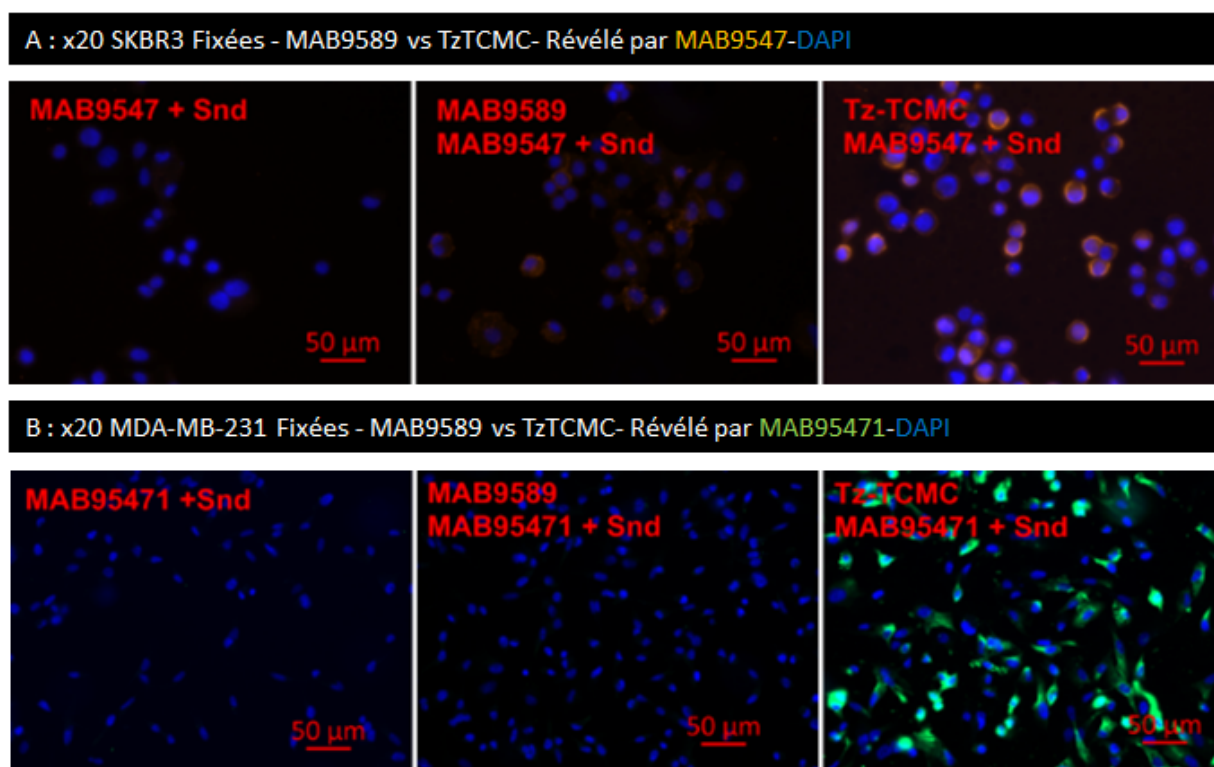


FIG. 3.17 – Immunomarkage par l'anticorps anti-Trastuzumab des cellules SKBR3 et des cellules MDA-MB-231 avec l'anticorps Trastuzumab seul et couplé TCMC, grossissement x20

Ces images ont révélé un effet important du chélateur TCMC, capable de se fixer à la membrane des cellules MDA-MB-231 et SKBR3. Cette propriété du chélateur augmente les possibilités de fixation de l'anticorps couplé, par rapport à l'anticorps non couplé.

3.3.2 Culture cellulaire en 3D

Les modèles cellulaires en 3D sont de plus en plus utilisés pour tester des molécules d'intérêt, ainsi que décrit au Paragraphe 4.1 du Chapitre Projet 3D. Les interactions cellulaires en 3D sont extrêmement importantes et permettent aux cellules de mieux résister aux molécules cytotoxiques. Il m'a paru intéressant de développer des modèles en 3D afin de tester l'incorporation des magnétosomes dans ces conditions.

Au vu des résultats obtenus par des traitements multiples sur des modèles cellulaires en 2D, il m'a aussi paru intéressant de traiter plusieurs fois les sphéroïdes, afin de déterminer si les cellules saturent ou bien s'il est possible de "charger" plus les sphéroïdes en magnétosomes au cours du temps. Le développement des méthodes de culture cellulaire en 3D est présenté dans le Chapitre Projet 3D, Paragraphe 4.2.

Le modèle choisi a consisté en la préparation de microsphéroïdes générés par culture sous agitation, en matériel standard (flacons de culture non adhérents). Ce modèle est simple à mettre en œuvre et permet d'obtenir des sphéroïdes denses, sauf dans le cas des SKBR3 qui ne s'agglutinent que par quelques cellules. Les sphéroïdes de cellules SKBR3, MDA-MB-231, A431 et MCF12a sont traités avec des magnétosomes à $1000 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$, sous agitation, trois jours répétés trois fois.

La Figure 3.18 (fond clair, image A et immunomarquage anti-AMB1, image B) et la Figure 3.19 (coloration Perl's) montrent l'incorporation de magnétosomes AMB1-WT et AMB1-TzTCMC dans les sphéroïdes de cellules SBR3, MDA-MB-231, MCF12a et A431, traités sous agitation $1000 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$, trois jours, répétés trois fois.

Ces Figures montrent que toutes les lignées ont incorporé les magnétosomes, conjugués ou non. Comme déjà observé avec des modèles de culture cellulaire en 2D, le contenu en fer (fond clair ou coloration Perl's) est plus important que l'immunomarquage par l'anticorps anti-AMB1.

Les magnétosomes conjugués et non conjugués pénètrent encore mieux dans les modèles cellulaires en 3D sous agitation que dans les modèles cellulaires en 2D, pour toutes les lignées. Les cellules positives pour HER2, SKBR3 (+++) et A431 (++) montrent une forte incorporation des magnétosomes conjugués au cours du temps, mais c'est également le cas des cellules négatives pour HER2 (MDA-MB-231 et MCF-12a).

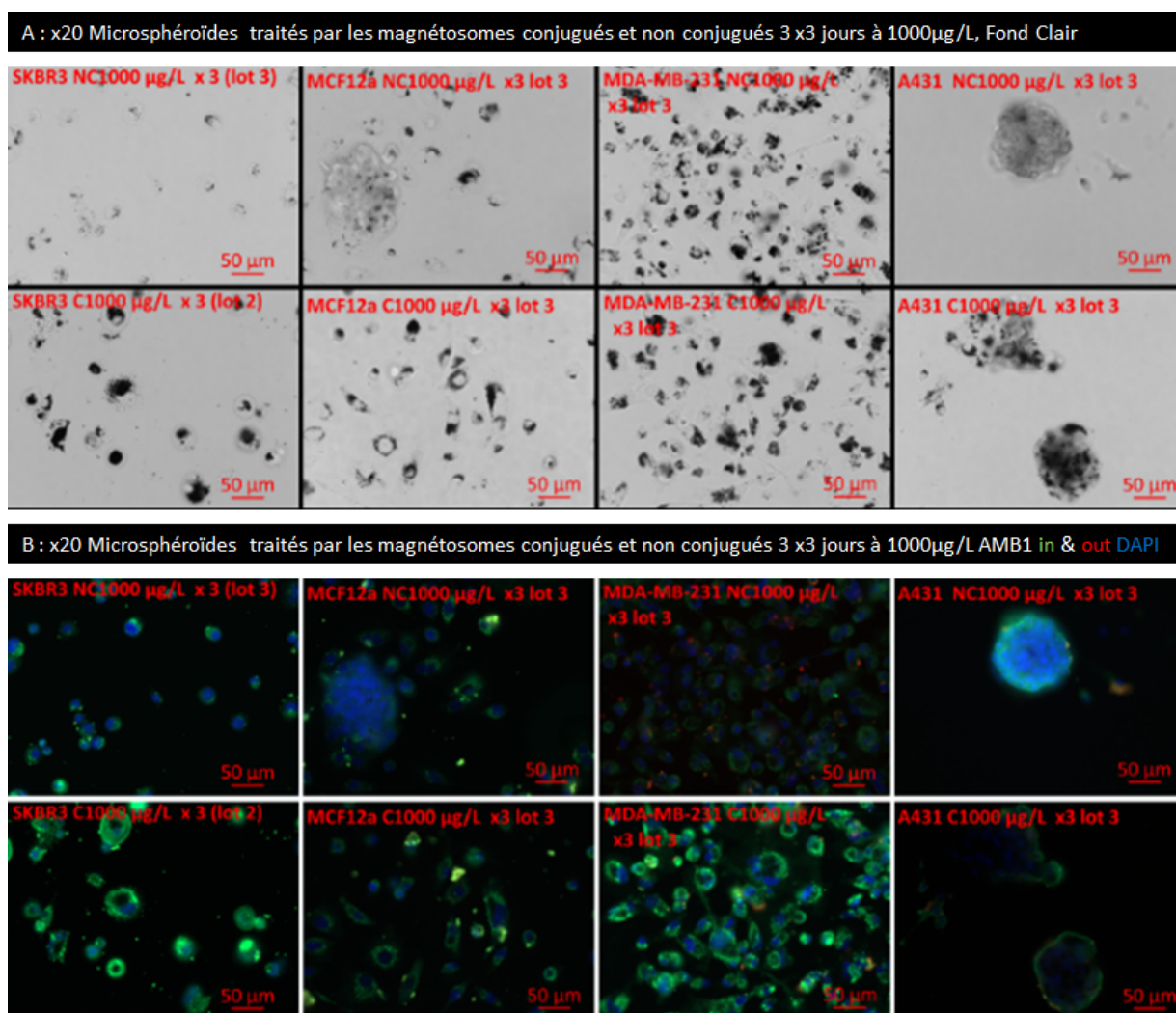


FIG. 3.18 – Sphéroïdes de cellules SKBR3, MDA-MB-231, MCF12a et A431, traités avec les magnétosomes conjugués et non conjugués, immunomarquage anti-AMB1, grossissement x20

La Figure 3.20 illustre la différence observée sur les cellules SKBR3 en fonction du lot de magnétosomes et des conditions d'incubation. En effet, les cellules SKBR3 traitées avec les magnétosomes issus du lot 2 ont montré une charge en fer très importante, mais un grand nombre de cellules s'était décollé des boîtes lors des rinçages. Lors de l'essai suivant, avec le lot 3, les cellules ont étéensemencées plus denses, limitant l'incorporation par cellule mais permettant de conserver les cellules sur les boîtes. Les cellules incubées avec le lot 3 ont incorporé les magnétosomes de façon importante mais sans les surcharger au point de se décoller lors des rinçages.

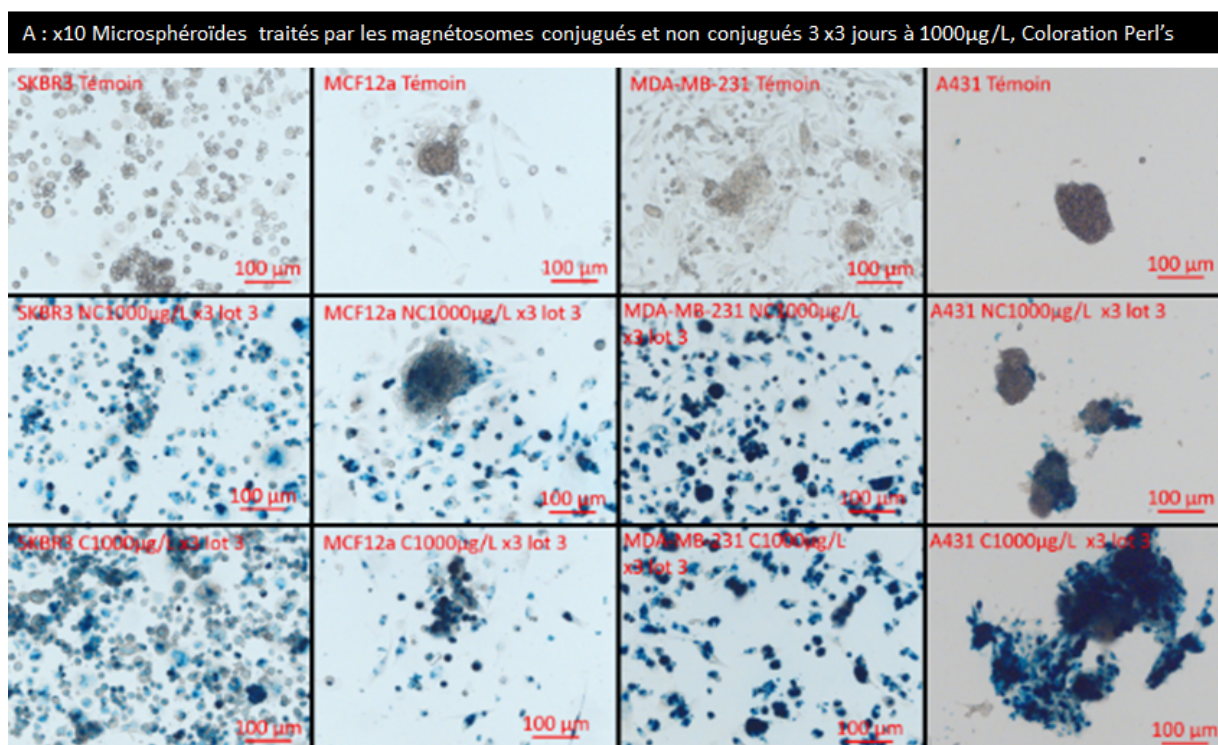


FIG. 3.19 – Sphéroïdes de cellules SBR3, MDA-MB-231, MCF12a et A431, non traités versus traités avec les magnétosomes conjugués et non conjugués, coloration Perl's, grossissement x10

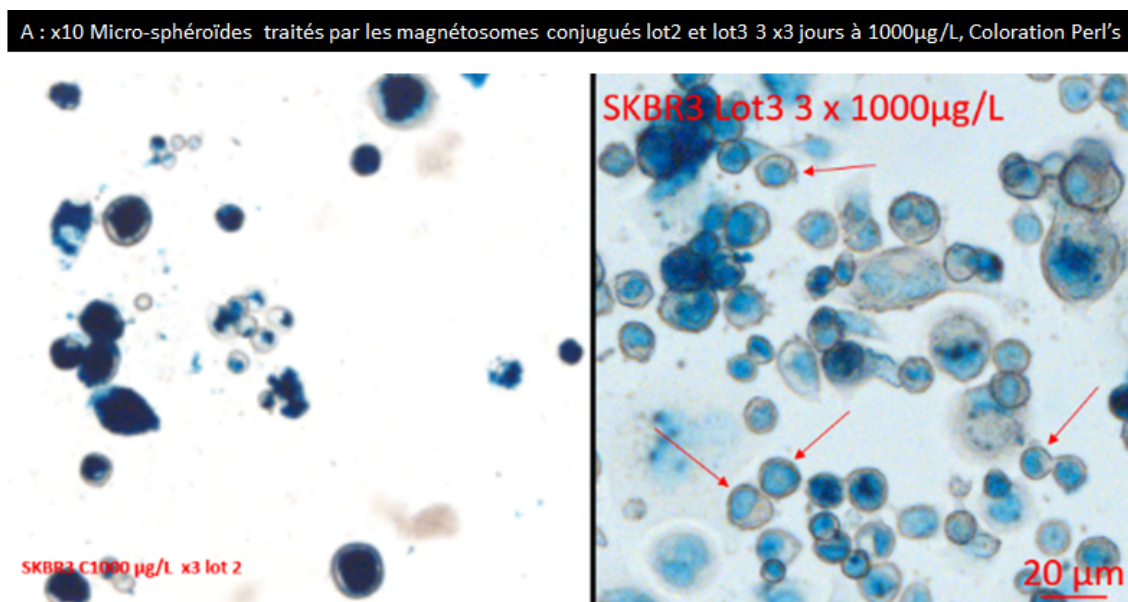


FIG. 3.20 – Sphéroïdes de cellules SKBR3, traités avec les magnétosomes conjugués, coloration Perl's, comparaison des lots 2 et 3 sur les cellules SKBR3, ROI d'images à x10

La Figure 3.21 compare des régions d'intérêt des boîtes ensemencées avec les lignées SKBR3 (HER2+++) et MDA-MB-231 (HER2-), incubées dans les mêmes conditions, avec le lot 3. Il est intéressant de noter que les cellules SKBR3 semblent avoir incorporé du fer dans les noyaux (flèches rouges) beaucoup plus que les cellules MDA-MB-231 qui semblent maintenir une grande partie des magnétosomes à la membrane (flèches vertes).

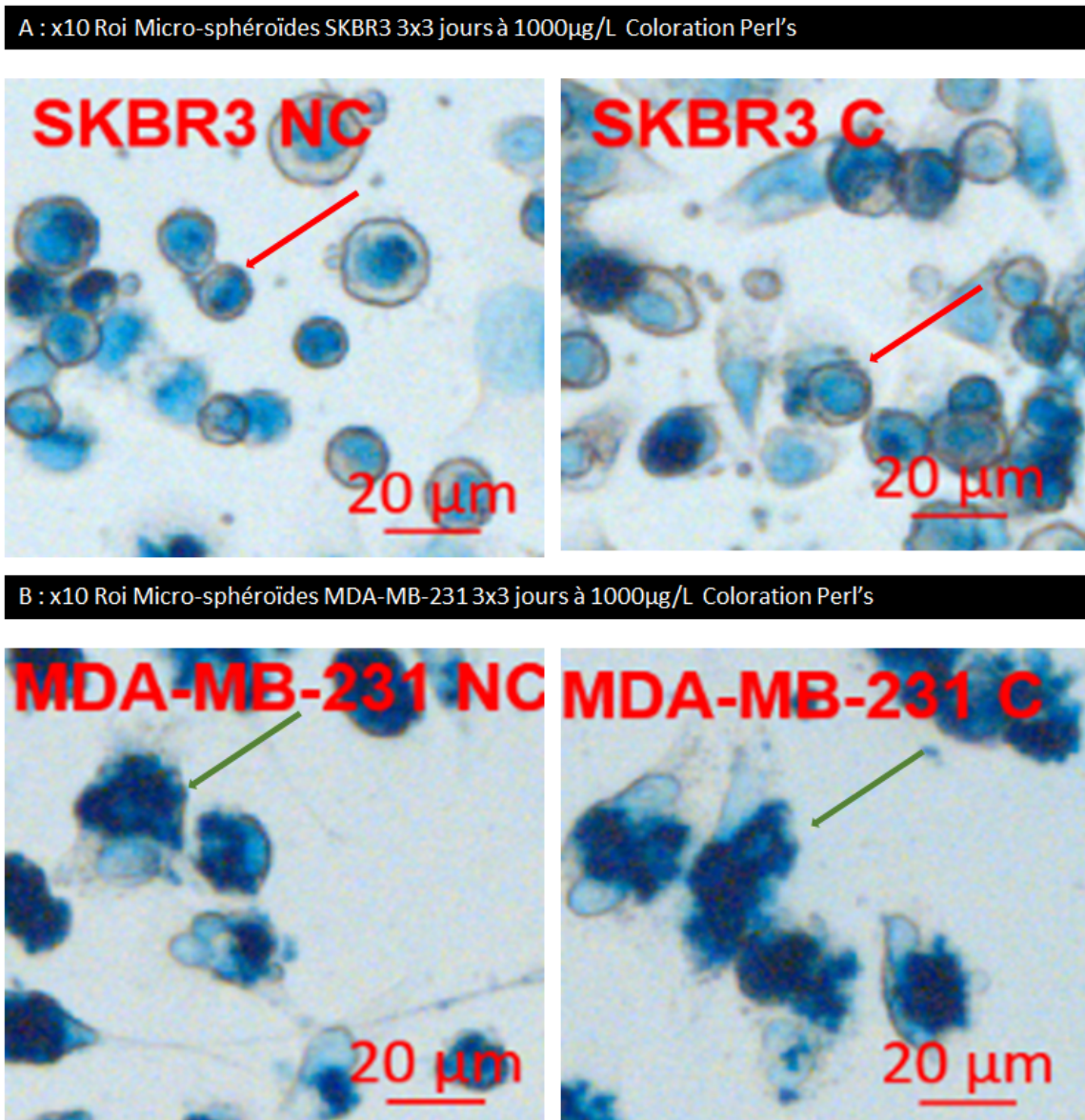


FIG. 3.21 – ROI des images de sphéroïdes de cellules SKBR3 (A) et de sphéroïdes de cellules MDA-MB-231(B) traités avec les magnétosomes conjugués AMB1-TZTCMC, coloration Perl's, grossissement x10

Comme le montre la Figure 3.18, les cellules A431 montrent une bien meilleure incorporation des magnétosomes conjugués par rapport aux magnétosomes non conjugués, c'est également le cas des cellules MCF12a. Un autre essai a été mené dans les mêmes conditions sur les cellules A431, pour comparer l'incorporation des magnétosomes conjugués ou non conjugués, en multitraitements à faible concentration $100 \mu\text{g}_{\text{Fe}}/\text{L}$.

La Figure 3.22 illustrant la quantité de fer révélée par la coloration Perl's, sur des sphéroïdes de cellules A431, montre la différence d'incorporation des magnétosomes AMB1-WT et AMB1-TzTCMC. Les magnétosomes conjugués s'accumulent dans les sphéroïdes au cours du temps, alors que les magnétosomes non conjugués sont toujours très peu nombreux après trois traitements.

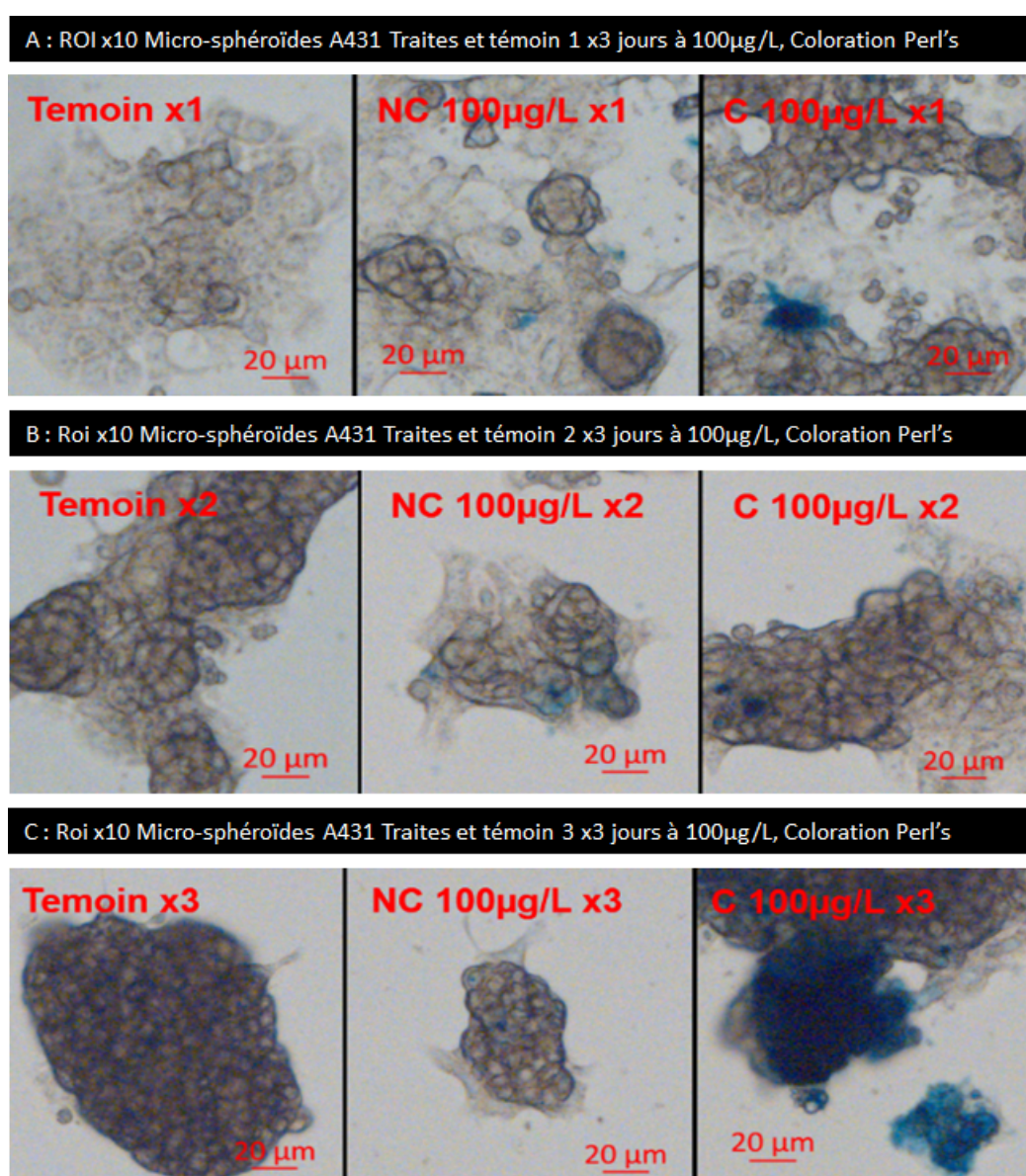


FIG. 3.22 – Coloration Perl's sur des sphéroïdes de cellules A431, traités par les magnétosomes à $100 \mu\text{g}_{\text{Fe}}/\text{L}$, ROI d'images présent à un grossissement x10

Les conclusions de ces études *in vitro* sont donc :

- En culture cellulaire en 2D, les magnétosomes conjugués et non conjugués sont incorporés dans les lignées de cancer de sein SKBR3 (HER2+++) et MDA-MB-231 (HER2-), de façon non spécifique.
- En culture cellulaire en 2D, les magnétosomes conjugués ciblent plus spécifiquement des cellules de cancer de peau A431 (HER2++).
- En culture cellulaire en 2D, l'incorporation non spécifique n'est pas liée à la nature mammaire ou tumorigène des cellules, car les MCF7 n'en incorporent que très peu alors que les cellules MCF12a en incorporent beaucoup.
- En culture cellulaire en 2D et en 3D le traitement réalisé sous agitation permet une incorporation encore augmentée en utilisant des traitements multiples.
- En culture cellulaire en 2D, l'anticorps Trastuzumab couplé TCMC se fixe à la membrane des cellules MDA-MB-231 bien qu'elles n'expriment pas le récepteur HER2, le TCMC est donc capable de se fixer sur les membranes cellulaires.
- En culture cellulaire en 3D, les magnétosomes conjugués sont incorporés dans toutes les lignées mais les cellules positives à HER2 semblent en incorporer un peu plus, surtout les A431.
- Les résultats *in vitro* obtenus sur des cultures cellulaires 2D et 3D indiquent que le traitement anti-HER2 peut être apporté aux cellules HER2+++ par les magnétosomes.

3.4 Résultats *in vivo*

3.4.1 Modèle tumoral

Bien que les résultats *in vitro* soient mitigés du fait du manque de spécificité des magnétosomes conjugués sur les lignées de cancer du sein, il a été décidé de vérifier *in vivo* si les magnétosomes peuvent être utilisés pour cibler les tumeurs HER2+. Les deux lignées exprimant le plus les récepteurs HER2 *in vitro*, SKBR3 et A431, ont donc été utilisées pour développer des modèles *in vivo* au laboratoire.

La lignée A431 a été préférée en première instance, du fait de la meilleure spécificité des magnétosomes conjugués sur cette lignée, ainsi que de son potentiel tumorigène plus élevé. Les modèles de cancer du sein développés avec la lignée SKBR3 pour le projet sont présentés au chapitre Projet 3D (Paragraphe 4.6.3). Les cellules SKBR3 sont faiblement tumorigènes [Holliday et Speirs, 2011], formant des tumeurs de petites tailles [Singhal *et al.*, 2018], avec une croissance lente même si elles expriment fortement les récepteurs HER2.

Brièvement, pour le modèle A431 les cellules cultivées comme décrit à l'Annexe A.3.5 sont prélevées et une suspension cellulaire de cellules est préparée en Matrigel[™] 50% et gardée sur glace jusqu'à l'implantation. Différentes conditions d'implantation ont été testées, avec et sans anesthésie, en injectant 5 millions ou 2,5 millions de cellules, sur un modèle de souris NMRI nude femelle. Les animaux sont soit non anesthésiés, soit anesthésiés à la xylazine/ké-tamine (10/100 mg/kg, 10 ml/kg), puis l'implantation est réalisée par injection sous-cutanée, avec fermeture du point d'injection à la colle chirurgicale. Les tumeurs ont été mesurées avec un pied à coulisse et le volume tumoral est estimé par la formule $(\text{longueur} \times \text{largeur}^2)/2$.

La Figure 3.23 montre la croissance des tumeurs au cours du temps, tous lots confondus, la Figure B.13 présentée en Annexe B.10 montrant la croissance de chaque tumeur par groupe.

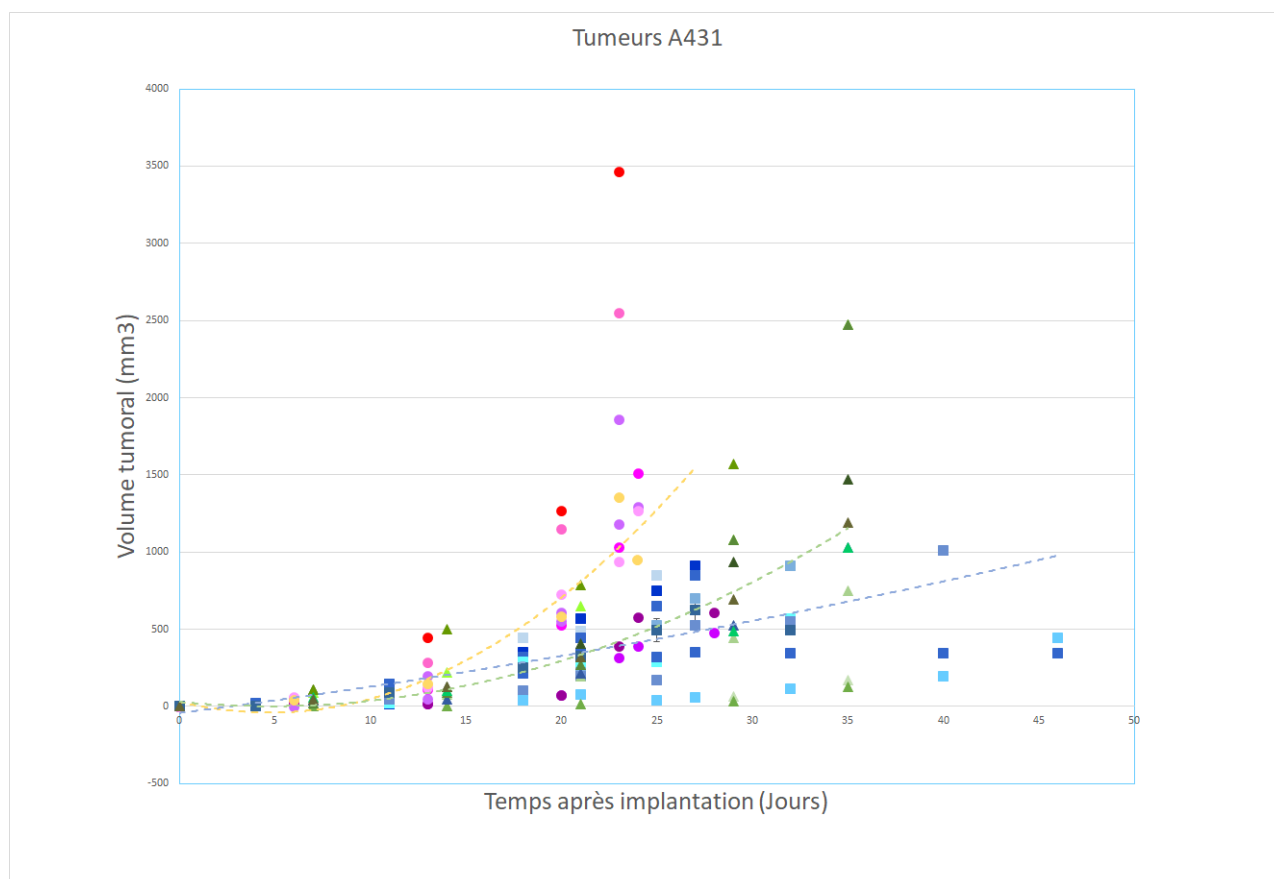


FIG. 3.23 – Croissance des tumeurs A431, trois conditions d'implantation : lot 1 \circ (5 millions de cellules implantées sans anesthésie), lot 2 \square (5 millions de cellules implantées sous anesthésie), lot 3 \triangle (2,5 millions de cellules implantées sous anesthésie), des courbes de tendances pour chaque conditions sont représentées lot 1 (courbe jaune), lot 2 (courbe verte) et lot 3 (courbe bleue)

Le premier essai d'implantation de 5 millions de cellules, réalisé sans anesthésie, montre une disparité importante de croissance tumorale entre les animaux, ainsi qu'une croissance fortement exponentielle après 20-25 jours pour un tiers des animaux, réduisant fortement la fenêtre temporelle d'utilisation des tumeurs pour des acquisitions l'IRM.

Le second essai d'implantation de 5 millions de cellules a été réalisé sous anesthésie pour optimiser le placement par rapport au foie : les tumeurs ont eu une croissance moins rapide mais plus homogène. La position de la tumeur par rapport au foie a son importance, du fait de la captation très rapide des magnétosomes par le foie. Sur les images IRM, le foie apparaît complètement noir après injection. Si la tumeur est positionnée trop près du foie, il devient difficile de la distinguer du tissu hépatique, mais il est également intéressant de pouvoir confirmer le passage des magnétosomes dans le flux sanguin après injection en ayant une image du foie. Les tumeurs atteignent un volume important à partir de 20-25 jours après implantation, la position sur l'animal permettant de l'installer sans contrainte dans le lit du scanner IRM, et de réaliser des images IRM combinant la visualisation de la tumeur et du foie.

La différence de croissance tumorale entre les deux lots peut être due à plusieurs facteurs. La première hypothèse est que les cellules, quoique présentant un taux de viabilité supérieur à 95 pourcents, n'avaient pas tout à fait la même vitesse de croissance. La deuxième hypothèse est liée à l'anesthésie, qui réduit le stress et la température de l'animal, ce qui peut jouer sur la croissance tumorale. Un troisième test a été effectué sous anesthésie, en injectant 2,5 millions de cellules, afin de comparer la croissance avec une implantation de 5 millions de cellules. En effet, selon les modèles, il est parfois contre-productif d'implanter une concentration trop importante de cellules. Cette implantation de 2,5 millions de cellules permet d'obtenir une croissance similaire à celle obtenue lors du deuxième essai, avec dans les deux cas la même disparité de croissance (2/9 tumeurs ont une croissance ralentie). Ces souris, tous lots confondus, ont été utilisées pour acquérir des premières images IRM.

3.4.2 Résultats IRM *in vivo*

Une première étude a consisté à injecter les magnétosomes conjugués, sans plomb, à des souris saines, afin d'évaluer si la conjugaison apportait un changement dans la biodistribution dans le corps ou une toxicité liée à la conjugaison par l'anticorps et le TCMC, par rapport aux données déjà obtenues lors du projet Mefisto. Cette première étude a confirmé que la biodistribution des magnétosomes conjugués par le Trastuzumab-TCMC est identique à celle des magnétosomes non conjugués. Les paramètres d'imagerie sont décrits en Annexe B.11, avec la Figure B.15 qui illustre la biodistribution dans le foie et la rate. Aucune toxicité n'a été identifiée après 48 heures.

Puis des souris porteuses de tumeurs ont été utilisées. Le modèle A431 a été préféré pour la première étude IRM, du fait de sa croissance plus rapide. Les tumeurs avant injection montrent une hétérogénéité interne, des zones d'œdèmes ou de nécrose semblant occuper le centre des tumeurs les plus volumineuses, comme le montre la Figure B.16 en Annexe B.11.

Les magnétosomes non conjugués, conjugués-Trastuzumab-TCMC et conjugués-Trastuzumab-TCMC-Plomb non radioactif ont été ensuite injectés par voie intraveineuse à la concentration prévue de 200 $\mu\text{mol}/\text{kg}$, chez des souris NMRI nude femelles porteuses de tumeurs A431 ($n=2$

pour chaque type de magnétosomes).

La Figure B.17 à l'Annexe B.11 résume les traitements apportés à chaque animal, ainsi que le volume tumoral mesuré avant l'injection.

La Figure 3.24 illustre le réhaussement du signal IRM obtenu en injectant les magnétosomes conjugués Trastuzumab-TCMC et Trastuzumab-TCMC-Plomb, versus les magnétosomes non conjugués, dans les tumeurs (flèches bleues). Cette figure illustre également le fort réhaussement du signal IRM hépatique (flèches rouges), le foie étant la voie d'élimination du fer dans l'organisme. Le réhaussement a été observé dès les premières minutes après l'injection. À noter que la suspension de magnétosomes conjugués avec le plomb est plus visqueuse que la suspension sans plomb. Cette viscosité entraîne une difficulté supplémentaire à l'injection.

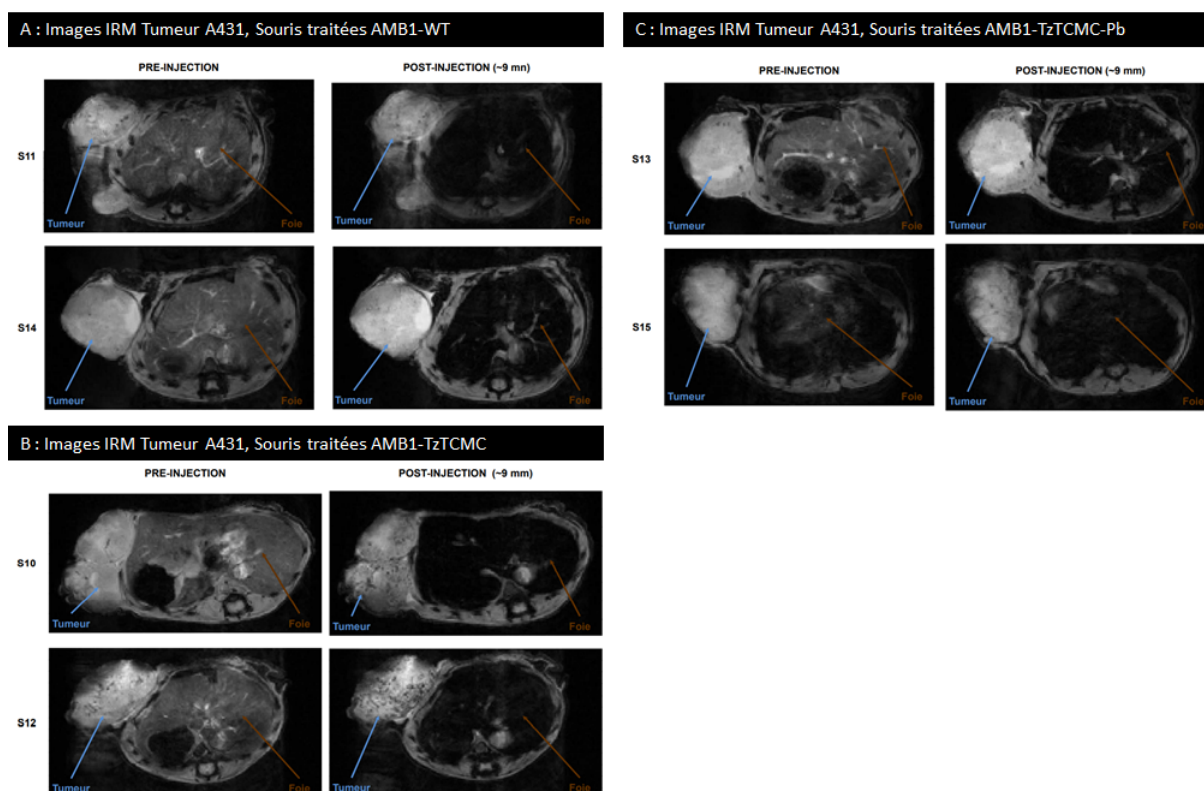


FIG. 3.24 – Acquisitions IRM sur des souris porteuses de tumeur A431 après injection des magnétosomes AMB1-WT (A), des magnétosomes AMB1-TzTCMC (B) ou des magnétosomes AMB1-TzTCMC-Pb (C)

Les premiers résultats IRM montrent une différence de réhaussement du signal dans la zone tumorale entre les animaux traités par les magnétosomes non conjugués (pas de réhaussement, image A) et les animaux traités par les magnétosomes conjugués Trastuzumab-TCMC (réhaussement important, image B) et Trastuzumab-TCMC-Plomb (réhaussement plus faible, image C). Ce réhaussement limité pour les animaux traités avec les magnétosomes conjugués Trastuzumab-TCMC-Plomb est le signe d'un effet de la présence du plomb.

Parmi les hypothèses envisagées, nous avons identifié la taille des magnétosomes conjugués-Pb, supérieure à celle des non conjugués, ce qui peut entraîner un passage plus faible de la barrière hémato-tumorale, la viscosité supérieure des solutions conjuguées-Pb ou encore l'accès aux récepteurs HER2 plus difficile dû à la présence du Plomb. Une différence notable entre les lots de souris implantées à 2,5 et 5 millions de cellules a également été observée, le réhaussement étant plus important sur les souris implantées avec 5 millions de cellules, à taille de tumeur égale.

À la fin de l'étude, les animaux sont euthanasiés par exsanguination-perfusion (voir protocole décrit en Annexe B.4), pour prélever les organes d'intérêt pour des études histologiques.

Les conclusions de cette étude sont donc :

- Réhaussement du signal IRM après injection des magnétosomes conjugués Trastuzumab-TCMC par rapport aux magnétosomes WT, sur le modèle A431 (n=4), signal néanmoins hétérogène dans les tumeurs et entre les tumeurs.
- Réhaussement du signal IRM après injection des magnétosomes conjugués Trastuzumab-TCMC plus élevé que celui obtenu par les magnétosomes conjugués Trastuzumab-TCMC-Pb sur le modèle A431 (n=4). La viscosité accrue de la suspension des magnétosomes conjugués Trastuzumab-TCMC-Pb peut en être la cause.

3.5 Résultats *ex vivo*

Les pièces anatomiques conservées à -80°C sont utilisées pour réaliser des études histologiques, après découpe au cryostat. Les études histologiques ont pour but de déterminer la structure interne des tumeurs (hétérogènes en IRM), notamment la quantité de vaisseaux sanguins et de cellules HER2+, ainsi que leur répartition dans le volume tumoral. L'histologie permet également de visualiser si les magnétosomes ont bien ciblés les cellules HER2+. Les magnétosomes peuvent être révélés par l'anticorps anti-AMB1 ou par l'anticorps anti-Trastuzumab utilisé *in vitro*.

Plusieurs immunomarquages ont été réalisés sur les tumeurs A431. Les protocoles sont décrits en Annexe B.5. La Figure 3.25 illustre la présence du récepteur HER2 dans les cellules tumorales *in vivo*, ainsi que la structure interne des tumeurs. Les cellules HER2+ sont en effet regroupées en structures alvéolaires arrondies, avec un espace vide de cellules au centre. Ces alvéoles sont entourées de cellules n'exprimant pas HER2, probablement du tissu murin. La taille des tumeurs est comprise entre 1000 et 2000 mm^3 , mais seule une partie du volume tumoral contient des cellules HER2+, essentiellement en périphérie.

Au centre de chaque tumeur on peut observer une zone nécrotique/œdémateuse plus ou moins étendue, avec peu de cellules (visualisées par le marquage des noyaux avec le colorant nucléaire Hoechst 33342).

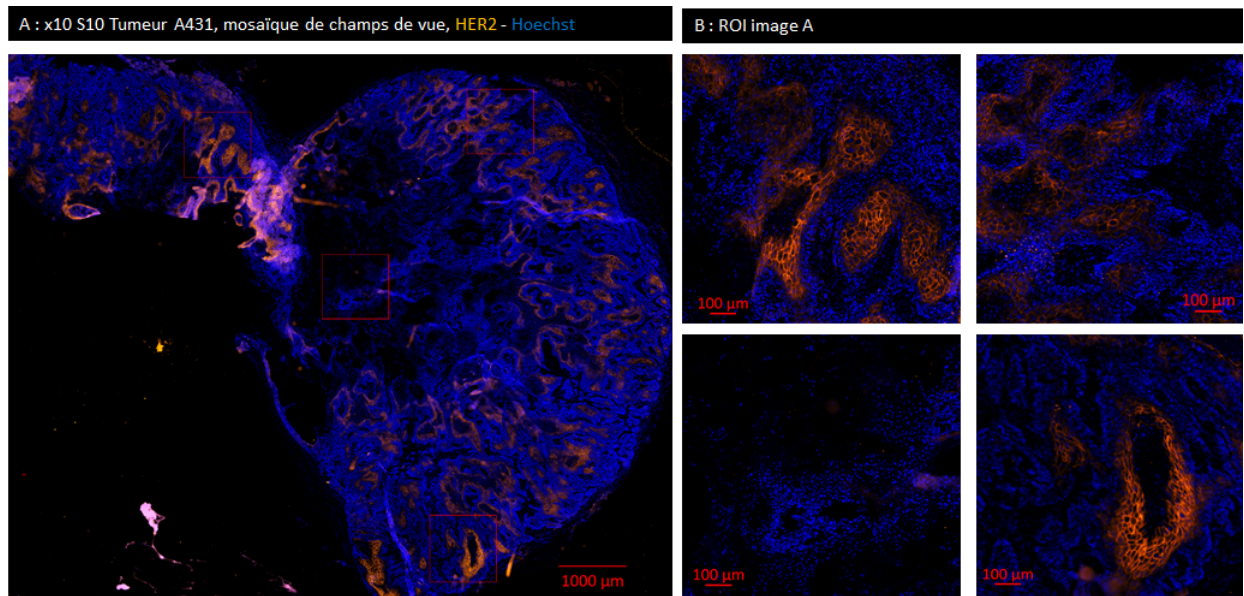


FIG. 3.25 – Immunomarquage avec un anticorps anti-HER2 sur une coupe de tumeur A431, grossissement x10

La Figure 3.26 illustre la vascularisation des tumeurs A431 (implantation à 5 millions de cellules). Les vaisseaux sanguins sont révélés par l'anticorps anti-CD31 déjà utilisé lors du projet Mefisto. Les vaisseaux sont de différentes tailles, allant du diamètre de capillaires (5 à 30 µm) à celui de veinules ou d'artérioles (50 à 100 µm). Ils sont regroupés en périphérie, le centre de la tumeur étant peu vascularisé.

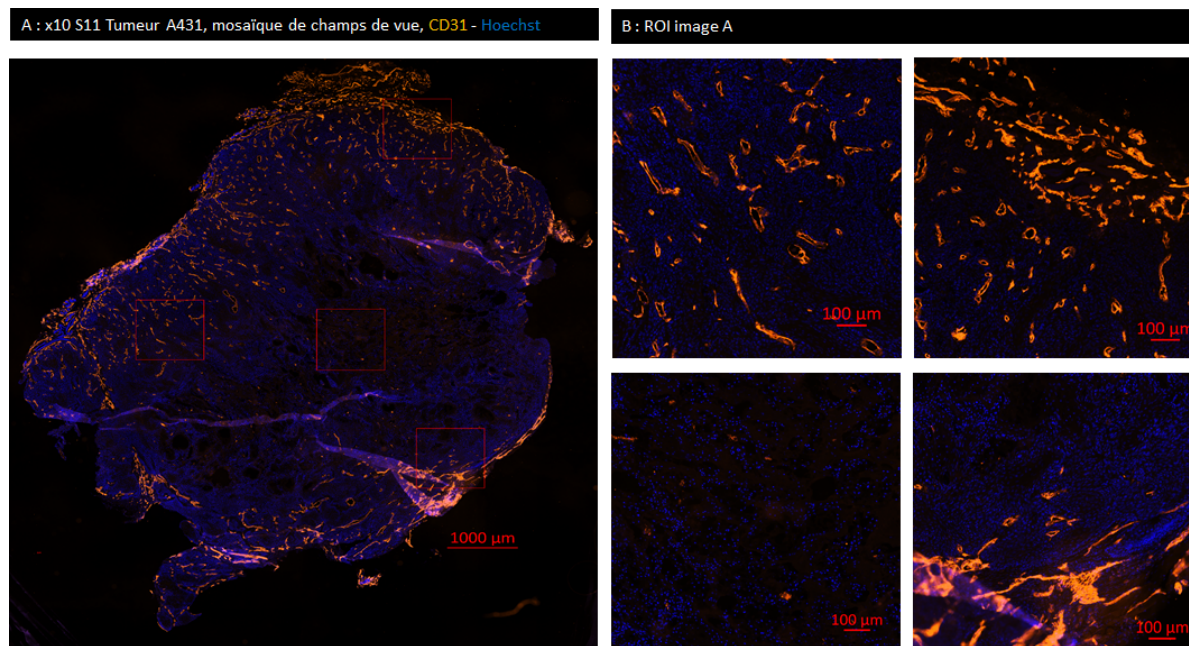


FIG. 3.26 – Immunomarquage avec un anticorps anti-CD31 sur une coupe de tumeur A431, grossissement x10

Le manque de vaisseaux sanguins au centre limite l'accès des magnétosomes à cette zone. Ces images confirment l'hypothèse de zones d'œdèmes/nécrose importantes dans ces tumeurs. La partie active est donc limitée à la périphérie, réduisant la zone d'intérêt. De plus, la résolution des images IRM 200 x 200 x 600 μm ne permet pas de voir beaucoup de détails. Un stade tumoral plus précoce permettrait peut-être d'éviter cette configuration, qui dilue l'effet des magnétosomes et complique l'analyse IRM.

La Figure 3.27 qui combine les marquages d'HER2 et CD31, montre que les vaisseaux et les cellules tumorales sont relativement éloignés les uns des autres. En effet, les vaisseaux sanguins sont retrouvés dans les zones de cellules HER2- (murines), entourant les alvéoles de cellules HER2+. Cette configuration a pour conséquence d'ajouter de la distance entre les cellules tumorales et les magnétosomes passant la barrière hémato-tumorale.

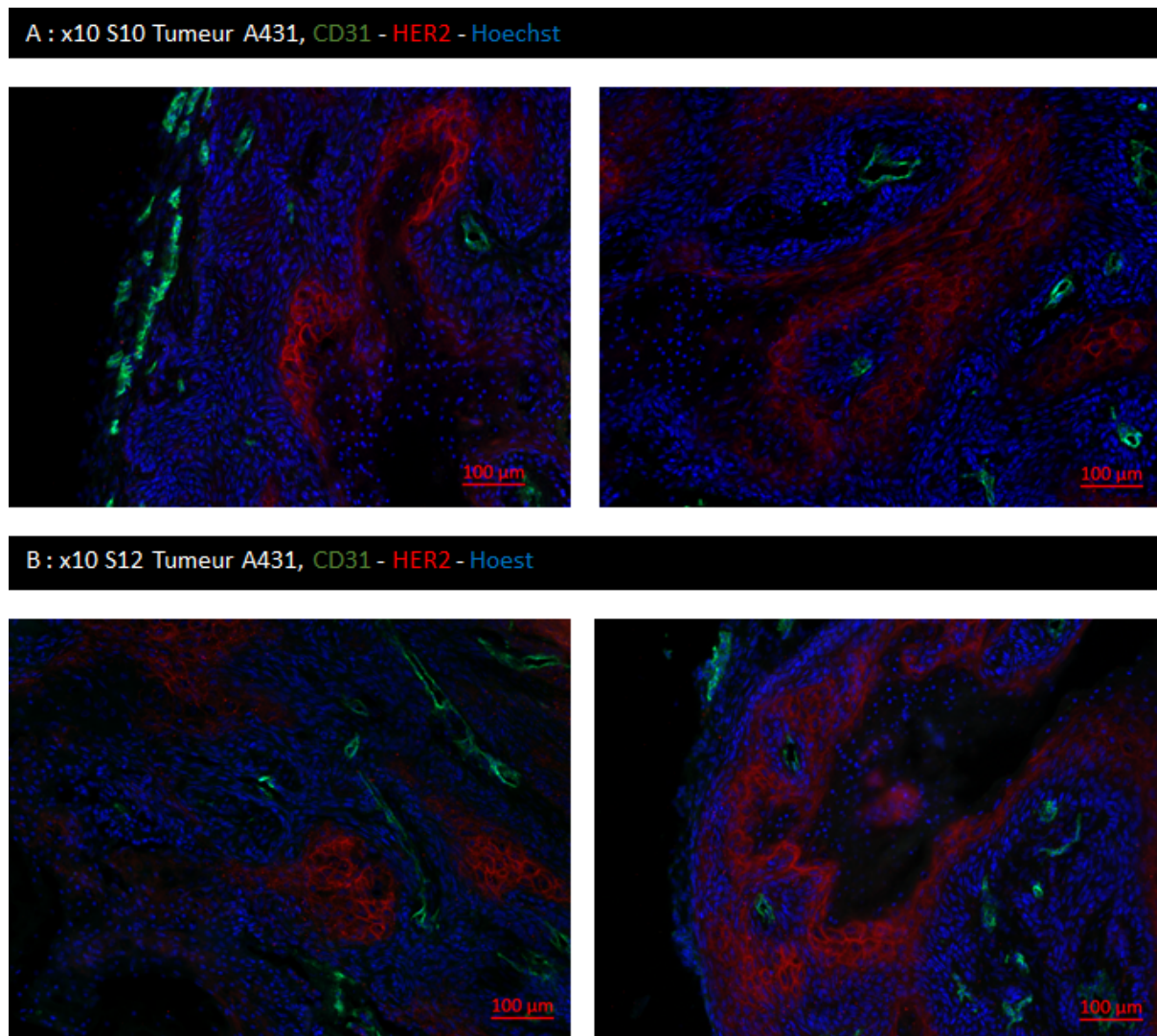


FIG. 3.27 – Double immunomarquage avec des anticorps anti-HER2 et anti-CD31 sur une coupe de tumeur A431, grossissement x10

Cette configuration limite l'intérêt du modèle pour l'évaluation de l'incorporation des magnétosomes à court terme, l'accès aux cellules HER2+ n'étant pas immédiat. Les tumeurs issues d'une implantation à 2,5 millions de cellules, quoique d'un volume similaire à celles obtenues avec une implantation de 5 millions, montrent une diminution importante du nombre de cellules HER2+ en alvéoles, mais également des vaisseaux sanguins moins bien formés, souvent limités à un amas de cellules endothéliales pas encore bien organisées en vaisseaux sanguins, plus diffus, d'un diamètre plus petit atteignant rarement 50 μm (voir Figure B.14 en Annexe B.10). Les zones de nécroses/œdèmes sont tout autant importantes dans les deux conditions d'implantations. Ces images expliquent la différence de réhaussement du signal IRM obtenu entre les deux lots. Le modèle le plus pertinent est donc celui à 5 millions de cellules injectées par souris.

Les souris porteuses de tumeurs A431 (implantées avec 5 millions de cellules) traitées par les magnétosomes conjugués TzTCMC et conjugués TzTCMC-Pb ayant montré un réhaussement du signal IRM ont été utilisées pour réaliser des immunomarquages avec les anticorps anti-AMB1 et anti-Trastuzumab (MAB95471), en double marquage avec l'anticorps anti-CD31 révélant les vaisseaux sanguins. Afin de pouvoir comparer les images entre elles, les durées d'acquisition de chaque filtre ont été les mêmes pour chaque animal et pour chaque anticorps. De même, le contraste utilisé pour chaque marquage a été le même pour chaque animal par série de double marquage. Le signal en Alexa647 (rouge) étant faible, il a nécessité une durée d'acquisition longue (1500 ms) pour chaque anticorps anti-Trastuzumab et anti-AMB1. Cependant, l'intensité du signal obtenu est plus élevée pour l'anticorps anti-AMB1, le signal de l'anti-Trastuzumab sortant à peine du bruit de fond. Une coupe contrôle a été réalisée pour chaque double marquage, pour chaque animal, en n'utilisant que les anticorps secondaires.

La Figure 3.28 (souris traitées par les magnétosomes WT), la Figure 3.29 (souris traitées par les magnétosomes Tz-TCMC) et la Figure 3.30 (souris traitées par les magnétosomes Tz-TCMC-Pb) illustrent la présence des magnétosomes retrouvés *ex vivo* dans les tumeurs, détectés avec l'anticorps anti-AMB1. Les images A et C de ces trois figures montrent les immunomarquages avec les anticorps anti-AMB1 et CD31, les images B et D le contrôle réalisé par l'incubation des anticorps secondaires seuls.

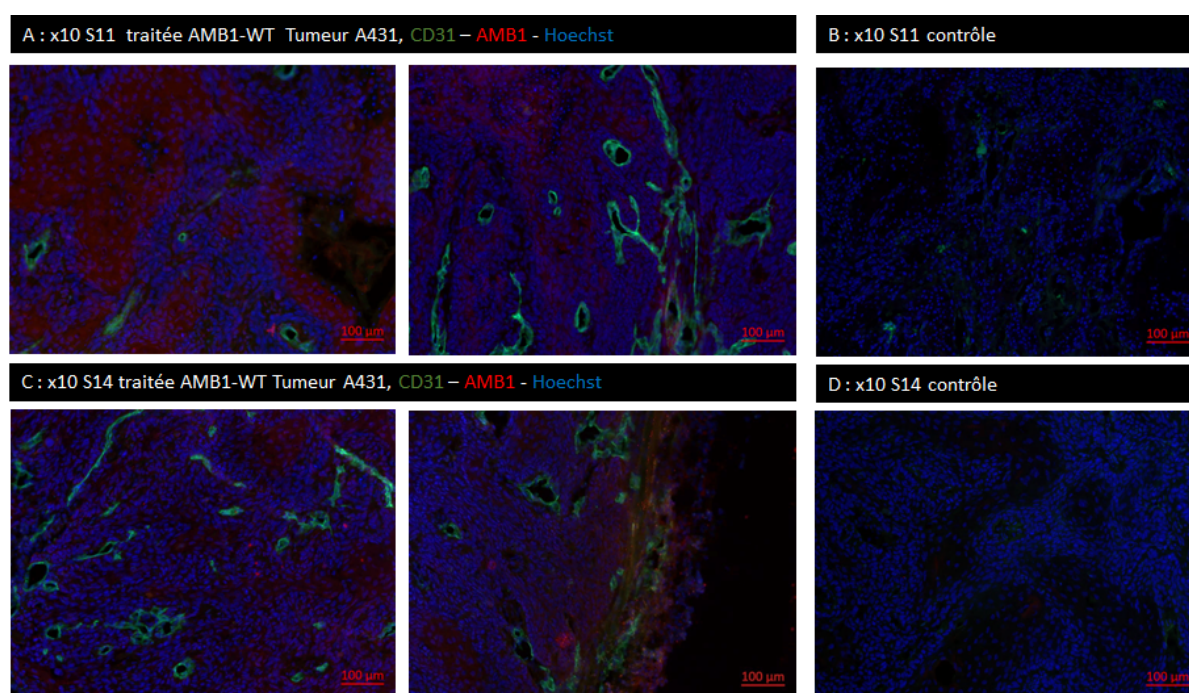


FIG. 3.28 – Souris traitées par les magnétosomes AMB1-WT, immunomarquages par l'anticorps anti-AMB1 et l'anticorps anti-CD31 (A et C) versus contrôle (B et D), grossissement x10

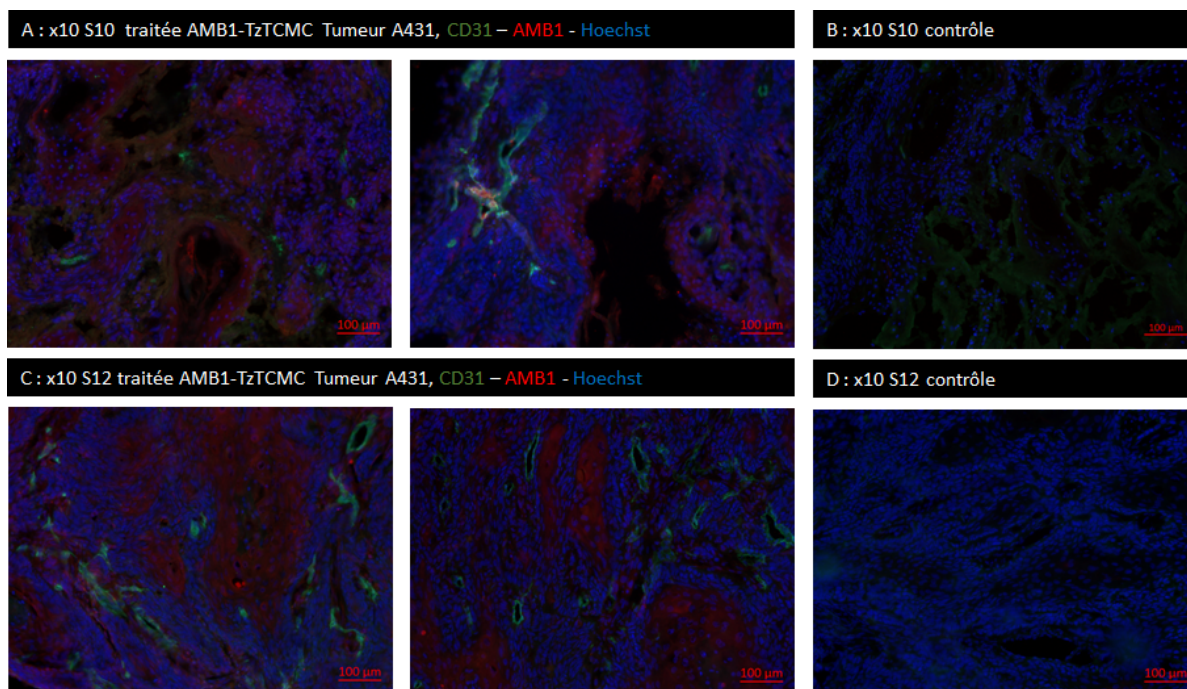


FIG. 3.29 – Souris traitées par les magnétosomes AMB1-TzTCMC, immunomarquages par l'anticorps anti-AMB1 et l'anticorps anti-CD31 (A et C) versus contrôle (B et D), grossissement x10

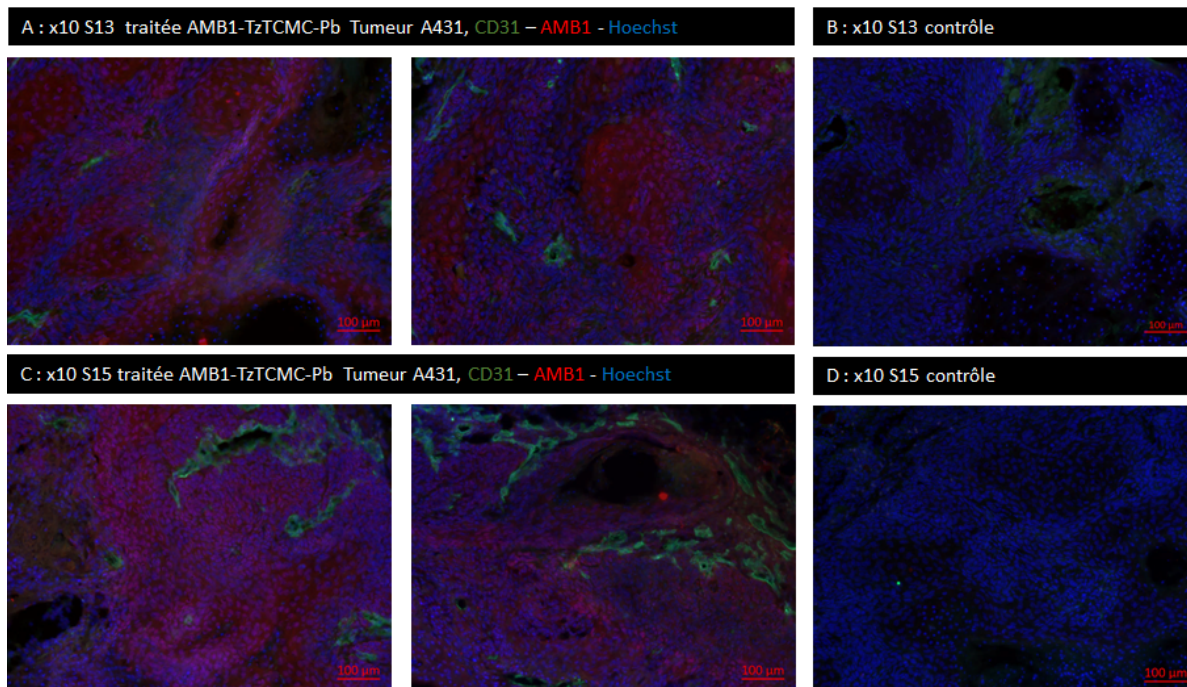


FIG. 3.30 – Souris traitées par les magnétosomes AMB1-TzTCMC-Plomb, immunomarquages par l'anticorps anti-AMB1 et l'anticorps anti-CD31 (A et C) versus contrôle (B et D), grossissement x10

Les souris traitées avec les magnétosomes WT, Tz-TCMC et Tz-TCMC-Pb montrent un marquage dans les tumeurs, avec des magnétosomes isolés proches des vaisseaux sanguins et des zones telles que les alvéoles HER2+. Le marquage est plus intense et la surface plus importante (visuellement) pour les magnétosomes conjugués que les magnétosomes non conjugués. L'effet EPR (voir Chapitre Mefisto, Paragraphe 2.3.2) explique le marquage avec l'anticorps anti-AMB1 observé dans les tumeurs traitées par les magnétosomes WT. Le réhaussement du signal observé pour les souris traitées par les magnétosomes conjugués et conjugués-Plomb s'explique par la présence de l'anticorps Trastuzumab.

À noter que contrairement aux observations *in vivo* par l'IRM, l'immunomarquage avec l'anticorps anti-AMB1 est au moins aussi intense, si ce n'est plus, pour les souris traitées avec les magnétosomes conjugués-Plomb, que pour les souris traitées avec les magnétosomes conjugués sans Plomb. Cette observation tendrait à indiquer que si la partie visible à l'IRM (composante vasculaire) est plus importante pour les souris traitées avec les magnétosomes conjugués sans Plomb, la partie tissulaire (ayant atteint la cible) est similaire pour les magnétosomes conjugués, avec ou sans Plomb. L'immunomarquage révèle donc une incorporation des magnétosomes significative, bien que peu importante par rapport au signal observé en IRM.

Il faut noter également qu'une partie des magnétosomes sont retrouvés à proximité immédiate du bord de la tumeur, à l'extérieur du tissu, cela pourrait signifier un décrochage partiel des magnétosomes du tissu en bordure durant les étapes de découpe et d'immunomarquage. Cette perte diminue mécaniquement le nombre de magnétosomes retrouvés dans les tissus tumoraux.

La Figure 3.31 (souris traitées par les magnétosomes WT), la Figure 3.32 (souris traitées par les magnétosomes Tz-TCMC) et la Figure 3.33 (souris traitées par les magnétosomes Tz-TCMC-Pb) illustrent la présence des magnétosomes retrouvés *ex vivo* dans les tumeurs, détectés avec l'anti-Trastuzumab, référence MAB95471, en double marquage avec l'anticorps anti-CD31.

Les images A et C de ces trois figures montrent l'immunomarquage par l'anticorps anti-Trastuzumab, MAB95471 et l'anticorps anti-CD31, les images B et D le contrôle réalisé par l'incubation des anticorps secondaires seuls.

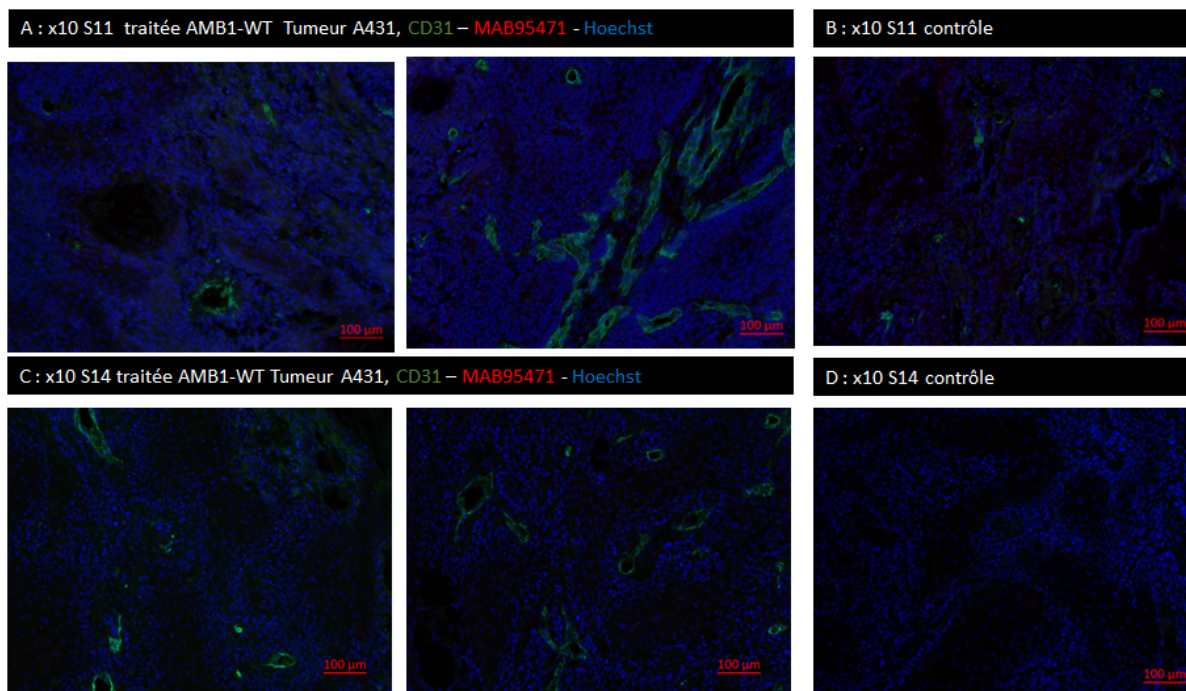


FIG. 3.31 – Souris traitées par les magnétosomes AMB1-WT, immunomarquages avec l’anticorps MAB95471 et l’anticorps anti-CD31 (A et C) versus contrôle (B et D), grossissement x10

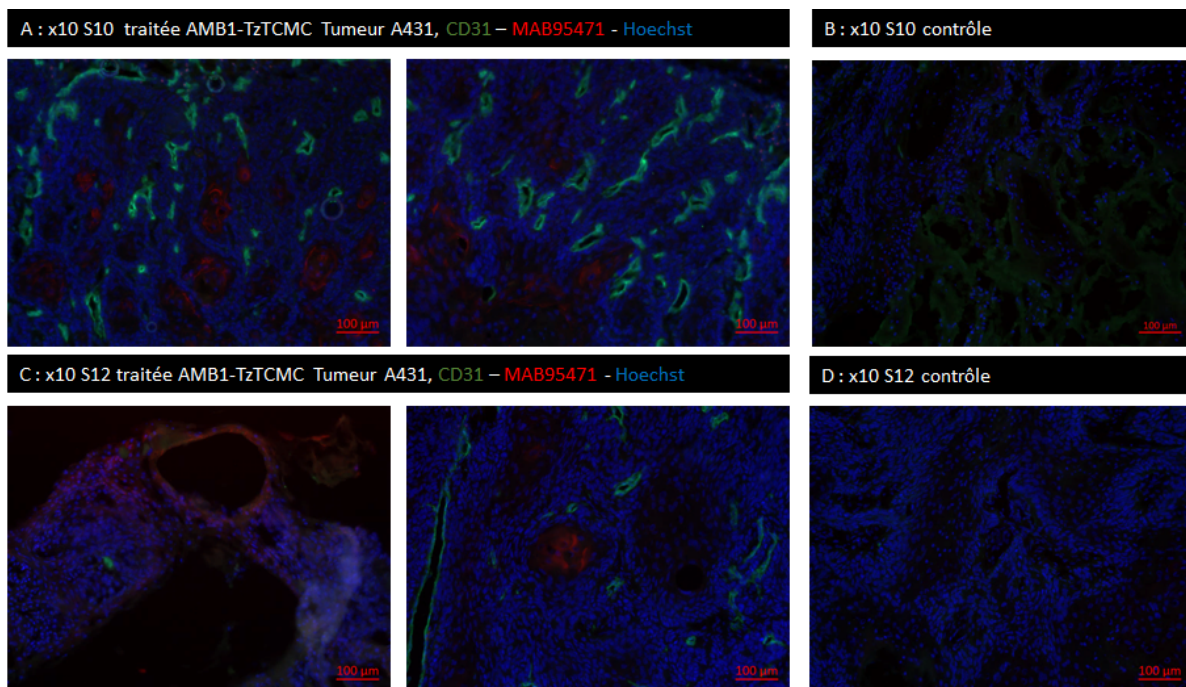


FIG. 3.32 – Souris traitées par les magnétosomes AMB1-TzTCMC, immunomarquages avec l’anticorps MAB95471 et l’anticorps anti-CD31 (A et C) versus contrôle (B et D), grossissement x10

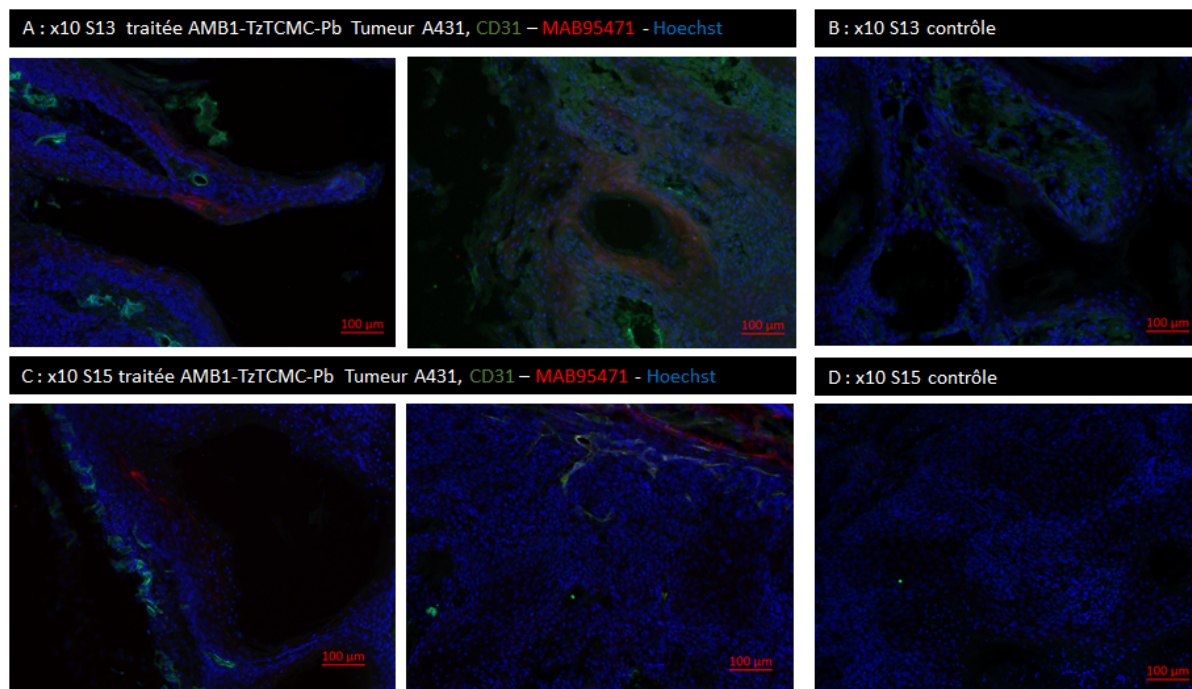


FIG. 3.33 – Souris traitées avec les magnétosomes AMB1-TzTCMC-Plomb, immunomarquages avec l'anticorps MAB95471 et l'anticorps anti-CD31(A et C) versus contrôle (B et D), grossissement x10

Les souris traitées avec les magnétosomes WT ne montrent aucun marquage ce qui est cohérent. Les souris traitées avec les magnétosomes conjugués Tz-TCMC et Tz-TCMC-Pb montrent un marquage dans les tumeurs au niveau des zones telles que les alvéoles HER2+. Ce marquage est beaucoup plus faible que le marquage avec l'anticorps anti-AMB1, le nombre de cible n'étant pas le même. En effet, le nombre d'anticorps Trastuzumab fixés aux magnétosomes étant de l'ordre de 400 TzTCMC par magnétosome alors que l'anticorps anti-AMB1, anticorps polyclonal, reconnaît sans doute un nombre important de protéines de surface sur la membrane du magnétosome qui exprime plus de 200 protéines différentes [Xu *et al.*, 2014]. De plus, les modèles cellulaires ont montrés une dégradation plus rapide du signal généré par l'anticorps anti-Trastuzumab par rapport à l'anticorps anti-AMB1.

La Figure 3.34 (souris traitées par les magnétosomes WT), la Figure 3.35 (souris traitées par les magnétosomes Tz-TCMC) et la Figure 3.36 (souris traitées par les magnétosomes Tz-TCMC-Pb) illustrent la présence des particules de fer retrouvés *ex vivo* dans les tumeurs, détectés avec la coloration Perl's (protocole en Annexe B.6), réalisée après 24, 48 ou 72 heures de perméabilisation des tissus (Triton 0.2%).

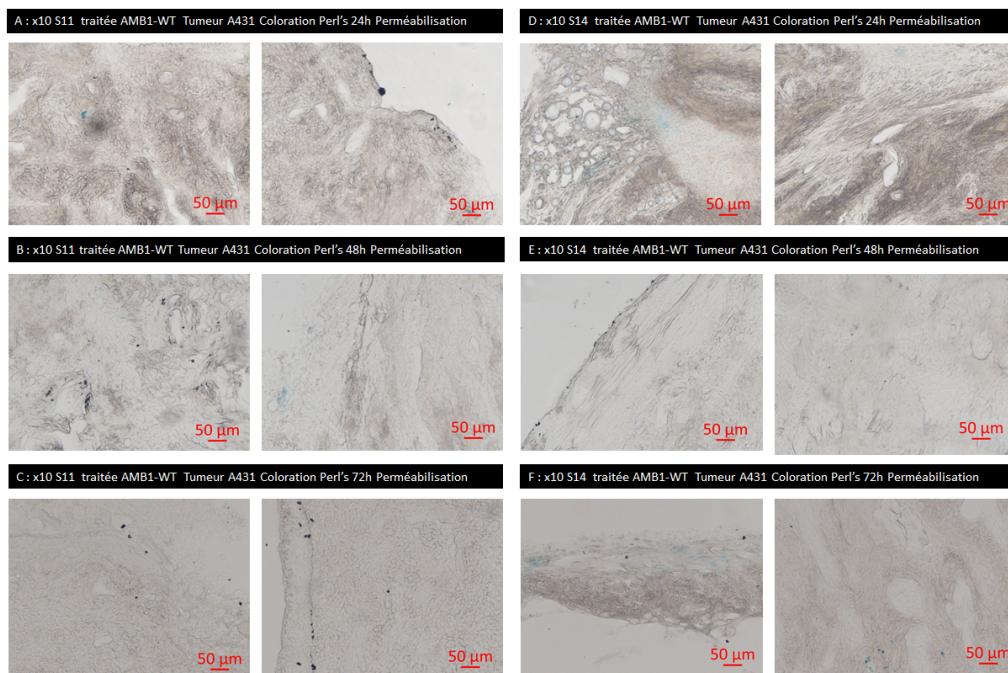


FIG. 3.34 – Souris traitées avec les magnétosomes AMB1-WT, Coloration au Bleu de Prusse, perméabilisation 24 heures (A, C), 48 heures (B, E) et 72 heures (C, F), grossissement x10

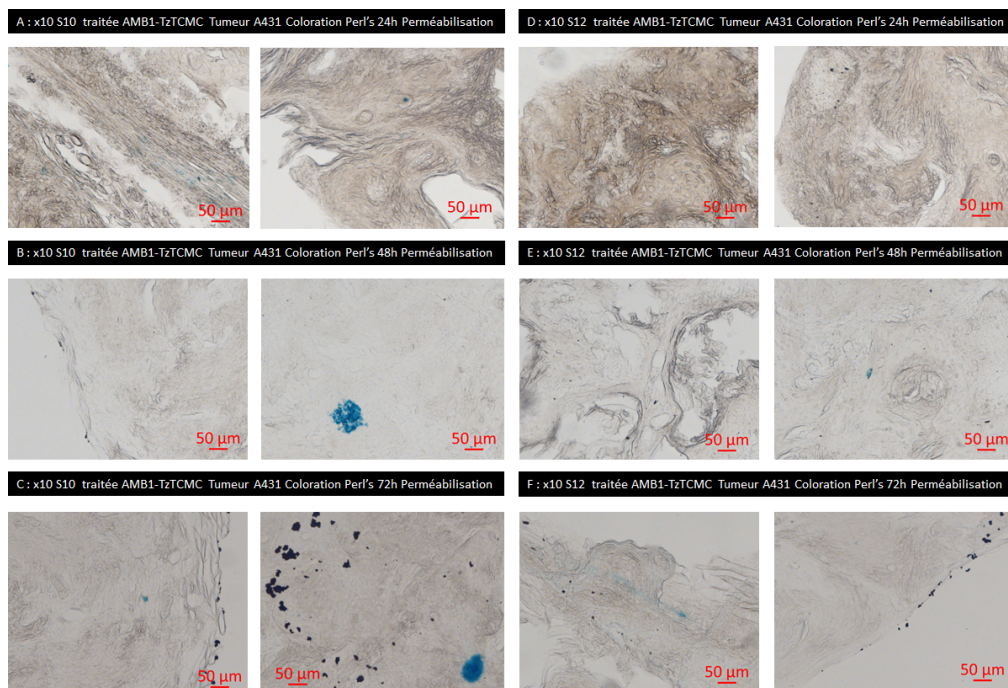


FIG. 3.35 – Souris traitées avec les magnétosomes AMB1-TzTCMC, Coloration au Bleu de Prusse), perméabilisation 24 heures (A, C), 48 heures (B, E) et 72 heures (C, F), grossissement x10

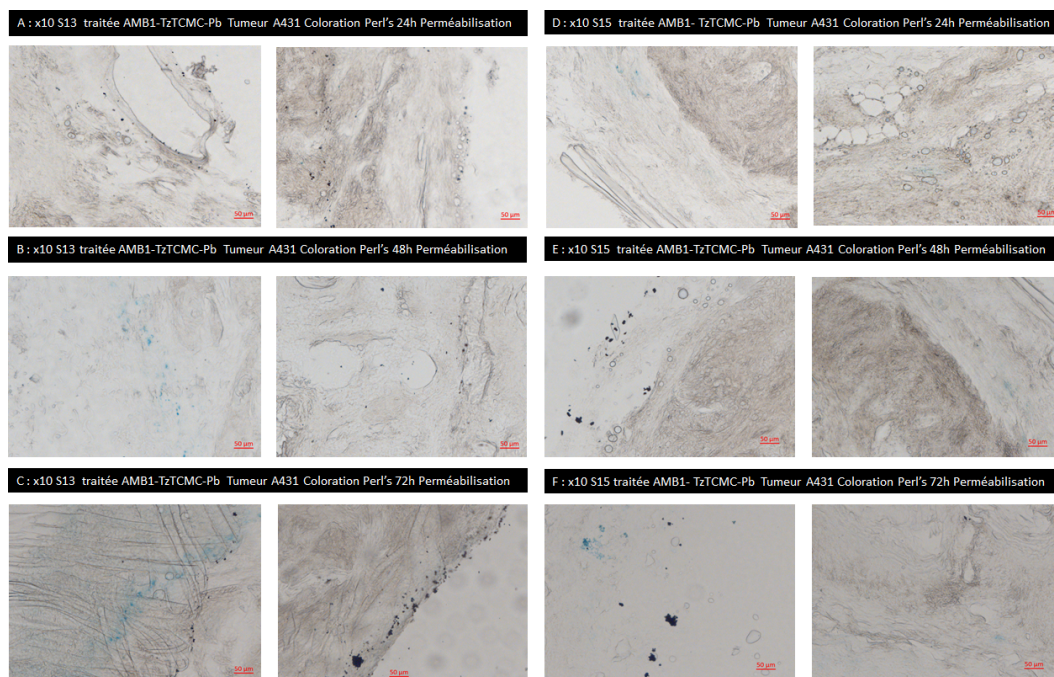


FIG. 3.36 – Souris traitées avec les magnétosomes AMB1-TzICMC-Pb, Coloration au Bleu de Prusse), perméabilisation 24 heures (A, C), 48 heures (B, E) et 72 heures (C, F), grossissement x10

La coloration bleue signale la présence de fer, sous forme d'amas de magnétosomes ou bien de zones plus diffuses. À noter qu'une perméabilisation de 24 heures n'était pas suffisante pour que les amas de magnétosomes apparaissent tous bleus et qu'ils soient distinguables du tissu. Après 48 et 72 heures de perméabilisation, le nombre d'amas de magnétosomes retrouvés est plus important, indiquant qu'une partie du fer n'est pas décelable à 24 heures, car en limite de détection dans les cellules. Après 72 heures, une partie importante des particules se retrouve sous forme de gros amas en périphérie, voire à l'extérieur des tissus, avec une probable perte de magnétosomes. En effet, la perméabilisation nécessaire pour passer les trois couches bi-lipidiques que sont la membrane cellulaire, la membrane des endosomes et la membrane des magnétosomes elle-même et atteindre ainsi le cœur de fer, fait que les particules de fer sortent des tissus et s'agglutinent entre elles par attraction magnétique.

La comparaison des tumeurs traitées par les magnétosomes non conjugués et conjugués montre que l'on retrouve plus d'amas de magnétosomes (à 72 heures de perméabilisation) dans les tumeurs conjugués, de façon visuelle (sans quantification).

Les conclusions de cette étude sont donc :

- La cible HER2 est bien exprimée dans les tumeurs A431.
- De larges zones d'œdème ou de nécrose sont présentes au centre des tumeurs, la partie active est en périphérie, limitant l'intérêt du modèle.
- Les cellules A431 HER2+ forment des alvéoles dans le tissu qui les entoure, à distance des vaisseaux sanguins, limitant l'accès des magnétosomes aux cellules tumorales.
- L'anticorps anti-AMB1 révèle que les magnétosomes non conjugués sont incorporés dans la tumeur, de façon plus faible que les magnétosomes conjugués. Les magnétosomes conjugués Tz-TCMC et Tz-TCMC-Pb sont retrouvés de façon similaire, ce qui ne permet pas de confirmer l'écart observé en IRM.
- La coloration Perl's montre que les particules de fer sont retrouvées de façon plus importante (visuellement) dans les tumeurs traitées par les magnétosomes conjugués.

3.6 Conclusion et perspectives

La spécificité des magnétosomes conjugués avec l'anticorps anti-HER2 est retrouvée dans les modèles *in vitro* et *in vivo* de cancer de la peau. Ce n'est pas le cas dans les modèles de cancer du sein *in vitro*, qui incorporent aussi bien les magnétosomes conjugués que non conjugués. Le point important, cependant, est que les magnétosomes sont capables d'apporter l'anticorps à sa cible, peut-être plus rapidement pour les magnétosomes conjugués sur les cellules SKBR3.

Le modèle A431, quoique jugé initialement intéressant par sa spécificité *in vitro*, se révèle moins pertinent *in vivo* du fait de l'organisation structurale des tumeurs. En effet, des zones d'œdème/nécrose importantes sont présentes au centre des tumeurs. À la périphérie, les cellules HER2+ sont regroupées en alvéoles à distance des vaisseaux sanguins, limitant mécaniquement la vitesse d'incorporation des magnétosomes dans les cellules. Cependant, malgré cette distance, les magnétosomes sont retrouvés au niveau des cellules HER2+ en immunomarquage (anti-AMB1 et anti-MAB95471), et la coloration Perl's permet de visualiser du fer dans les tumeurs. Les immunomarquages montrent que les magnétosomes conjugués avec ou sans plomb, atteignent leur cible. Cependant, l'intensité du marquage est faible, l'incorporation tissulaire est peu importante par rapport à la partie circulante dans les vaisseaux sanguins. Limiter la croissance des tumeurs à un volume plus proche de 250 mm³ pourrait peut-être limiter l'apparition des zones d'œdème, mais peut également limiter la vascularisation tumorale. Une étude histologique préalable serait nécessaire pour vérifier la pertinence de ce modèle de croissance limitée.

Le design des magnétosomes reste en cours d'optimisation, plusieurs pistes sont à l'étude. L'une d'elles consiste à diminuer le nombre d'atomes de Plomb par magnétosomes, avec comme point négatif d'être en limite de détection *in vitro* par ICP, pour confirmer quantitativement la quantité de Plomb incorporée. Des études de ciblage du noyau cellulaire par les magnétosomes sont également envisagées, ce qui réhausserait l'impact de la radiothérapie sur les cellules tumorales.

Enfin, le modèle *in vivo* SKBR3 est difficile à mettre au point, mais les cellules SKBR3 exprimant fortement la cible HER2 et contenant des vaisseaux sanguins proches des cellules tumorales (voir Chapitre Projet 3D), cela reste un modèle pertinent à investiguer. Le développement d'autres modèles tumoraux *in vivo* pourrait également être envisagé, par exemple des cellules de cancer ovarien SKOV3 (HER2++) ou bien d'autres lignées cellulaires de cancer du sein [Dai *et al.*, 2017].

Chapitre 4

Culture cellulaire 3D

- 4.1 Intérêt des modèles de culture en 3D
- 4.2 Modèles tumoraux monocellulaires
 - 4.2.1 Sphéroïdes : Méthode des gouttes inversées ou MGI
 - Description de la méthode
 - Caractérisation des sphéroïdes de cellules U87MG obtenus en MGI
 - 4.2.2 Sphéroïdes : Modèles sous agitation
 - Matériel non adhérent standard
 - Matériel non adhérent CELLSTAR™ Cell-Repellent
 - 4.2.3 Méthode par enrobage de Matrigel™
 - 4.2.4 Fixation des sphéroïdes
- 4.3 Modèles tumoraux bi-cellulaires non colorés
 - 4.3.1 Cellules endothéliales
 - 4.3.2 Caractérisation des deux lignées en immunomarquages
 - 4.3.3 Culture des 2 lignées ensemble en 2D
 - 4.3.4 Modèles bi-cellulaires de culture cellulaire en 3D
- 4.4 Modèles bi-cellulaires de cellules colorées
- 4.5 Modèles bicellulaires fluorescents
 - 4.5.1 Transfection
 - 4.5.2 Modèles réalisés avec les cellules fluorescentes
 - U87MG WT+ hCMEC/D3 pZgreen
 - U87MG E2-Crimson + hCMEC/D3 pZgreen
- 4.6 Applications des modèles de culture cellulaire 3D
 - 4.6.1 Projet Iseult
 - 4.6.2 Projet Mefisto
 - 4.6.3 Projet Orano
 - Modèles utilisés *in vitro*
 - Modèles développés pour les études *in vivo*
- 4.7 Conclusion et perspectives

4.1 Intérêt des modèles de culture en 3D

La culture cellulaire a été développée depuis les années 1900 [Carrel et Ebeling, 1923, White, 1946]. Le développement des lignées cellulaires immortelles (HeLa, par le Dr George Gey à l'institut John Hopkins, en 1951) a fait prendre un essor considérable à la culture cellulaire en 2D. Cela a permis de mieux comprendre la physiologie cellulaire [MacCumber *et al.*, 1990, Hu et Aunins, 1997] et de découvrir des nouveaux biomarqueurs [Wilson *et al.*, 1972]. La culture cellulaire a permis d'étudier entre autre le développement des pathologies [Okumura *et al.*, 1989, Friedlander *et al.*, 1996], les interactions entre types cellulaires [Lubetzki *et al.*, 1993], les voies de signalisation [Nelson et Chen, 2002, Suzuki *et al.*, 2010]. Des technologies nouvelles, comme la production d'anticorps [Li *et al.*, 2010], de cytokines [Zhang *et al.*, 1996], de matrice extracellulaire [Kleinman *et al.*, 1982], ont considérablement amélioré les outils disponibles pour la recherche. Des candidats médicaments ont été testés sur des cultures cellulaires plutôt que de passer directement chez l'animal [Bradlaw, 1986, Scudiero *et al.*, 1988, Simon *et al.*, 2014].

La culture cellulaire en 2D, si informative soit-elle, ne prend pas en compte les interactions cellules-matrice extracellulaire, cellules-cellules en 3D, encore moins la migration cellulaire en 3D [Galarza *et al.*, 2020]. Dans le domaine du cancer, le taux de succès minime en clinique (5%) des thérapies efficaces sur les modèles *in vitro* en 2D et en xénogreffes chez l'animal a soulevé de nombreuses interrogations [Kola et Landis, 2004]. La pertinence des modèles cellulaires en 2D, qui dérivent au cours du temps en perdant l'hétérogénéité de la tumeur primaire, a été remise en question [Tveit et Pihl, 1981]. De même, les xénogreffes, implantations sous cutanées de tumeurs, ont été évaluées comme moins capables de reproduire les pathologies humaines que des modèles orthotopiques, implantation de cellules dans l'organe cible [Wilding et Bodmer, 2014].

L'importance du microenvironnement tumoral et des interactions multiples en 3D, a été de plus en plus démontré aussi bien en clinique [Bissell et Hines, 2011] qu'en préclinique [Bhadri-raj et Chen, 2002]. De nombreux modèles de cultures cellulaires en 3D ont été développés en vingt ans, de plus en plus sophistiqués et complexes [Choi *et al.*, 2014], permettant l'étude des modifications induites par l'organisation en 3D [Kapałczyńska *et al.*, 2018, Ma *et al.*, 2018]. Des études comparatives entre les modèles de culture cellulaire en 2D et en 3D [Chitcholtan *et al.*, 2012] montrent que les candidats médicaments n'ont pas le même effet en fonction du type de culture cellulaire [Pickl et Ries, 2009, Brodeur *et al.*, 2021]. De fait, un consensus s'est rapidement fait jour sur l'intérêt des modèles cellulaires en 3D par rapport aux modèles cellulaires en 2D [Jensen et Teng, 2020], même si celle-ci est encore très utilisée.

Le renforcement croissant des règles d'éthique en expérimentation animale au cours des deux dernières décennies a également accru le besoin de modèles intermédiaires entre les modèles cellulaires classiques (2D) et les modèles animaux. Les modèles cellulaires en 3D sont donc très intéressants de ce point de vue, non seulement pour étudier un modèle tumoral mais également étudier des aspects particuliers de la physiologie, comme le passage au travers de la BHE [Roux *et al.*, 2019], la capacité d'une nanoparticule à atteindre les cellules tumorales [Sokolova *et al.*, 2020] ou les mécanismes mis en jeu dans la formation des plaques amyloïdes [Pavoni *et al.*, 2018a].

La recherche sur les cellules souches et la possibilité de reprogrammer des cellules différenciées en cellules progénitrices [Corrò *et al.*, 2020] ont permis le développement de véritables organoïdes, multicellulaires, comprenant de la matrice extracellulaire [Hayden et Harbell, 2021], capables de mimer des pathologies bien plus efficacement [Amin et Paşca, 2018, Azza-relli, 2020], prenant en compte des facteurs tels que l’hypoxie qui peut se développer dans le centre des tumeurs [Musah-Eroje et Watson, 2019]. Le travail sur les cellules souches permet aussi d’envisager des thérapies réparatrices [Samoilova *et al.*, 2018].

La possibilité de travailler directement sur les cellules humaines, en 3D, permet d’avancer vers une médecine dite “personalisée” [Liu et Chen, 2018]. Les modèles issus directement de cellules de patients [Jacob *et al.*, 2020, Heider *et al.*, 2021] peuvent permettre d’étudier des pathologies rares et de tester une thérapie spécifique à un patient [Kim *et al.*, 2020]. Des modèles multi-cellulaires 3D sont également en cours de développement, pour prendre en compte la vascularisation tumorale [Wang *et al.*, 2019, Gerigk *et al.*, 2021, Tang *et al.*, 2021].

Dans le cadre de cette thèse, je présente ici les modèles de culture cellulaire en 3D sur lesquels j’ai travaillé, des modèles tumoraux de glioblastome humain monocellulaire et bi-cellulaire (avec des cellules endothéliales humaines), de modèles monocellulaires de cancers humains (sein et peau). Les conditions de culture de chaque lignée sont décrites en Annexe A.3. Je présente tout d’abord les différentes méthodes utilisées pour créer des modèles de culture en 3D, puis la caractérisation des sphéroïdes de cellules U87MG et différentes solutions de fixation. Ensuite, je présente les modèles bi-cellulaires de cellules humaines de glioblastome et de cellules endothéliales, avec différentes méthodes pour les distinguer l’une de l’autre dans les sphéroïdes. Pour finir je présente les applications de ces modèles pour nos projets, *in vitro* et *in vivo*.

4.2 Modèles tumoraux monocellulaires

Je me suis intéressée aux modèles cellulaires 3D dès 2010, dans le cadre du projet Iseult, partenariat entre NeuroSpin et le laboratoire Guerbet pour le développement de nouveaux agents de contraste à très forte relaxivité. Nous avons souhaité réaliser des fantômes avec les cellules, en les gardant en vie au moins quelques heures, pour tester l’incorporation des agents de contraste fonctionnalisés. Ainsi un premier modèle très simple a été réalisé, en mettant en suspension (0,2 million/mL) des cellules humaines de glioblastome (grade IV), les cellules U87MG, dans un gel de matrice extracellulaire (Matrigel™ à 25%). Les cellules se développent très facilement, interagissant en trois dimensions pour créer en trois jours un réseau cellulaire assez dense. Ce modèle ne mime cependant pas la densité cellulaire des tumeurs *in vivo*, c’est pourquoi les modèles de type sphéroïde ont été développés.

4.2.1 Sphéroïdes : Méthode des gouttes inversées ou MGI

Description de la méthode

Ce modèle reprend la technique dite de la goutte inversée [Kelm *et al.*, 2003, Foty, 2011]. J'ai utilisé cette méthode avec les cellules U87MG. Brièvement, une suspension cellulaire est préparée à partir de cellules en culture 2D classique. Des gouttes de la suspension sont disposées sur le couvercle d'une boîte de culture, une goutte par puits. Le couvercle est remis sur la boîte remplie de tampon pour garder le niveau d'hydratation. Les cellules tombent à l'extrémité de la goutte, par l'effet de la gravité, créant un sphéroïde en s'agrégeant entre elles. J'ai commencé par tester différentes concentrations de cellules et différents volumes de gouttes, afin de déterminer les meilleures conditions de croissance des sphéroïdes. Puis, afin d'obtenir des amas de plus grande taille plus rapidement, j'ai introduit des étapes de regroupement par deux des sphéroïdes, dans une nouvelle goutte. Cette méthode a permis de raccourcir considérablement le processus, mais entraîne beaucoup de manipulations et parfois la perte de certains sphéroïdes.

Une fois que l'amas de cellules atteint environ 0,5 mm de diamètre, il devient difficile de le garder suspendu. J'ai donc prélevé et déposé ces sphéroïdes sur une couche de Matrigel™. Là encore quelques essais ont été nécessaires pour déterminer les meilleures conditions de croissance dans le gel, afin de garder en vie et en croissance les sphéroïdes. Les plus gros sphéroïdes sont gardés des semaines, en double couche de Matrigel™, et sont capables de créer des "métastases", sphéroïdes-fils distants de quelques millimètres de la tumeur initiale. Le protocole final est décrit dans la Figure C.2 (Annexe C.2).

Les sphéroïdes ainsi obtenus peuvent être facilement congelés et décongelés à la demande (voir Annexe C.2), afin de les préparer à l'avance. Ils peuvent aussi être fixés (PFA 4% pendant 15 minutes) et coupés pour réaliser des études en immunohistologie. Néanmoins, les processus de fixation, congélation et découpe, induisent une perte importante de la couronne du sphéroïde, seule la zone la plus proche du cœur nécrotique étant préservée, ce qui limite l'utilisation des coupes en histologie.

De plus, cette méthode n'est pas applicable à toutes les lignées cellulaires : j'ai testé trois lignées de cancer du sein (MDA-MB-231, MCF7 et SKBR3), mais les sphéroïdes se désagrègent pendant les manipulations, ou même meurent dans les gouttes. J'ai malgré tout utilisé cette méthode pendant des années, avant l'acquisition d'un agitateur pouvant être utilisé dans l'incubateur.

Caractérisation des sphéroïdes de cellules U87MG obtenus en MGI

Les sphéroïdes de cellules U87MG, de taille supérieure à 2 mm, poussant dans une double couche de matrice extracellulaire, montrent un cœur nécrotique, entouré d'une couronne très active de cellules, capables d'envahir le Matrigel™ très rapidement, ainsi que le montre la Figure 4.1 (images A et B, microscopie). L'image C montre des photographies de sphéroïdes en croissance dans leur boîte, l'image D montre une image prise avec le scanner IRM. Afin de pouvoir utiliser les sphéroïdes en imagerie IRM, il est nécessaire qu'ils atteignent une taille d'au moins 1 à 2 millimètres.

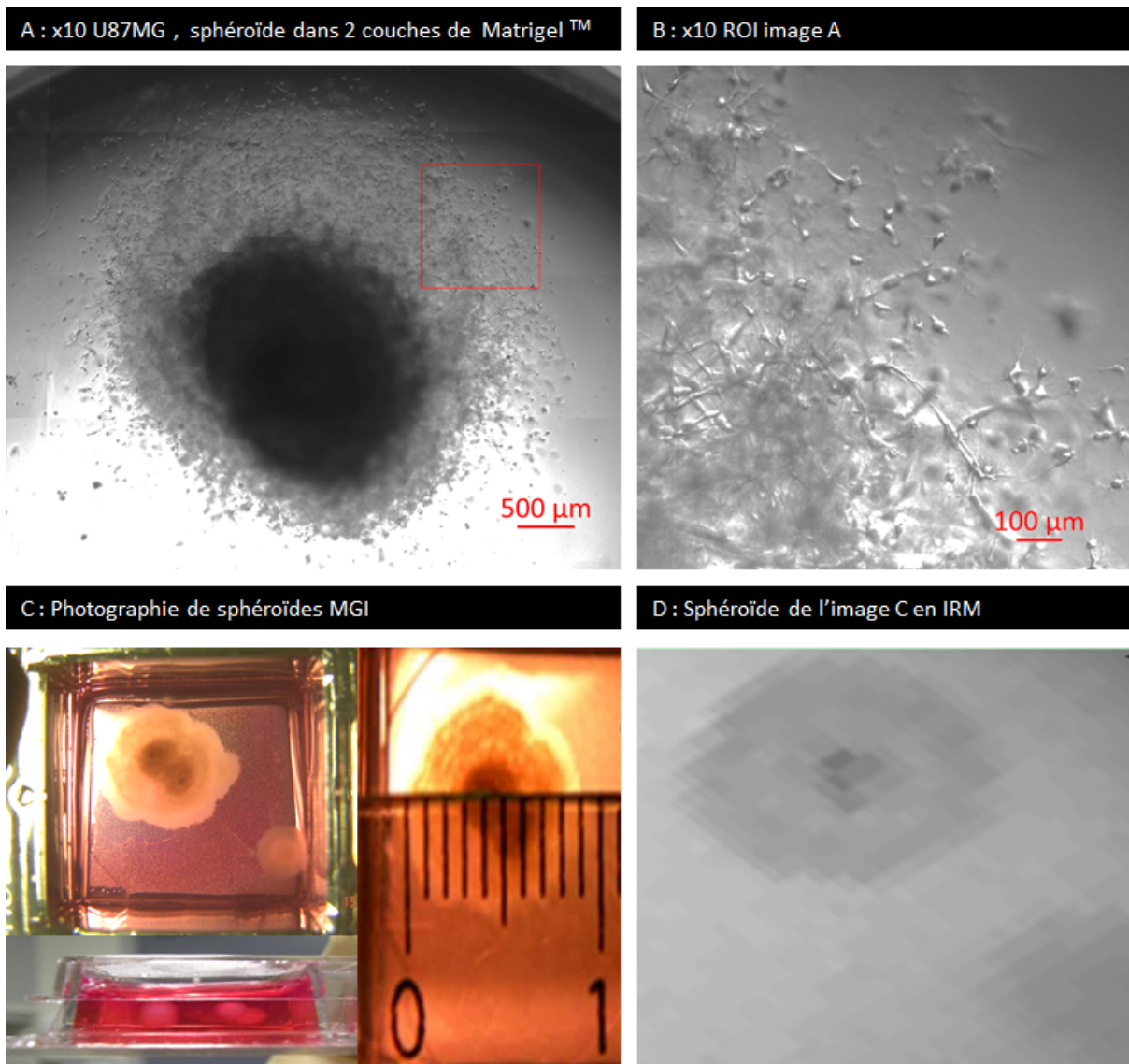


FIG. 4.1 – Sphéroïdes de cellules U87MG en double couche de Matrigel™ A et B (grossissement x10, microscope), C (photographies) et D (Image IRM)

Après une étape de fixation en PFA 4% et de découpe au cryostat, des immunomarquages ont permis de vérifier que les marqueurs existants sur culture cellulaire 2D sont toujours présents en 3D, notamment l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, le Ki67 et la Vimentine. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est notre cible pour le projet Mefisto, le Ki67 est un marqueur exprimé durant les phases de croissance du cellulaire, la Vimentine est un marqueur surexprimé dans les cellules de glioblastome et associé à leur potentiel migratoire.

La Figure 4.2 illustre les marqueurs retrouvés dans les sphéroïdes. L'image A montre que l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est bien présente en périphérie et peu dans le centre, nécrotique, avec des portions sans cellules résiduelles, l'image B montre l'expression de la Vimentine et l'image C montre l'expression du Ki67, marqueur de croissance retrouvé en périphérie.

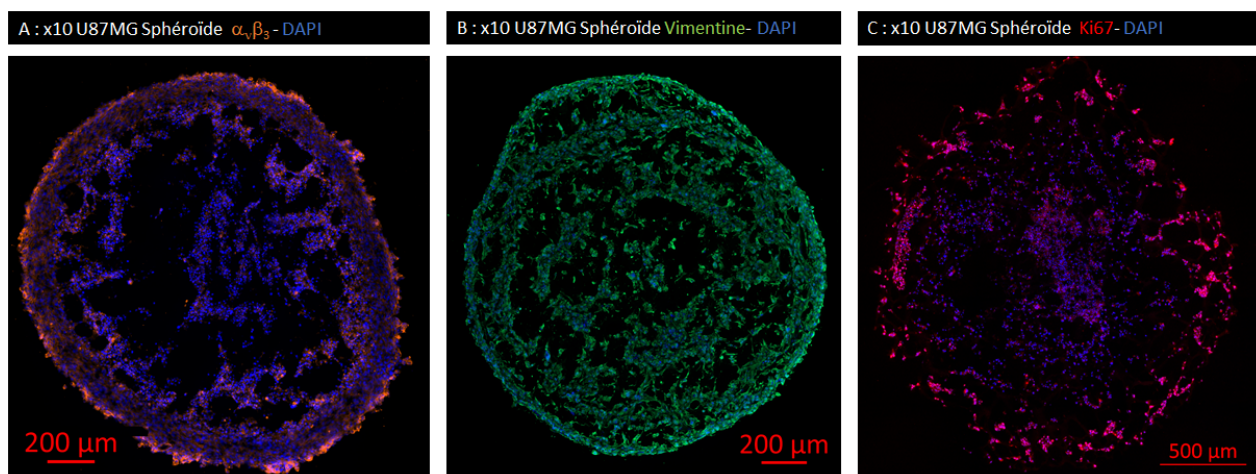


FIG. 4.2 – Coupes de sphéroïdes de cellules U87MG, immunomarquage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, de la Vimentine et de Ki67, grossissement x10

4.2.2 Sphéroïdes : Modèles sous agitation

Les sphéroïdes créés en MGI puis maintenus en double couche de Matrigel™ peuvent rester en croissance des semaines, mais le cœur se nécrose au fur et à mesure, par défaut de nutriments et d'oxygénation au centre. Le maintien sous agitation constante peut permettre une meilleure survie des cellules, le milieu pénétrant plus en profondeur dans les sphéroïdes. Un agitateur peut être placé dans l'incubateur de culture (NBIOTEK, Dutscher ref 995042), maintenant sous agitation constante les cellules en suspension, sans vibrations. Des modèles ont été réalisés en utilisant différents consommables de culture cellulaire (non adhérent standard, cell-repellent, enrobage de Matrigel™).

Matériel non adhérent standard

Les cellules sont cultivées sous agitation à 30 tours/min, dans des flacons ou boîtes de culture non adhérentes standards, non traitées pour l'adhésion, utilisés pour les cellules non adhérentes, comme les lymphocytes par exemple. Cette méthode permet d'obtenir des petits agrégats de cellules, des microsphéroïdes, mais pas de sphéroïdes de grande taille.

Les cellules U87MG forment rapidement des sphéroïdes (en 24 heures) et peuvent être gardées en culture, en centrifugeant la suspension de sphéroïdes et en changeant le milieu. Les cellules de cancer du sein humain, SKBR3 et MDA-MB-231, ainsi que la lignée de cellules humaines de sein non cancéreuse MCF12a, une lignée de cancer de la peau humaine A431, une lignée murine de cancer du colon MC38, donnent toutes des microsphéroïdes avec cette méthode. Cependant les cellules SKBR3 ne donnent que de très petits sphéroïdes (5-15 cellules au maximum), entourés de nombreuses cellules isolées.

Certaines cellules, malgré l'agitation, sont capables de pousser aussi sur le fond de la boîte, comme les cellules U87MG, après quelques jours de culture. Cette méthode n'est pas applicable à toutes les lignées, les cellules hCMEC/D3 (cellules endothéliales humaines immortalisées) colonisent le fond de la boîte, malgré le manque de traitement favorisant l'adhésion.

Matériel non adhérent CELLSTAR™ Cell-Repellent

Depuis quelques années, les fournisseurs ont développé de nombreux nouveaux consommables pour favoriser la culture cellulaire en 3D. Bien que beaucoup plus onéreuse que du matériel non adhérent standard, la gamme CELLSTAR™ Cell-Repellent de Greiner Bio-One dont la surface est traitée avec un polymère innovant, permet d'obtenir facilement des sphéroïdes de bonne taille sans manipulations excessives, et sans pertes.

Ces consommables donnent de très bons résultats avec les cellules U87MG : en 24 heures, toutes les cellules de la suspension cellulaire mise sous agitation, donnent un seul et unique sphéroïde dans la boîte. La taille du sphéroïde est dépendante de la quantité de cellules en suspension à l'ensemencement. Ce sphéroïde continue de se développer, mais très lentement. Afin d'obtenir des organoïdes de plus grande taille, il suffit de récupérer les sphéroïdes sous agitation et de les déposer sur une couche de Matrigel™, puis de les entretenir comme décrit pour la procédure MGI. Cela permet de réduire la durée du protocole et de limiter les pertes et les manipulations.

Les cellules endothéliales humaines hCMEC/D3 donnent aussi des petits sphéroïdes avec ce protocole, contrairement à celui avec du matériel non adhérent standard. Les cellules de cancer de la peau A431 donnent également des sphéroïdes par cette méthode mais après quelques jours sous agitation, ils perdent leur cohésion et se désagrègent. Les cellules de cancer du colon MC38 donnent également des sphéroïdes par cette méthode, capables de croître sous agitation plus de sept jours.

La lignée de cancer du sein SKBR3 ne se développe pas en sphéroïdes, elle forme un tapis, dense, flottant, de cellules semi-relies entre elles mais facilement dissociables. À noter que les puits non utilisés des plaques 24 puits après quelques jours perdent partiellement leur capacité de non adhérence, diminuant fortement l'obtention d'un sphéroïde.

4.2.3 Méthode par enrobage de Matrigel™

J'ai utilisé cette méthode afin d'obtenir des sphéroïdes de cellules SKBR3, qui ne donnaient pas de résultats probants avec les autres méthodes, dans le but de les utiliser *in vivo*. La lignée SKBR3 a été ensemencée en Matrigel™ 50%, à différentes concentrations (50 000 cellules/10 μ L, 200 000 cellules/20 μ L, 300 000/20 μ L, 400 000/20 μ L et pour finir 400 000/40 μ L) ou en Matrigel™ 100% (250 000cellules/20 μ L), sur une plaque de silicone formant des petits puits (StemCell, Organoid embedding sheet, ref 08579). Après 30 minutes à 37°C, les gouttes sont prélevées et gardées sous agitation en plaque 24 puits CELLSTAR™, dans 2 mL de milieu. Cela permet d'obtenir des sphéroïdes assez denses, capables de croître pendant quelques jours dans ces conditions. Après cinq jours, à partir de la condition 200 000 cellules/20 μ L, des cellules SKBR3 se détachent du sphéroïde, poussant de façon isolée autour de celui-ci. Dans le sphéroïde des agrégats de cellules en croissance sont visibles, ainsi que le montre la Figure 4.3 (flèches rouges). Ces sphéroïdes peuvent être gardés en croissance une dizaine de jours, après quoi des signes de nécrose apparaissent.

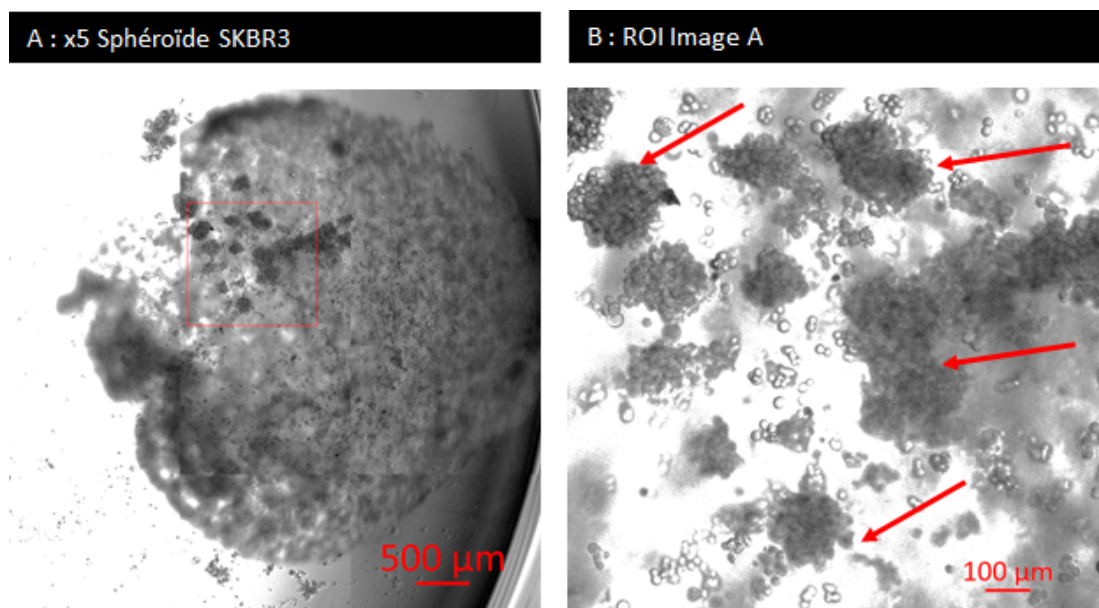


FIG. 4.3 – Sphéroïdes de cellules SKBR3 obtenus à J4 par la méthode en enrobage de Matrigel™

Cette méthode est applicable à d'autres lignées, je l'ai également utilisée pour les modèles bi-cellulaires. À noter que la fixation des sphéroïdes de cellules SKBR3 en Matrigel™ avec du PFA 4% est impossible, le sphéroïde se désagrègeant complètement.

4.2.4 Fixation des sphéroïdes

Afin de conserver les sphéroïdes pour réaliser des coupes et des immunomarquages, il est nécessaire de les fixer avec un fixateur. Le PFA 4% est une méthode classique de fixation, mais il semble incapable de maintenir la cohésion de la matrice extracellulaire lorsque les cellules ne forment pas un maillage dense comme pour les sphéroïdes de cellules SKBR3, impossibles à fixer par cette méthode.

Des méthodes alternatives sont décrites comme éprouvées en cytochimie [Vincent *et al.*, 2009]. Un test comparant différentes solutions de fixation a été réalisé en utilisant des sphéroïdes de cellules U87MG décongelés et remis en croissance sur du Matrigel™ pendant six jours, et des sphéroïdes de cellules SKBR3 préparés en enrobage de Matrigel™. L'essai a consisté à comparer trois solutions de fixation par rapport à la méthode classique au PFA. Il s'agit d'un mélange acétone/éthanol (1 : 1) à -20°C, d'un mélange éthanol/PEG (19 : 1), d'une solution de glutaraldéhyde 1% en DPBS.

Toutes ces méthodes conservent l'intégrité des sphéroïdes de cellules SKBR3 et de cellules U87MG sans doute grâce à une meilleure préservation de la matrice. Les images prises sur les sphéroïdes fixés, avant l'étape de congélation pour découpe, présentées à l'Annexe C.3 (Figure C.3, image A), montrent en effet une couronne plus importante. Le glutaraldéhyde donne un bon aspect en fond clair, mais induit une augmentation du bruit de fond en fluorescence très importante (Figure C.3, image B).

Après congélation et découpe au cryostat, les coupes de sphéroïdes de cellules U87MG ont été utilisées pour réaliser des immunomarquages par les anticorps anti- $\alpha_v\beta_3$ et anti-Ki67. La Figure 4.4 montre que les nodules les plus grands ont un cœur nécrotique très important, quelle que soit la méthode de fixation, entouré d'une couronne plus ou moins large. La fixation au paraformaldéhyde montre une couronne un peu moins large avec souvent une zone de cellules plus resserrées que celles obtenues avec les fixations à base d'éthanol.

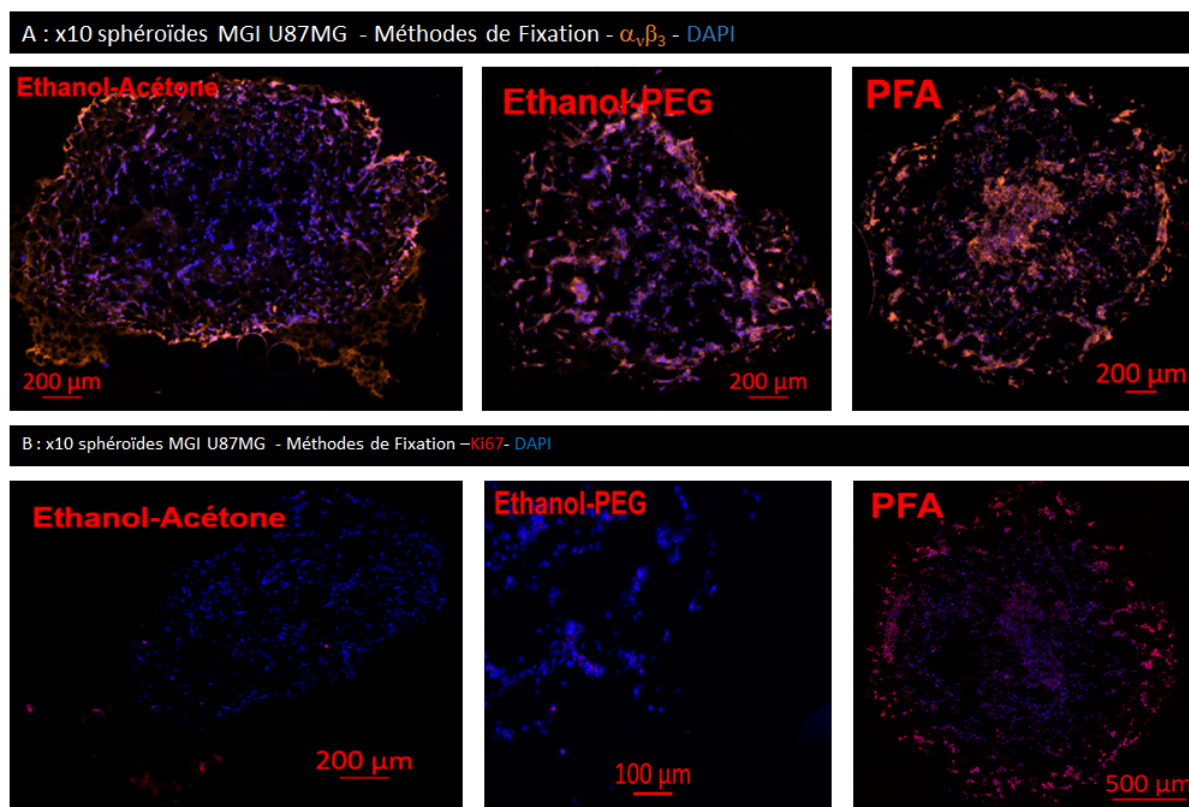


FIG. 4.4 – Immunomarquages avec les anticorps anti- $\alpha_v\beta_3$ (A) et anti-Ki67 (B) sur coupes de sphéroïde de cellules U87MG, test des méthodes de fixation, grossissement x10

Les immunomarquages réalisés sur coupes de sphéroïdes de cellules U87MG fixés en solutions d'éthanol ou de PFA sont similaires pour ce qui est de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ mais les fixations éthanol/acétone et éthanol/PEG semblent réduire complètement l'immunomarquage Ki67. Pour cette raison, la fixation au PFA 4% a été conservée pour les sphéroïdes à base de cellules U87MG.

Les sphéroïdes de cellules SKBR3 fixés au glutaraldéhyde restent entiers, mais le bruit de fond inhérent à la fixation est tel qu'il est difficile de distinguer l'immunomarquage par l'anticorps anti-HER2 du bruit de fond (voir Figure C.4, Annexe C.3). Les sphéroïdes fixés en solution d'éthanol/PEG et éthanol/acétone peuvent être coupés au cryostat mais se désagrègent lors des immunomarquages, ne laissant que quelques cellules sur la lame ; cependant l'immunomarquage est spécifique pour HER2 (voir Figure C.5, Annexe C.3). La fixation de ces sphéroïdes nécessitera quelques ajustements, par exemple diluer la solution de glutaraldéhyde pourrait diminuer le bruit de fond en immunomarquages.

Les conclusions de ce travail méthodologique de développement de sphéroïdes monocellulaire sont donc :

- Différentes méthodes sont utilisables pour générer des sphéroïdes mais elles ne sont pas toutes applicables à toutes les lignées cellulaires.
- La croissance des sphéroïdes peut générer une nécrose importante au centre du sphéroïde.
- Les sphéroïdes peuvent être congelés en azote liquide, décongelés et reprendre leur croissance.
- Les sphéroïdes peuvent être fixés, congelés et coupés.
- Le PFA 4% reste le fixateur le plus intéressant pour la majorité des sphéroïdes testés, sauf pour les sphéroïdes de cellules SKBR3 qui se désagrent après fixation au PFA. Le glutaraldéhyde est une alternative intéressante mais qui génère une autofluorescence non souhaitée. Les fixateurs à base d'éthanol ne permettent pas d'obtenir un immunomarquage spécifique avec tous les anticorps testés.

4.3 Modèles tumoraux bi-cellulaires non colorés

Afin de mimer au plus près le développement tumoral *in vivo*, et espérer obtenir des sphéroïdes de bonne taille avec un cœur nécrotique plus réduit, j'ai étudié la faisabilité d'un modèle bi-cellulaire en cultivant ensemble des cellules endothéliales humaines (hCMEC/D3) et des cellules tumorales humaines (U87MG).

4.3.1 Cellules endothéliales

Les cellules hCMEC/D3 sont des cellules de microcapillaires cérébraux issus de patient, immortalisées par l'équipe de Pierre-Olivier Couraud [Weksler *et al.*, 2005]. Ces cellules expriment les marqueurs des cellules endothéliales et des jonctions serrées de la BHE formant des structures de type capillaires sur matrice extracellulaire. Elles ont été développées comme modèle *in vitro* de la barrière hémato-encéphalique [Hatherell *et al.*, 2011, Weksler *et al.*, 2013].

Cultivées en 2D, comme décrit en Annexe A.3.7, les cellules sont fusiformes et forment une couche dense sur du collagène de type I. Cultivées sur une couche de matrice extracellulaire (Matrigel™) 100%, elles se développent en microstructures de type capillaire comme illustré par la Figure C.6 (Annexe C.4). Sur une couche de matrice extracellulaire moins concentrée, elles ne forment pas de capillaires, comme montré par la Figure C.7 (Annexe C.4).

4.3.2 Caractérisation des deux lignées en immunomarquages

L'anticorps anti- $\alpha_\nu\beta_3$ permettant de marquer les cellules U87MG peut être utilisé indifféremment sur cellules vivantes et fixées mais son prix décourage l'utilisation en culture cellulaire pour l'imagerie sur cellules vivantes, du fait des volumes utilisés.

Les cellules hCMEC/D3 expriment peu l'intégrine $\alpha_\nu\beta_3$, quelques cellules apparaissent positives mais la majorité ne l'exprime pas assez pour sortir du bruit de fond. Elles partagent différents marqueurs avec les cellules U87MG. La Figure C.8 (Annexe C.5) montre les différents marqueurs étudiés sur les deux types cellulaires et qui sont exprimés par les deux lignées.

Les cellules hCMEC/D3 ont été immortalisées à l'aide d'une transduction avec des lentivirus codants pour la protéine SV40T (SV40T, pour Simian Vacuolating Virus 40 TAg), ainsi que l'enzyme de transcription inverse hTERT (hTERT, pour human Telomerase Reverse Transcriptase protein).

Un anticorps spécifique ciblant SV40T permet d'identifier les noyaux des cellules transfectées où la protéine est exprimée. Il n'est cependant utilisable qu'après une étape de perméabilisation sur cellules fixées, et l'expression est relativement variable d'une cellule à l'autre, une partie des cellules ne l'exprimant plus que faiblement. Les cellules U87MG n'étant pas transfectées, elles n'expriment pas du tout la protéine SV40T. La Figure 4.5 montre la différence d'expression des deux lignées pour les marqueurs SV40T (image A) et $\alpha_\nu\beta_3$ (image B).

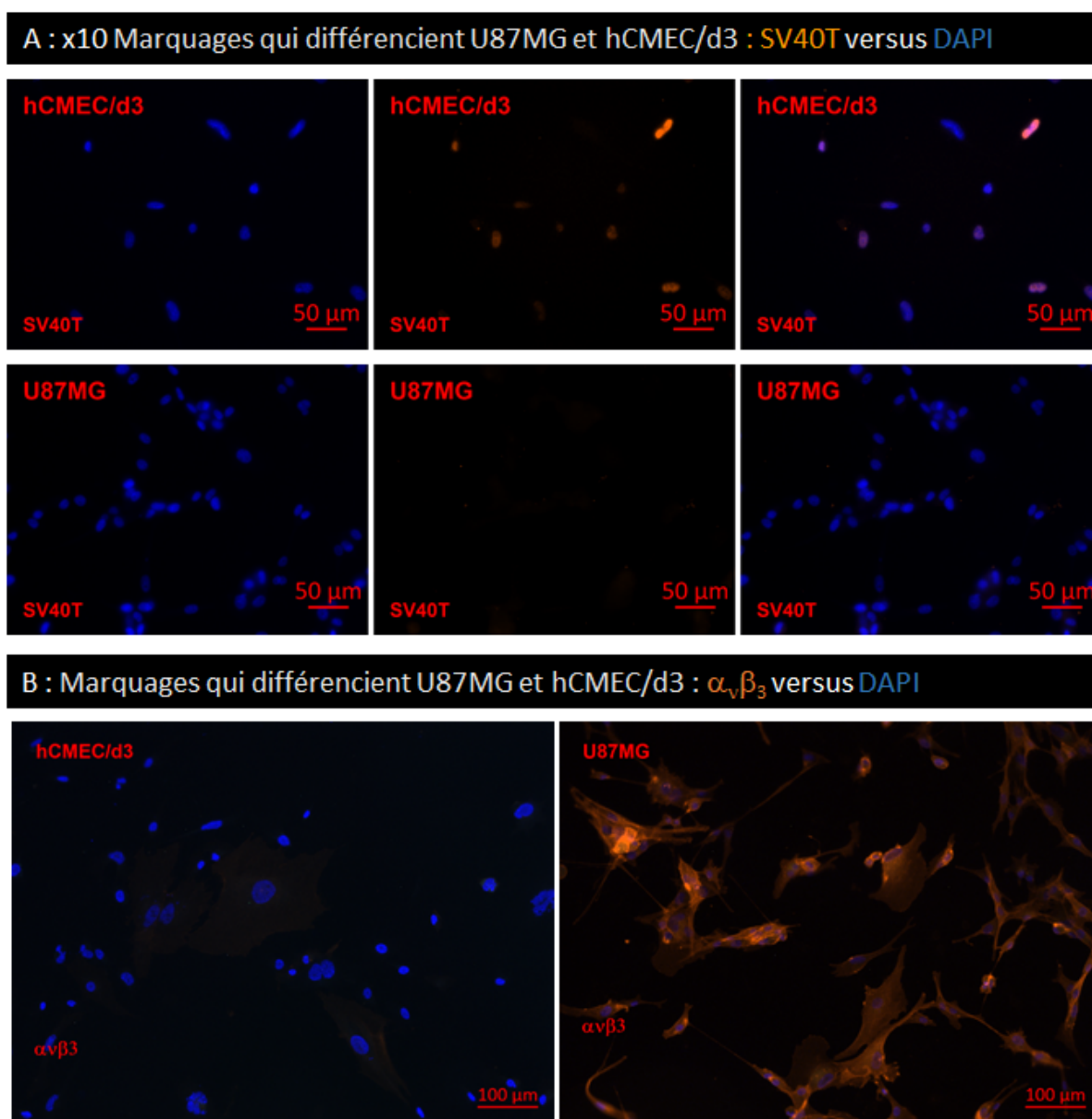


FIG. 4.5 – Immunocyto-marquages avec l'anticorps anti-SV40T (A) et l'anticorps anti- $\alpha_v\beta_3$ (B) sur les lignées cellulaires U87MG et hCMEC/D3, grossissement x10

La conclusion de ces études est que les meilleurs choix d'anticorps pour distinguer les deux lignées, cultivées ensemble et fixées, restent l'anticorps anti-SV40T et l'anticorps anti- $\alpha_v\beta_3$, bien que certaines cellules hCMEC/D3 expriment également l'intégrine et que certaines n'expriment que faiblement SV40T.

4.3.3 Culture des 2 lignées ensemble en 2D

J'ai commencé par étudier en culture 2D les modèles réalisés en cultivant ensemble les deux lignées (modèles bi-cellulaires), afin de déterminer quel milieu choisir et quelles concentrations cellulaires utiliser pour d'optimiser les conditions de culture en 3D. Dans un premier temps, j'ai mis en culture chacune des deux lignées dans le milieu de l'autre.

Les cellules tumorales U87MG sont capables de pousser dans le milieu de culture EGM2, milieu des cellules endothéliales hCMEC/D3, mais l'inverse ne fonctionne pas. Cependant, la croissance des cellules hCMEC/D3 n'est pas beaucoup perturbée par une dilution du milieu EGM2 dans le milieu de culture des cellules U87MG, au ratio (3 : 1), milieu nommé par la suite "milieu A". Ce milieu A a donc été utilisé pour les modèles bi-cellulaires, dans un premier temps.

Dans un deuxième temps, des variations ont été testées, avec l'ajout dans le milieu A d'acide hyaluronique (0,1%) ou 10 mM d'HEPES (milieu B). Un milieu C a également été préparé en enrichissant le milieu basal des cellules endothéliales (milieu EBM2), en facteur de croissance FGF2 20 ng/mL et 10 mM d'Hépès, mais sans utiliser de sérum ni les facteurs de croissance du milieu EGM2. L'acide hyaluronique est un composant de la matrice extracellulaire, il m'a paru intéressant de vérifier son impact en culture cellulaire en 3D. Le milieu C est appauvri en sérum, pouvant limiter les interactions indésirables avec des nanoparticules.

La Figure 4.6 reprend la composition des milieux testés, tout d'abord sur chaque lignée séparément puis sur les deux lignées cultivées ensemble en 2D puis en 3D.

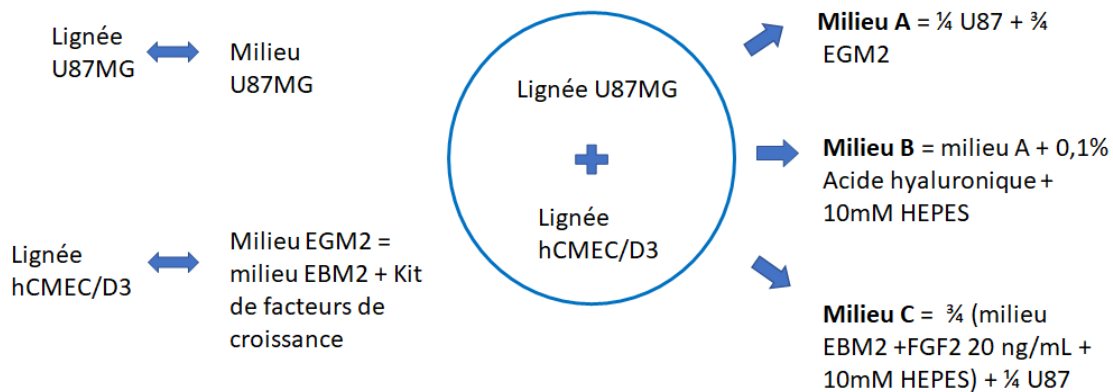


FIG. 4.6 – Variations des conditions de culture des lignées U87MG et hCMEC/D3, cultivées ensemble ou séparément, en 2D puis 3D

Ces milieux ralentissent néanmoins la croissance des cellules U87MG et encore plus des cellules hCMEC/D3 par rapport à leur milieu de culture respectif (voir Figure C.9, Annexe C.5.2). Malgré le ralentissement de la croissance des lignées cellulaires prises séparément, une première étude en 2D, en milieu C, a montré un développement satisfaisant des cellules tumorales, ainsi que l'apparition d'un marqueur d'angiogenèse, le facteur Von Willebrand dans les cellules endothéliales (voir Figure C.10 Annexe C.5.2) après six jours de culture.

Le milieu A a été préféré pour les modèles de culture cellulaire en 2D, étant le plus proche des milieux originaux en termes de croissance. Les deux lignées ont tout d'abord étéensemencées ensemble, au ratio 1 : 1. Le marquage par l'anticorps anti- $\alpha_v\beta_3$, ajouté dans le milieu de culture, permet de différencier les deux types cellulaires, comme montré en Annexe C.5.3 (Figure C.11). La croissance des cellules tumorales est plus rapide que celle des cellules endothéliales et le ratio 1 : 1 a été rapidement remplacé par un ratio 1 : 3, afin de conserver les deux lignées en culture, les cellules endothéliales étant rapidement submergées, après quelques jours (J9).

4.3.4 Modèles bi-cellulaires de culture cellulaire en 3D

Un premier modèle de culture 3D bi-cellulaire a consisté à mettre en contact les deux lignées en Matrigel™ 25% (modèle de type réseau). La Figure 4.7 montre le réseau, dont les cellules sont impossibles à différencier les unes des autres, réseau déposé sur boîte à fond de verre pour l'imagerie au microscope. Des structures longilignes faisant penser à des capillaires sont clairement visibles à J1 (images A et C). Gardé en vie en le recouvrant de milieu de culture, le réseau est capable de survivre et d'évoluer vers une structure de type sphéroïde, très dense, en six jours (images B et D). La matrice extracellulaire entourant les cellules dans le réseau est envahie petit à petit par les cellules en croissance.

Puis un deuxième essai a consisté à positionner un sphéroïde de cellules U87MG, obtenu par MGI et en croissance sur double couche de Matrigel™, sur un tapis de cellules endothéliales à J3 de croissance cultivées sur Matrigel™ 25%, puis de suivre l'évolution. Les interactions cellulaires en 3D entre les deux lignées sont rapidement nombreuses formant des structures de type capillaire en périphérie de la couronne de cellules tumorales, celle-ci ayant aussi fortement été activée par la présence des cellules endothéliales.

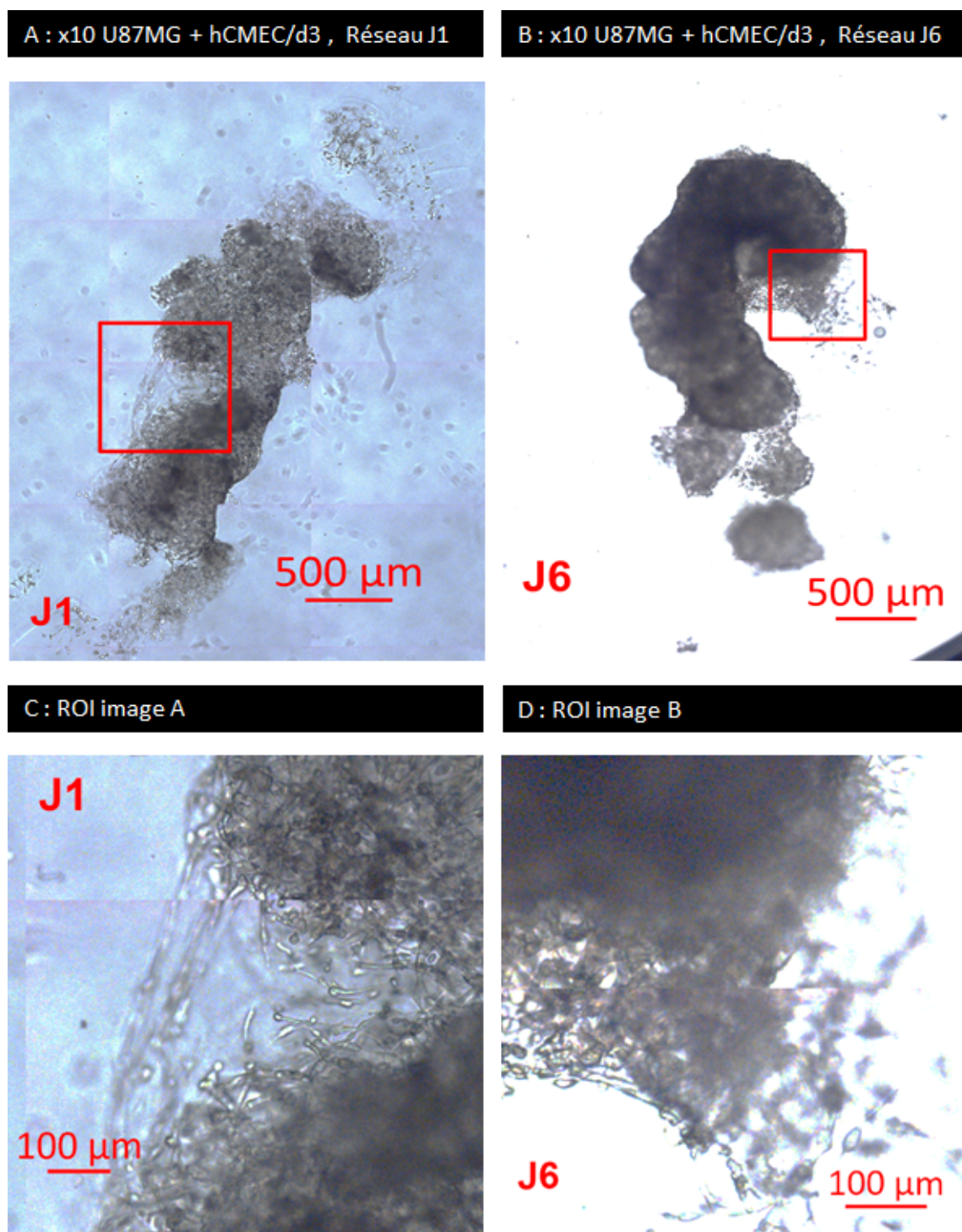


FIG. 4.7 – Réseau de cellules U87MG et de cellules hCMEC/D3, grossissement x10

La Figure 4.8 montre la croissance importante des cellules hCMEC/D3 en bordure de tumeur, faisant rapidement des structures 3D reliées avec le sphéroïde de cellules tumorales, alors que les cellules endothéliales seules en Matrigel™ 25% ne forment pas de capillaires comme déjà montré (Figure C.7, Annexe C.4).

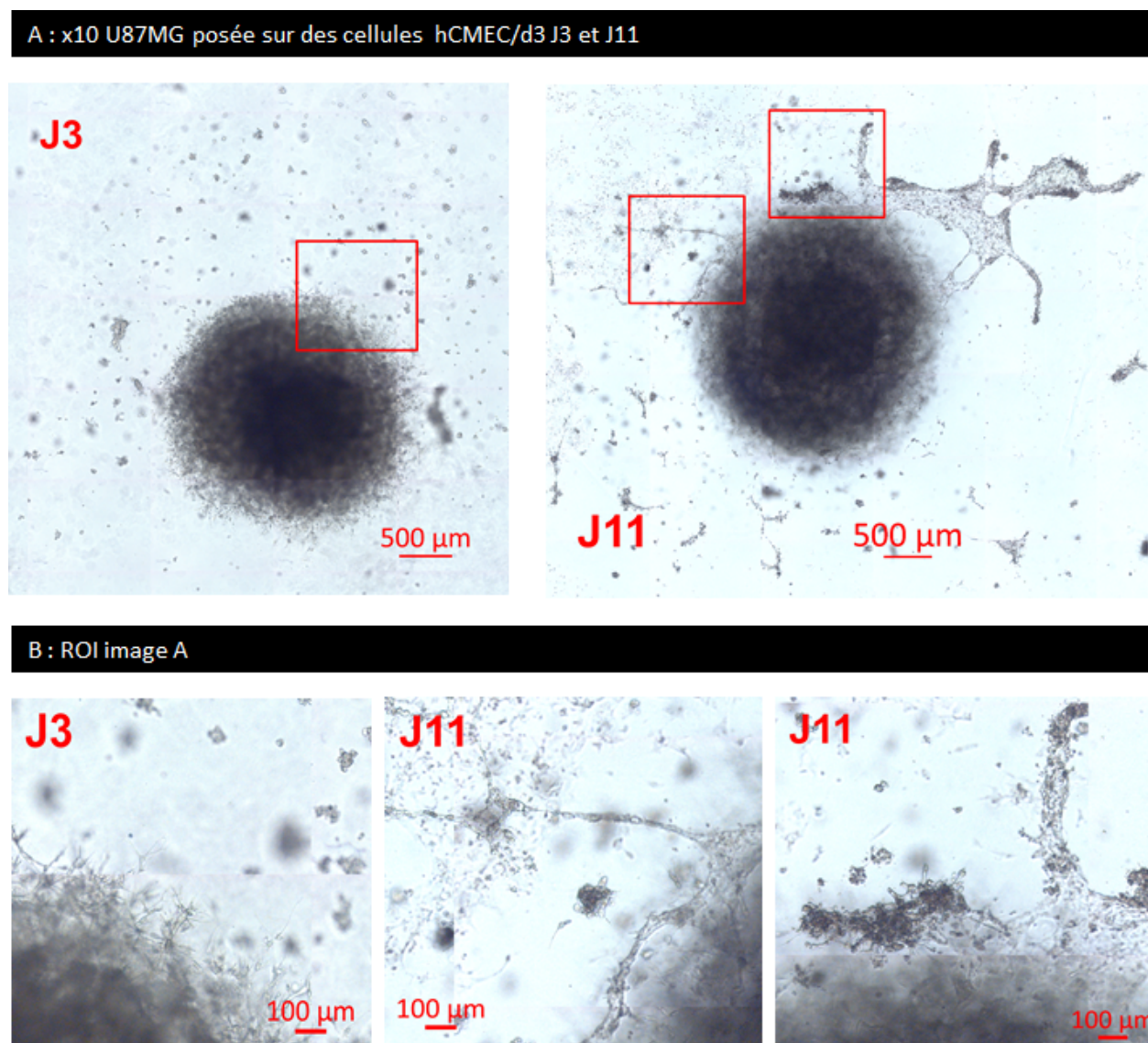


FIG. 4.8 – Comparaison de la croissance d'un sphéroïde de cellules U87MG à J3 et J11 après mise en contact avec des cellules hCMEC/D3, grossissement x10

Enfin, des sphéroïdes bi-cellulaires ont été réalisés par MGI, avec différents ratio de cellules, allant de (4×10^3 U87MG + $1,6 \times 10^5$ hCMEC/D3) à (10^5 U87MG + 3×10^5 hCMEC/D3)/mL, ($30 \mu\text{L/goutte}$). Toutes les concentrations testées donnent des sphéroïdes mais la concentration la plus élevée permet d'obtenir un sphéroïde plus grand, plus rapidement. La croissance est similaire à celle des modèles monocellulaires, mais placés sur une boîte à fond de verre, la propagation des sphéroïdes en 2D sur Matrigel™ 25% entraîne l'apparition de structures ressemblant à des capillaires, sans pouvoir définir comment sont répartis les cellules tumorales et les cellules endothéliales (Figure 4.9). Les sphéroïdes bi-cellulaires peuvent être congelés et décongelés comme les monocellulaires. Après décongélation, croissance et fixation puis découpe au cryostat, les sphéroïdes bi-cellulaires ne montraient plus que très peu de cellules hCMEC/D3, identifiées avec l'anticorps anti-SV40T.

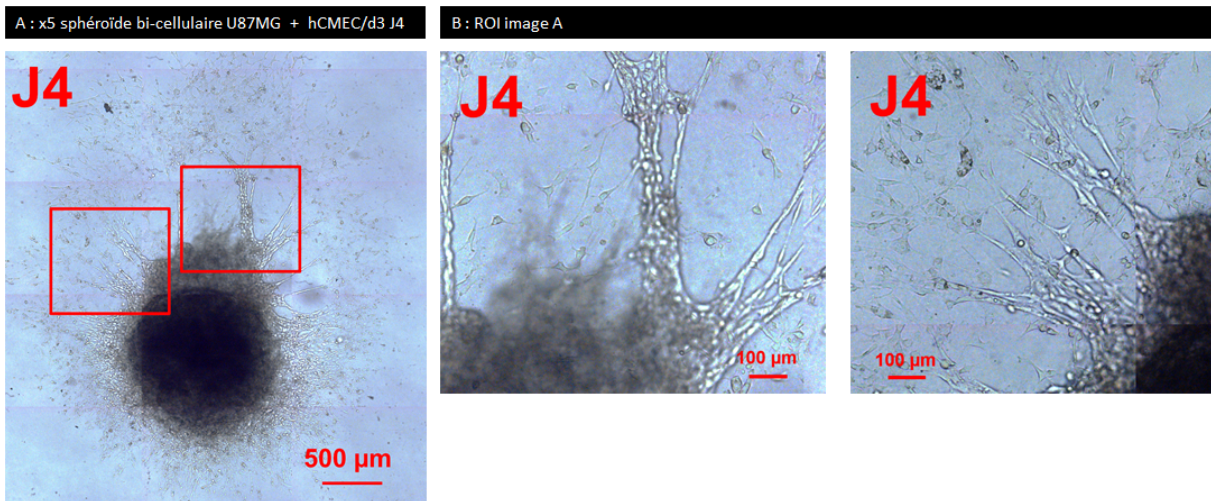


FIG. 4.9 – Sphéroïde de cellules U87MG + hCMEC/D3 à J4, grossissement x5

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer les observations sur :

- 1 : Les cellules endothéliales sont rapidement étouffées dans le sphéroïde préparé par la méthode MGI, à cause de la croissance des cellules U87MG, et les cellules hCMEC/D3 résiduelles se trouvant dans le cœur nécrotique, l'anticorps ne fonctionne pas.
- 2 : Les cellules hCMEC/D3 ne reprennent pas leur croissance de façon satisfaisante après la décongélation.
- 3 : Les cellules hCMEC/D3 sont essentiellement localisées en bordure externe et perdues à la fixation.
- 4 : L'anticorps anti-SV40T ne fonctionne pas sur coupes congelées.

Pour répondre à ces questions, pouvoir identifier les deux lignées en culture, vivantes, m'a paru essentiel pour caractériser au mieux le modèle bi-cellulaire.

Les conclusions de ce travail de développement de modèles de culture bi-cellulaires sont donc :

- Les cellules tumorales et les cellules endothéliales peuvent être cultivées ensemble, en 2D et 3D.
- La croissance des cellules U87MG est beaucoup plus rapide que celle des cellules endothéliales hCMEC/D3, différents milieux peuvent être utilisés pour influencer la croissance.
- Les sphéroïdes bi-cellulaires congelés puis décongelés reprennent leur croissance, mais le marqueur SV40T des cellules endothéliales n'apparaît plus.

4.4 Modèles bi-cellulaires de cellules colorées

Afin de distinguer plus facilement les cellules des deux lignées cellulaire cultivées ensemble, des marqueurs colorés ont été ajoutés aux cellules (Vybrant™, Thermo Fischer), permettant de les distinguer pendant plus de dix jours en culture cellulaire 2D. Les solutions de colorant cellulaire Vybrant™ passent la membrane cellulaire, sans nécessiter de perméabilisation, et sont retrouvées dans le cytoplasme après une incubation de 30 minutes. La fiche technique du fabricant est présentée en Annexe D.3. Les cellules U87MG ont été incubées avec un colorant rouge (Vybrant™ DID, ref V22887), les cellules hCMEC/D3 avec un colorant vert (Vybrant™ DIO ref. V22886). Puis les cellules ont été recueillies et ré-ensemencées dans un nouveau flacon de culture afin d'éliminer tout colorant résiduel accroché sur le support en plastique.

La Figure 4.10 montre les cellules U87MG-DID et les cellules hCMEC/D3-DIO après trois jours d'incubation. Les images A et B montrent chacune des lignées, cultivées séparément. L'image C montre les deux lignées ensemencées ensemble (à faible densité), sur une période de dix jours de croissance. On peut remarquer sur l'image D (ROI de l'image C à J5) que quelques cellules ont partagé leur colorant (flèches rouges), mais également qu'après dix jours certaines cellules ne sont déjà plus colorées (flèches bleues).

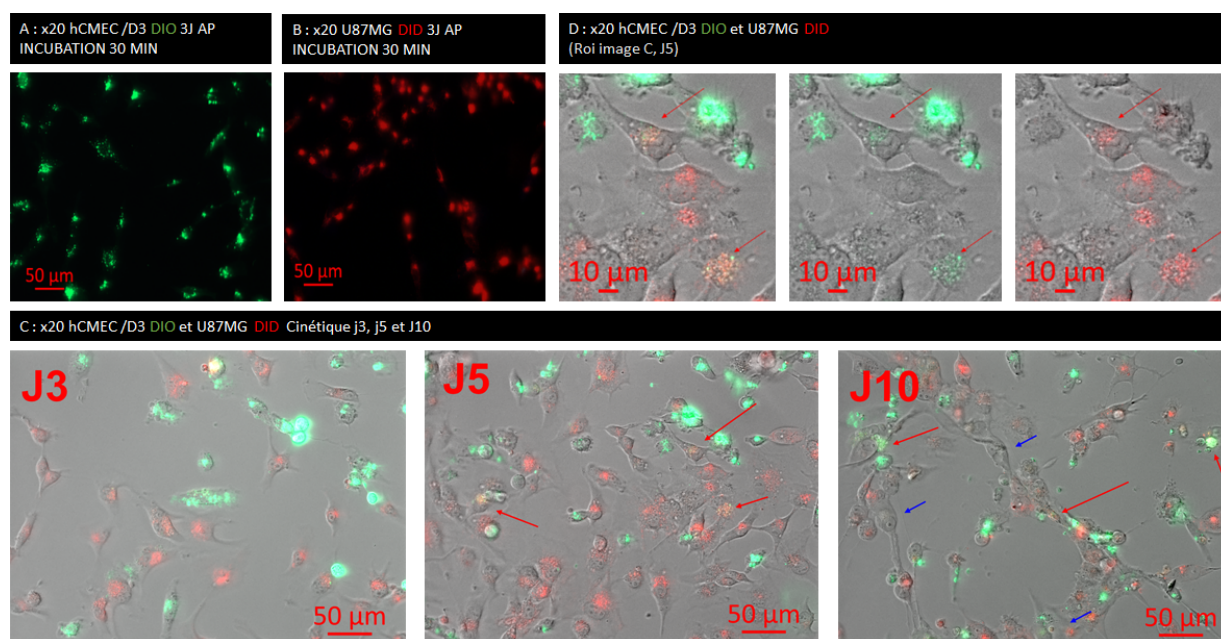


FIG. 4.10 – Coloration Vybrant™ des cellules U87MG (DID, rouge) et hCMEC/D3 (DIO, vert) cultivées en 2D pendant 3 jours (images A, B et C), 5 jours (images C et D) ou 10 jours (image C), grossissement x20

Les cellules colorées ont permis de réaliser des sphéroïdes bi-cellulaires, en gouttes inversées (75% hCMEC/D3-DIO, 25%U87MG-DID), même si la dilution des colorants de division en division diminue l'intérêt à long terme.

La Figure C.12 (Annexe C.6) illustre la croissance des sphéroïdes bi-cellulaire après un (image A), cinq (image B) et neuf (image C) jours dans une double couche de Matrigel™. Les deux types cellulaires sont bien présents au centre, il ne semble pas se produire de dégradation des cellules endothéliales. La résolution de l'image de la couronne dans le Matrigel™, ne permet cependant pas de vérifier si les cellules en bordure sont bien des deux types. Pour ce faire, un sphéroïde a été transféré après deux jours de croissance en Matrigel™, sur boîte à fond de verre pour réaliser des images mieux résolues au microscope.

La Figure 4.11 montre la croissance du sphéroïde bi-cellulaire sur la boîte à fond de verre, après six jours. Le sphéroïde forme des structures en bordure et les cellules envahissent rapidement la boîte autour du sphéroïde (image A). Les images prises en z-stack (image B) montrent que les cellules en bordure ont déjà beaucoup moins de colorants, limitant leur identification. L'image C, montrant à J4 et J10 les cellules les plus éloignées du cœur, révèlent une grande proportion de cellules bicolores, mais également quelques cellules de chacun des types cellulaires et une forte proportion de cellules non colorées.

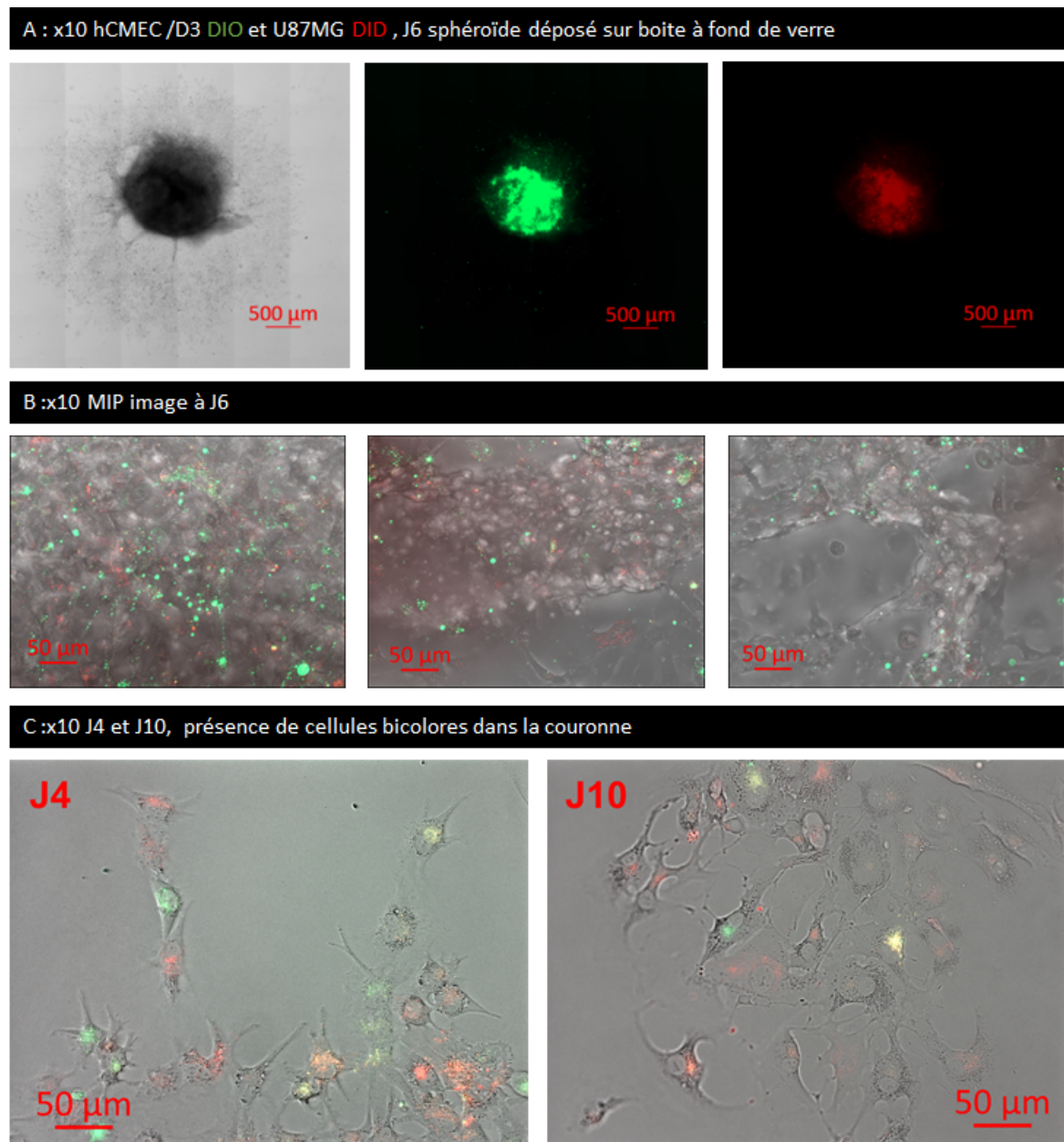


FIG. 4.11 – Coloration Vybrant™ des cellules U87MG (DID, rouge) et hCMEC/D3 (DIO, vert), cultivées en 3D pendant 6 jours (images A et B), 4 et 10 jours (image C) grossissement x10

Ces sphéroïdes, congelés puis décongelés, ne montrent plus de fluorescence, le colorant ne résistant pas à la congélation.

Les conclusions de ces expériences de développement de modèles bi-cellulaire de cellules colorées sont donc :

- Les cellules tumorales et les cellules endothéliales colorées avec les colorants Vybrant™ peuvent être cultivées ensemble dans les modèles 3D.
- La dilution des colorants lors de la croissance ne permet pas de suivre les cellules plus de quelques jours.
- La présence d'une plus grande quantité de cellules bi-colorées que de cellules d'une couleur permet de confirmer qu'il y a beaucoup plus d'interactions entre les types cellulaires en 3D qu'en 2D, comme attendu.
- La coloration Vybrant™ ne résiste pas à la congélation, limitant l'intérêt de ces colorants.

4.5 Modèles bicellulaires fluorescents

L'utilisation de colorant ne permettant pas de suivre les deux types cellulaires sur du long terme, il a été mis au point, par transfection, deux lignées fluorescentes. En effet, nous souhaitons pouvoir visualiser l'évolution des deux lignées tumorales et endothéliales, dans les sphéroïdes, indépendamment l'une de l'autre, avec et sans étape de congélation. La congélation des sphéroïdes permet de gagner du temps pour la préparation des modèles, mais uniquement si les deux lignées sont bien présentes après avoir décongelé les sphéroïdes.

4.5.1 Transfection

Les protocoles suivis sont présentés en Annexe A.10. Les cellules hCMEC/D3 ont été transfectées en vert, avec un plasmide permettant l'expression de la protéine pZgreen. Les premiers essais, avec le kit GeneCellin™, s'étant avérés décevants, le kit jetOPTIMUS™ a été utilisé. Trois transfactions successives ont cependant été nécessaires pour obtenir une lignée 100% fluorescente bien que d'intensité assez variable, et au fil du temps un sous-clonage a été nécessaire pour éliminer les cellules qui se sont débarrassées du plasmide, une partie des cellules n'ayant pas acquis une transfection stable.

Les cellules U87MG ont été transfectées en rouge avec un plasmide permettant l'expression de la protéine E2-Crimson. Elles se sont avérées difficiles à transfecter, ne supportant qu'un faible pourcentage de l'antibiotique de sélection (G418, 0.5%) et n'acceptant que peu de plasmides. Trois transfactions successives ont cependant permis d'obtenir des cellules suffisamment fluorescentes. Malheureusement, le ratio cellules survivantes/cellules transfectées n'a pas atteint 100% sous peine de tout perdre à la sélection. Deux sous-clonages par dilution limite ont été nécessaires (protocole décrit à l'Annexe A.11), le premier ayant généré un sous-clone dont la rapidité de croissance était significativement plus faible que la lignée originelle.

La Figure 4.12 illustre les deux lignées cellulaires fluorescentes obtenues, en culture 2D, ainsi que la vérification par immunomarquage de l'expression du marqueur SV40T pour hCMEC/D3 (image A) et de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ pour U87MG (image B). L'image C montre que la lignée de cellules endothéliales fluorescentes n'a pas perdu sa capacité à se développer en capillaires sur Matrigel™ 100%. L'image D montre l'interaction des capillaires avec les cellules U87MG E2-Crimson, ajoutées après trois jours de croissance des cellules endothéliales.

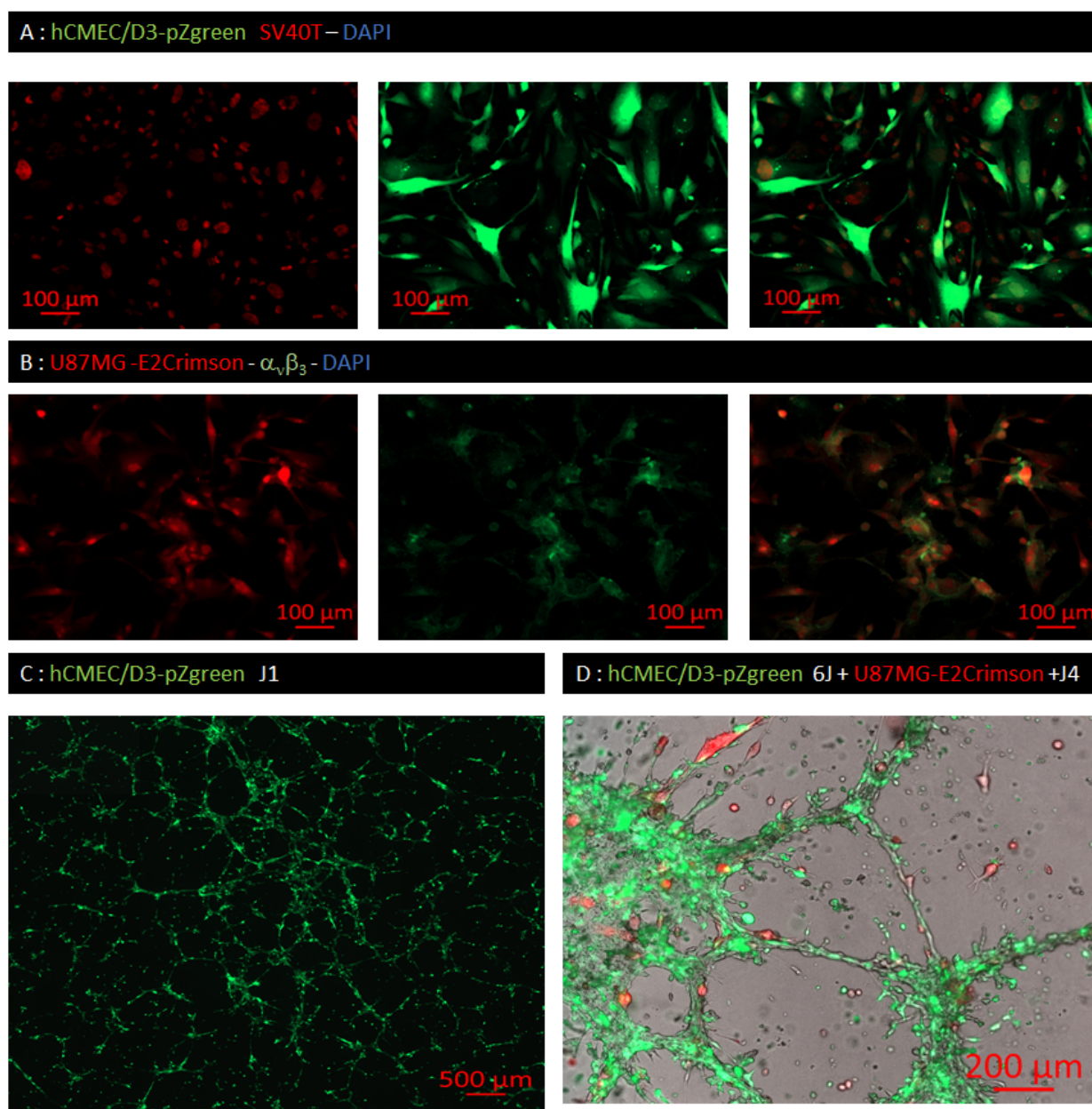


FIG. 4.12 – Immunomarquages avec les anticorps anti-SV40T (Image A, en rouge) sur les cellules hCMEC/D3 pZgreen et l'anticorps anti- $\alpha_v\beta_3$ (Image B, en vert) sur les cellules U87MG E2-Crimson, croissance des lignées transfectées sur Matrigel™ (Images C et D), grossissement x10

4.5.2 Modèles réalisés avec les cellules fluorescentes

U87MG WT+ hCMEC/D3 pZgreen

Les premières cellules transfectées avec succès ont été les cellules hCMEC/D3. Une première vérification des hypothèses évoquées au Paragraphe 4.3.4 a consisté à réaliser des sphéroïdes monocellulaires hCMEC/D3, sous agitation. Une fois fixés (PFA 4%), congelés puis coupés, ils ont été utilisés pour vérifier la présence du marqueur SV40T sur les coupes par immunomarquage, ainsi que le maintien de la fluorescence intrinsèque. La Figure 4.13 montre le sphéroïde vivant (image A) et une coupe du même sphéroïde après fixation, congélation, découpe et immunomarquage avec l'anticorps anti-SV40T (image B). L'anticorps est donc fonctionnel sur coupe congelée et la fluorescence des cellules transfectées ne diminue pas après congélation.

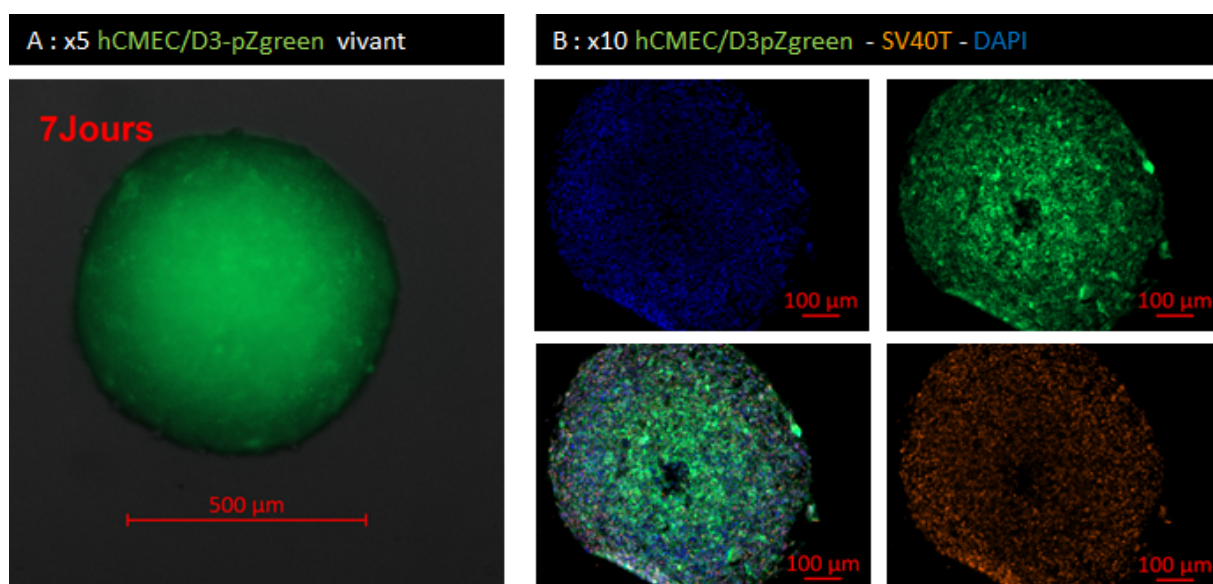


FIG. 4.13 – Sphéroïdes hCMEC/D3-pZgreen vivant (grossissement x5, image A) et en coupes (grossissement x10, image B)

Les premiers modèles bi-cellulaires ont été réalisés avec les cellules U87MG WT et avec les cellules endothéliales fluorescentes. Deux modèles de sphéroïdes ont été comparés :

- un modèle sous agitation en plaque CELLSTAR™ Cell-Repellent ;
- un modèle par enrobage de Matrigel™.

Chaque modèle a été préparé à différentes concentrations en milieux A et C, le modèle par enrobage en Matrigel™ ayant été réalisé en 50% et 100% de matrice extracellulaire. Les sphéroïdes obtenus, après huit jours sous agitation, ont été déposés dans une bi-couche de Matrigel™, sans agitation.

Les sphéroïdes préparés sous agitation en plaque CELLSTAR™ Cell-Repellent, quelle que soit la concentration utilisée, même faible, correspondent à des sphéroïdes bi-cellulaires. La taille du sphéroïde dépend de la concentration initiale : en sept jours, le sphéroïde obtenu atteint environ 500 à 1000 μm en fonction de la densité d'ensemencement initiale. Les conditions retenues sont de 1×10^5 U87MG + 3×10^5 hCMEC/D3 /mL, 0,5 ml/puits. L'image A de la Figure 4.14 montre les sphéroïdes obtenus en milieux A et C, et leur croissance une fois remis en Matrigel™, sans agitation, est présentée sur l'image B.

Les sphéroïdes préparés en enrobage de Matrigel™ 50%, à très faible concentration (200 cellules U87MG+ 600 cellules endothéliales), ne se développent pas. Il faut atteindre une concentration dix fois supérieure pour observer un envahissement de tout le gel. Après sept jours, les cellules sont encore distinguables. L'image C de la Figure 4.14 montre un sphéroïde obtenu en milieu A et sa croissance une fois remis sur une couche de Matrigel™, sans agitation. Le sphéroïde obtenu en milieu C préparé dans les mêmes conditions, a été perdu lors des changements de milieu.

Les sphéroïdes préparés en enrobage de Matrigel™ 100%, à une concentration minimale de 6000 cellules U87MG + 9000 cellules endothéliales, se développent très rapidement et après quelques jours, les cellules ne sont plus distinguables les unes des autres. À concentration dix fois plus élevée, l'envahissement de l'ensemble de la matrice est complet après trois jours environ.

L'image D de la Figure 4.14 montre les sphéroïdes obtenus en milieux A et C, et leur croissance une fois remis en Matrigel™, sans agitation, est présentée à l'image E.

L'image F est une ROI de l'image E : le sphéroïde en Matrigel™ 100% en milieu C est le seul qui montre des cellules endothéliales à la couronne externe, toutes les autres conditions montrant uniquement des cellules non fluorescentes (donc U87MG WT) à la couronne.

Ces résultats montrent qu'il est possible d'obtenir des sphéroïdes bi-cellulaires en condition sous agitation directement ou en billes de Matrigel™. Les densités d'ensemencement conditionnent la taille du sphéroïde obtenu sous agitation. Le milieu de culture C ralentit fortement la croissance des cellules endothéliales par rapport aux cellules tumorales, ce qui ralentit la croissance du sphéroïde dans son ensemble.

Déposés sur une couche de Matrigel™, les sphéroïdes obtenus, quelle que soit la méthode, reprennent une croissance 2D, avec un net avantage des cellules tumorales qui envahissent très rapidement le pourtour du sphéroïde, en milieu A. En milieu C, la croissance est ralentie et la couronne est beaucoup moins développée, même si elle comprend quelques cellules endothéliales.

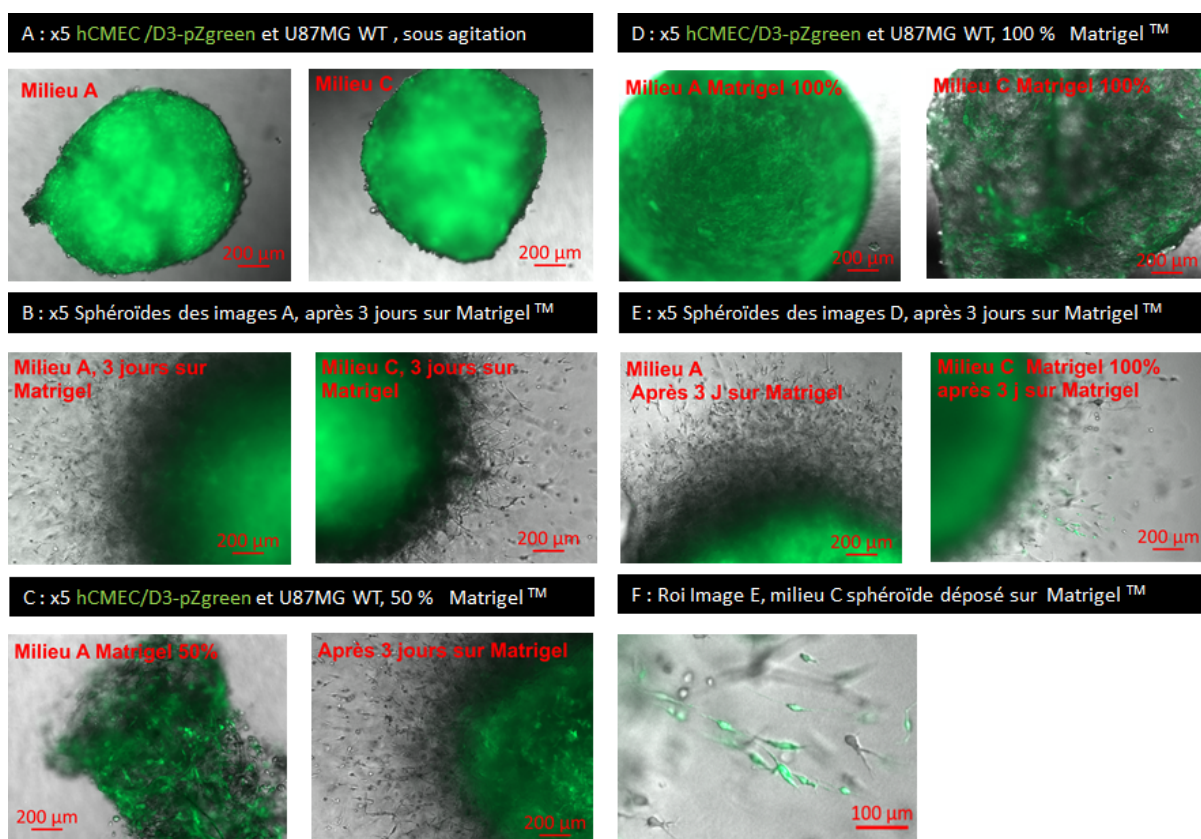


FIG. 4.14 – Sphéroïdes de cellules U87MG WT et hCMEC/D3-pZgreen, cultivés sans Matrigel™ (A et B), en enrobage de Matrigel™ 50% (C) ou 100% (D et E) grossissement x5

U87MG E2-Crimson + hCMEC/D3 pZgreen

Quelques sphéroïdes bi-cellulaires ont été réalisés avec le premier clone de lignée U87MG E2-Crimson, dont la croissance était trop lente pour être satisfaisante. Bien que le clone ne soit pas optimal, la création de sphéroïdes bi-cellulaires fluorescents par la méthode sous agitation en plaques CELLSTAR™ Cell-Repellent, en milieu A, a montré une intrication des cellules les unes par rapport aux autres. Les deux lignées sont clairement bien visibles dans les sphéroïdes, même après plusieurs jours de croissance.

Les sphéroïdes ont été pour une partie fixés au PFA 4% pendant 15 minutes, afin d'être utilisés en microscopie pour vérifier la compatibilité avec les processus de transparisation, évoqués au Chapitre 5. Les autres ont été congelés puis décongelés, et mis en croissance en Matrigel™, afin de vérifier si les cellules hCMEC/D3 ne reprennent pas leur croissance après la décongélation (hypothèse 2, paragraphe 4.3.4).

La Figure 4.15 montre les sphéroïdes en croissance sous agitation pendant sept jours (image A), puis congelés et décongelés, avant d'être de nouveau laissés en croissance sur une couche de matrice extracellulaire pendant huit jours (image B). L'image B montre, comme cela a déjà été observé précédemment, que la couronne en croissance est formée de cellules tumorales quasi exclusivement.

Les cellules tumorales se sont développées après la congélation, alors que les cellules endothéliales ne redémarrent pas leur croissance à la couronne. Les échanges cellulaires entre les deux lignées sont visibles dans quelques cellules U87MG qui ont acquis un peu de matériel pZgreen (image D).

L'image C montre une image prise en apotome après transparisation. La solution de transparisation GClear17d3 permet de réaliser une image du sphéroïde sur quelques centaines de μm , sans perte de fluorescence. Cette solution est décrite dans le Chapitre Transparency (Paragraphe 5.3.2).

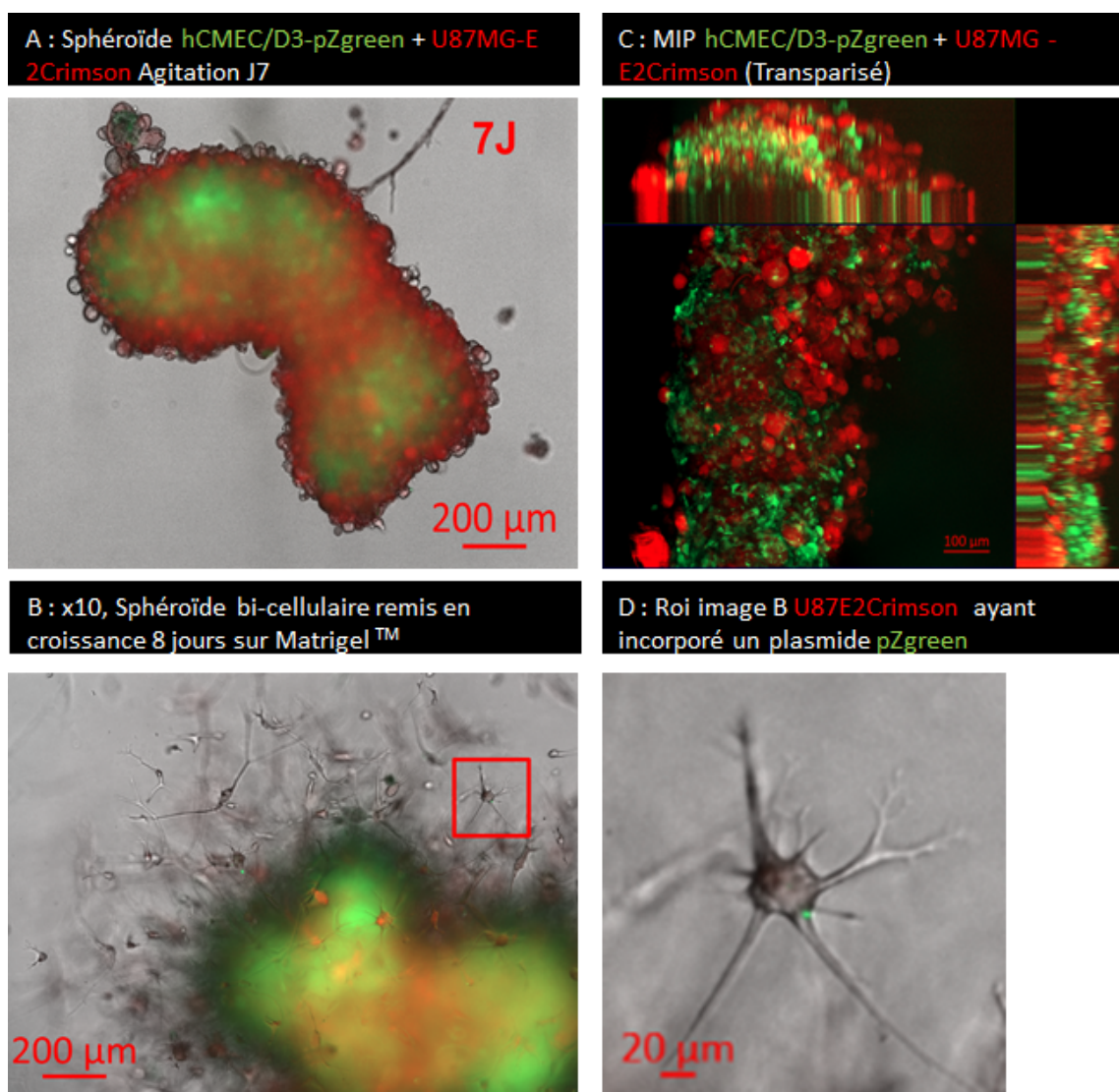


FIG. 4.15 – Sphéroïde U87MG E2-Crimson et hCMEC/D3 pZgreen vivant sous agitation (grossissement x5, image A), sur Matrigel™ (grossissement x10, image B), après transparisation (MIP, grossissement x5, image C), et une ROI de l'image B (image D)

Puis un sous-clone U87MG E2-Crimson ayant une vitesse de croissance satisfaisante a été sélectionné et la même étude a été réalisée en comparant les milieux A et B. La Figure C.13 (voir Annexe C.7) montre que les résultats obtenus sont identiques, confirmant de fait l'hypothèse 2 à savoir que les cellules endothéliales ne semblent pas être capable de reprendre leur croissance après décongélation dans les sphéroïdes. Dans ces conditions (création sous agitation en plaque CELLSTAR™ Cell-Repellent), les milieux A et B donnent des résultats très similaires.

Les milieux A, B et C ont été testés en condition “enrobage” de Matrigel™ 25 et 50% versus la condition préparation sous agitation, sans Matrigel™. La Figure 4.16 montre la différence de croissance obtenue en fonction des conditions testées. La concentration du Matrigel™ utilisée a un fort impact sur la croissance en milieu B et C. En effet, à la concentration de 50%, la croissance est fortement ralentie par rapport à la croissance en milieu A (image A).

Il faut noter cependant, en milieu C après dix jours, l'apparition de structures de type microcapillaires dans la matrice, comme celles observées en 2D. La différence de croissance est moins importante en Matrigel™25% , bien que le ratio cellules tumorales/endothéliales semble s'inverser après sept jours de croissance en comparant les milieux A et C (image B). Enfin, la croissance sans Matrigel™ en milieu C montre un net avantage à la croissance des cellules tumorales, par rapport aux milieux A et B (image C).

Ces résultats soulignent l'importance du milieu de culture et de l'environnement pour la croissance des modèles bi-cellulaires. En effet, si le milieu A semble garantir un ratio assez équilibré entre les cellules U87MG et hCMEC/D3, les cellules tumorales sont cependant retrouvées plus en périphérie, sauf dans la condition 50% de matrice extracellulaire. En milieu B, la densité élevée de matrice extracellulaire semble réduire à néant la croissance des cellules endothéliales, alors qu'une concentration plus faible ou nulle de Matrigel™ permet de retrouver une bonne croissance des cellules endothéliales, y compris en périphérie. En milieu C, une densité élevée de matrice extracellulaire diminue fortement la croissance des deux lignées, mais favorise l'apparition de microstructures. Une densité moyenne favorise les cellules endothéliales, alors que sans matrice extracellulaire les cellules tumorales reprennent l'avantage.

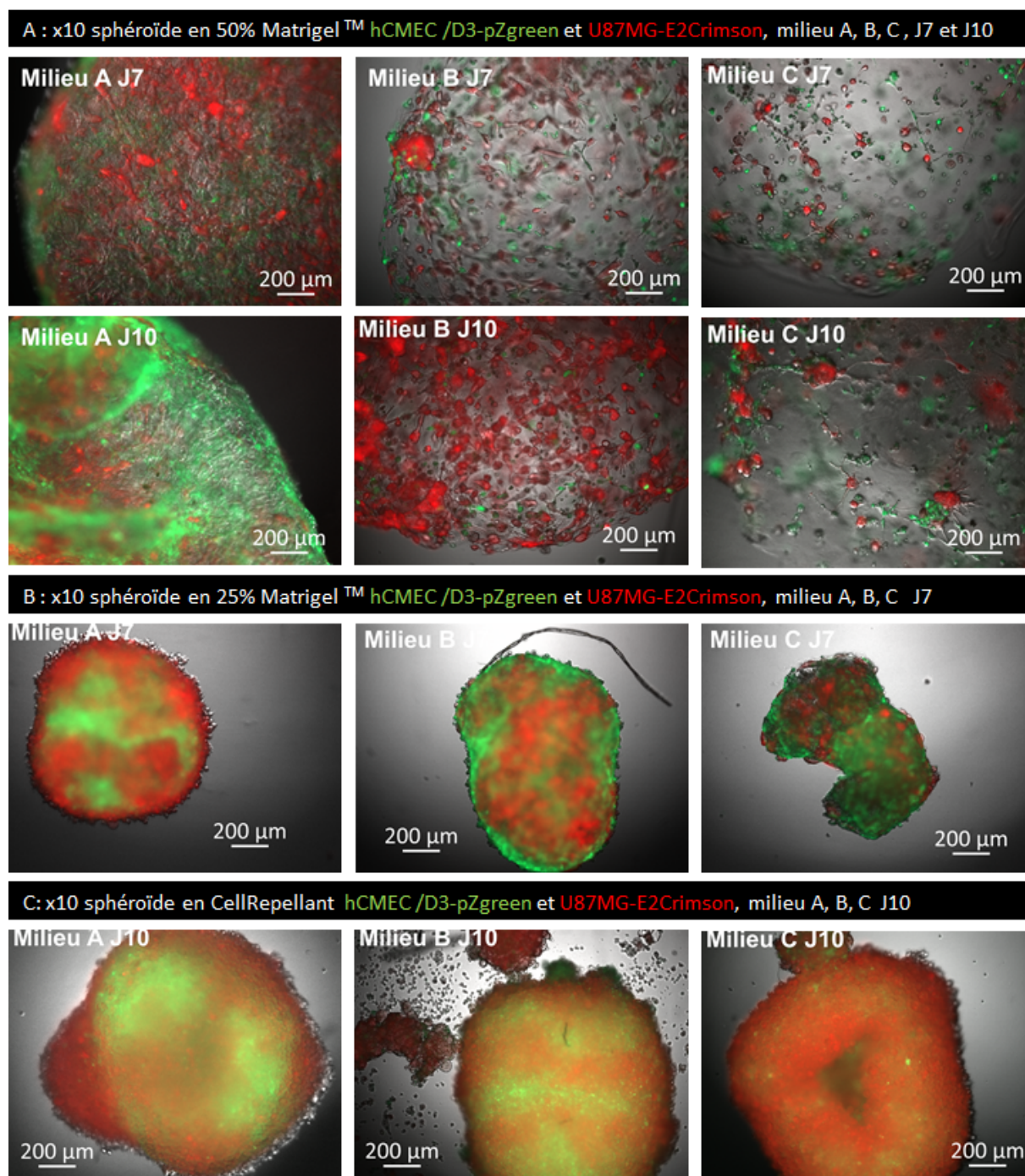


FIG. 4.16 – Sphéroïdes de cellules U87MG E2- Crimson et hCMEC/D3 pZgreen, comparaison milieux A, B et C, en condition 50% Matrigel™ (A), 25% Matrigel™ (B) ou sans Matrigel™, grossissement x10

Des développements futurs sont envisagés pour améliorer la production de ces modèles, par exemple en faisant croître les cellules endothéliales dans un hydrogel plus structuré (comme la matrice Biomimesys™ commercialisé par HCS Pharma) avant d'ajouter les cellules tumorales.

La stimulation de la formation des microtubes à l'aide de molécules pro-angiogéniques, comme par exemple l'urotensine II (UII, pour Urotensine II) [Le Joncour *et al.*, 2021], le cannabidiol [Luo *et al.*, 2019] ou de l'angiopoïétin-1 [Pafumi *et al.*, 2015]. Une autre approche peut être l'utilisation de concentrations en facteurs de croissance plus élevée que celles présentes dans le milieu EGM2. Le VEGF est le facteur de croissance le plus important dans la croissance vasculaire [Moccia *et al.*, 2019]. L'ajout dans le milieu de cytokines (IL-8, pour interleukin-8) [Dwyer *et al.*, 2012] pourrait également stimuler la vasculogénèse et également les interactions avec les cellules tumorales. L'ajout d'une lignée immortalisée de cellules microgliales est également envisagée, afin de mimer l'envahissement de la tumeur par les cellules microgliales.

Les conclusions de ces expériences de développement de modèles bi-cellulaires de cellules fluorescentes sont donc :

- Les modèles bi-cellulaires peuvent être maintenus en croissance sous agitation.
- Les conditions d'ensemencement et de milieu de culture ont un fort impact sur les sphéroïdes, une croissance ralentie modifiant la structure interne du sphéroïde.
- Une fois que les sphéroïdes ont été remis en culture en 2D en double couche de Matrigel™, les cellules tumorales prennent le pas sur les cellules endothéliales, réduisant l'intérêt de cette méthode de croissance.
- La congélation/décongélation des sphéroïdes bi-cellulaires ne permet pas de retrouver une croissance normale des cellules endothéliales, contrairement au modèle monocellulaire U87MG ; ces modèles devront être préparés *de novo* pour chaque étude.

4.6 Applications des modèles de culture cellulaire 3D

4.6.1 Projet Iseult

J'ai utilisé la lignée U87MG pour créer des sphéroïdes monocellulaires, que j'ai pu garder en culture jusqu'à atteindre une taille très importante (de l'ordre de 1 cm). Une communication pour le congrès international WMIC (poster) a été réalisée, présentée en Annexe C.1, portant sur l'utilisation de ces modèles cellulaires en 3D *in vitro* pour des applications IRM. Ce poster reprend les résultats obtenus en imagerie IRM pour tester l'incorporation d'un agent de contraste fonctionnalisé dans les cellules U87MG. Après trois heures d'acquisition IRM, sans ajout de milieu, sans oxygénation, maintenues environ à 37°C par une soufflerie d'air sur le tube, les cellules en réseau sont encore en vie à 93%, les cellules des sphéroïdes seulement à 65% mais dans leur globalité (cœur nécrotique compris).

L'acquisition d'images IRM *in vitro* sur ces sphéroïdes 3D est donc possible sur une durée significative (trois heures), sans matériel de survie, sachant que ce type de matériel (milieu oxygéné et à température de 37°C) est difficile à mettre en œuvre en environnement aimantique pour des canners IRM à très haut champ magnétiques.

Une autre étude a été réalisée, en utilisant les cellules actives de la couronne du sphéroïde pour réaliser des implantations orthotopiques chez l'animal. Brièvement, les cellules de la couronne du sphéroïde ont été prélevées par ponction à la seringue Hamilton et gardées sur glace. Les animaux ont été implantés comme décrit au Chapitre 2 (Paragraphe 2.3.1), mais au lieu d'injecter une suspension cellulaire, ce sont des cellules de la couronne qui ont été implantées. Cette méthode permet d'obtenir des tumeurs avec beaucoup moins de cellules, entre 10 000 et 15 000 au lieu des 120 000 cellules de la méthode classique. La numération a été réalisée le lendemain de l'implantation sur des prélèvements similaires sur les mêmes sphéroïdes, dissociés à l'aide d'enzymes (trypsine et collagénase IV).

La Figure 4.17 montre la croissance des tumeurs obtenues (courbes colorées), en comparaison avec le modèle classique (courbes noires).

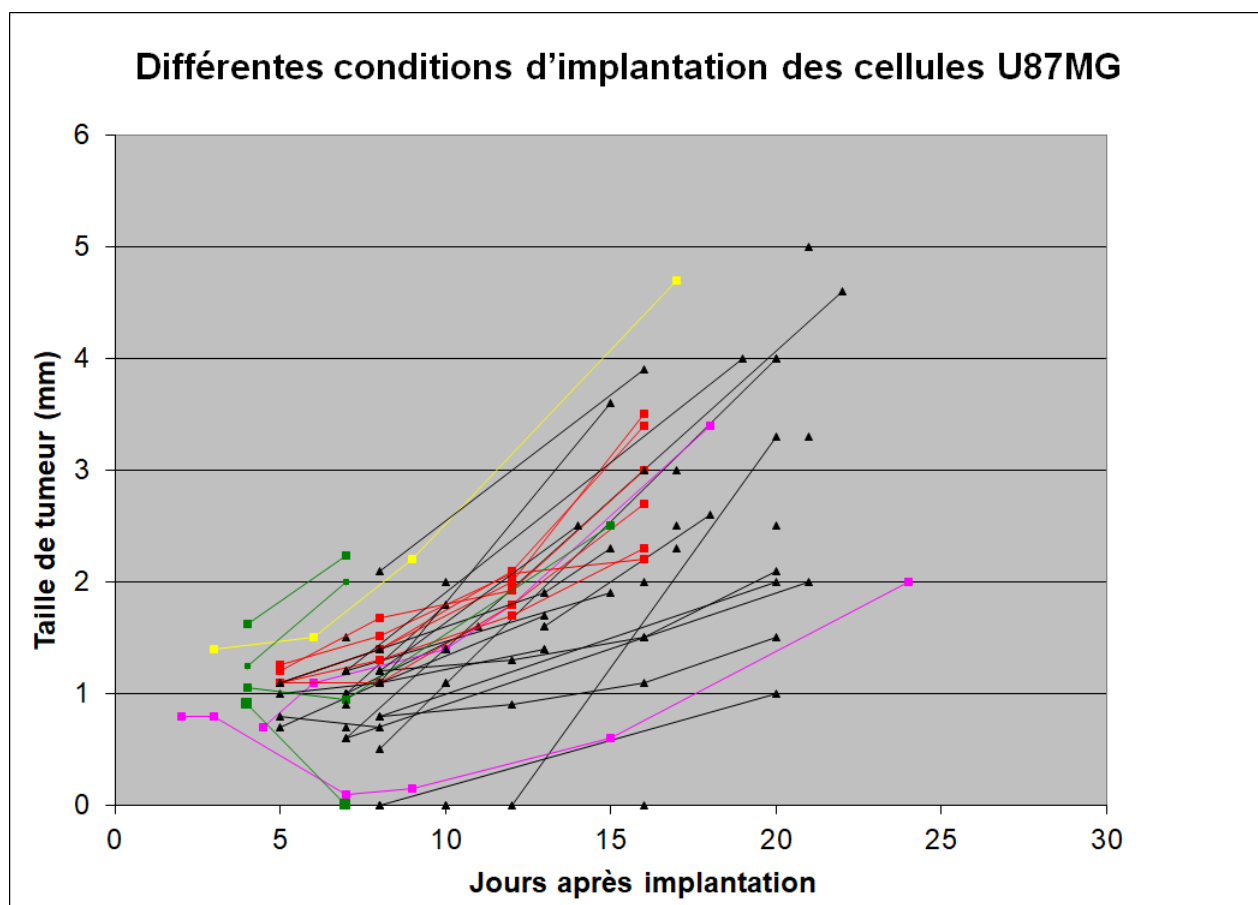


FIG. 4.17 – Implantation de cellules issues de sphéroïdes U87MG *in vivo*

L'endroit du prélèvement a une grande importance, entraînant soit une croissance très rapide (prélèvement sur la bordure la plus externe, courbe jaune), soit une croissance plus lente (prélèvement trop proche du cœur nécrotique, courbe rose). Le prélèvement dans la zone médiane (courbes vertes) ne donnait que des tumeurs soit trop agressives soit pas assez. Après avoir enlevé la bordure la plus externe (courbes rouges), les prélèvements dans la zone médiane donne les résultats les plus reproductibles, avec une croissance légèrement plus rapide que le modèle classique (courbes noires).

Ce modèle n'a pas été utilisé par la suite dans ce projet, les études des produits de contrastes ayant débutées avec le modèle classique, le coût élevé du Matrigel™ a aussi été un facteur pris en considération. Cependant, les travaux réalisés ont permis d'envisager l'utilisation de sphéroïdes pour les études *in vivo* et pas seulement *in vitro*. Cette option sera également testée lors du projet Orano.

Les conclusions de cette partie sont donc :

- Les modèles cellulaires 3D que nous avons développés peuvent être utilisés en IRM, même pour des temps d'acquisitions longs.
- Les modèles cellulaires 3D que nous avons développés peuvent être utilisés pour générer des modèles tumoraux *in vivo*, avec dix fois moins de cellules.

4.6.2 Projet Mefisto

Les modèles 3D ont rapidement été évoqués au Paragraphe 2.2.7 du Chapitre 2 (Projet Mefisto) : le but était de déterminer si ces modèles pouvaient à terme limiter le recours aux animaux pour des tests préliminaires, comme la détermination de la dose efficace d'agent de contraste par exemple.

Durant le projet Mefisto proprement dit, les modèles utilisés ont été tout d'abord le modèle réseau puis les sphéroïdes monocellulaires de cellules U87MG, obtenus en MGI, avec croissance en double couche de Matrigel™ 15 et 25%.

Le modèle réseau a permis de comparer l'incorporation des protéines Venus et VenusRGD dans les cellules U87MG, en 3D. Les cellules sontensemencées en Matrigel™ 25% contenant directement les protéines (concentration de 0,66 $\mu\text{g}/\text{mL}$), incubées quatre jours puis rincées deux heures dans du milieu, avant d'être remises en Matrigel™ pour deux jours. La Figure 4.18 illustre bien la différence d'incorporation des fluorophores en fonction de la présence ou non du peptide RGD.



FIG. 4.18 – Cellules U87MG en réseau, quatre jours d'incubation avec Venus et VenusRGD, versus non traitées, grossissement x10

Ces premiers résultats encourageants en réseau 3D nous ont incités à mettre des sphéroïdes déjà constitués (préparés par la méthode MGI) en contact avec les fluorophores couplés ou non, introduits directement dans la couche de gel. L'incorporation a été très faible : la couronne des sphéroïdes, plus dense que le réseau, n'a finalement incorporé que très peu de protéines. Afin d'améliorer la mise en contact, les sphéroïdes ont été sortis de la matrice extracellulaire, pour incubation dans le milieu de culture, sans agitation, durant deux à quatre jours, puis rincés durant deux jours. La Figure C.14 (Annexe C.8.1) montre les résultats obtenus, malheureusement moins intéressants que ceux de l'essai réalisé en réseau, du fait du manque de reproductibilité entre les sphéroïdes.

Divers tests ont néanmoins été réalisés avec les magnétosomes AMB1V et AMB1VRGD, en mettant en contact les particules (2 mg/L) et les sphéroïdes. Un rinçage à l'aide d'aimants disposés sur le côté de la boîte a été tenté, sans succès. Le guidage magnétique est une voie intéressante pour manipuler les nanoparticules de fer par rapport à certaines cibles cellulaires, néanmoins la viscosité de la matrice extracellulaire dans ces conditions n'a pas permis d'éliminer les magnétosomes en excès. Ces essais ont été jugés non concluants et l'utilisation des sphéroïdes a été stoppée pour le projet Mefisto. Des sphéroïdes ont cependant été passés en imagerie IRM, comme lors du projet Iseult, pour vérifier que le fer incorporé, même présent qu'à la surface, est décelable en IRM dans ces conditions, ce que confirme la Figure 4.19 (baisse de la valeur de T_2 lors des traitements avec des magnétosomes).

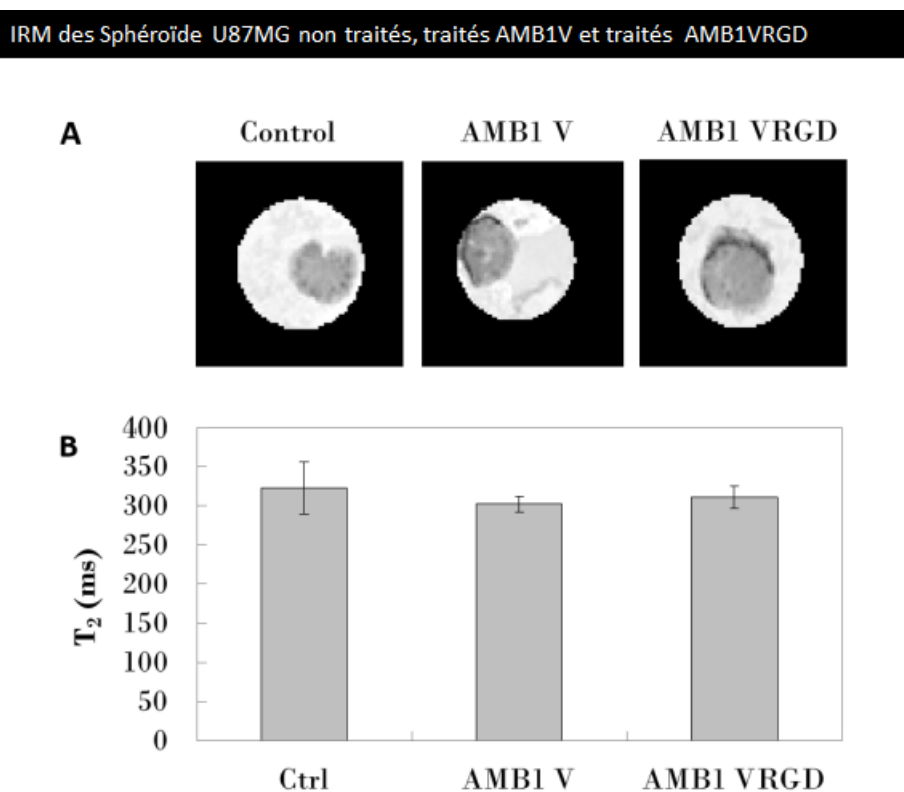


FIG. 4.19 – Sphéroïdes de cellules U87MG traités AMB1VRDG vs AMB1V vs non traités, images IRM quantitatives T₂

Plusieurs années après la fin du projet Mefisto, l'acquisition de l'agitateur qui est placé dans l'incubateur a permis de réaliser d'autres études. Les premiers modèles produits dans ces conditions ont été les microsphéroïdes monocellulaires U87MG, créés en flacons de culture non adhérents standards, avec mise en contact avec les magnétosomes directement dans le milieu de culture, non modifié, sous agitation (30 tours/min), 24 ou 48 heures avant d'être déposés sur une boîte à fond de verre pour adhésion 24 heures, puis fixés au PFA 4% pour réaliser des immunomarquages et des colorations. Une description succincte des protocoles de traitement est présentée en Annexe C.8.

Le premier essai a consisté à mettre en contact les microsphéroïdes avec les magnétosomes AMB1-V versus AMB1-VRGD, à la concentration de 250 $\mu\text{g}/\text{L}$ pendant 24 heures, sous agitation. Un immunomarquage "in&out" avec l'anticorps anti-AMB1 comme déjà décrit au Chapitre 2 (Paragraphe 2.2.5), associé à l'anticorps anti- $\alpha_v\beta_3$, a été réalisé. Les acquisitions ont été faites avec le module Apotome, permettant de faire des images en profondeur et des reconstructions MIP. La coloration Perl's modifiée avec une perméabilisation préalable de 24 heures a été réalisée sur une deuxième boîte par condition.

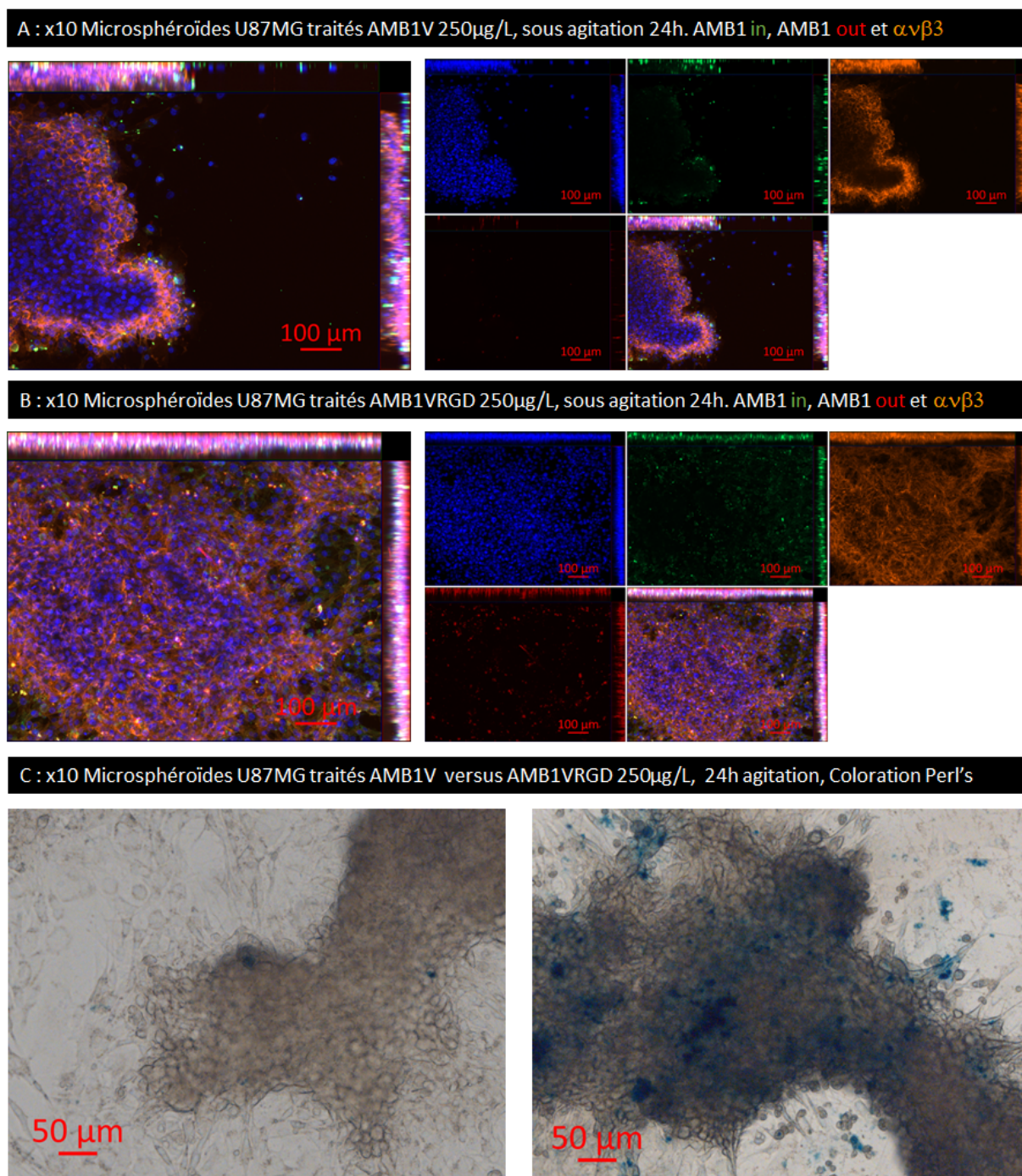


FIG. 4.20 – Microsphéroïdes monocellulaires U87MG, 24h d'incubation sous agitation avec des magnétosomes AMB1-V (A) vs AMB1-VRGD (B), 250 μ g_{Fer}/L relévéés en immunomarquage avec l'anticorps anti-AMB1 (A, B) ou en coloration Perl's (C), grossissement x10

La Figure 4.20 montre qu'on retrouve bien dans ce modèle de culture 3D la spécificité des magnétosomes fonctionnalisés RGD (image B) par rapport aux magnétosomes non fonctionnalisés (image A). L'image B permet aussi d'observer qu'une partie non négligeable de magnétosomes sont encore à la surface des cellules (out en rouge). L'image C montre la coloration du fer dans et autour des sphéroïdes.

Un deuxième essai a été réalisé avec les magnétosomes AMB1-VRGD, à la concentration de $1000 \mu\text{g/L}$ pendant 24 versus 48 heures, sous agitation. Les mêmes marquages, colorations et acquisitions qu'au premier essai ont été réalisés.

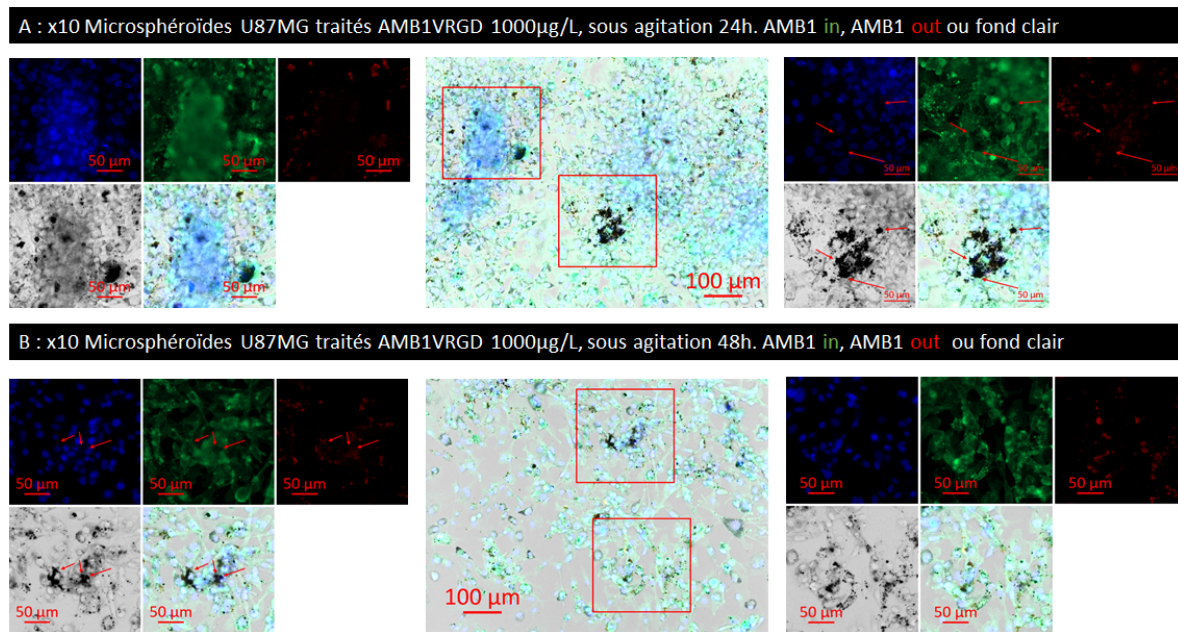


FIG. 4.21 – Microsphéroïdes monocellulaires U87MG, 24 (A) et 48h (B) d'incubation sous agitation avec les magnétosomes AMB1-VRGD, $1000 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$, révélés par l'anticorps anti-AMB1, grossissement x10

La Figure 4.21 montre une différence entre les temps d'incubation 24 et 48 heures. En effet, si on peut retrouver sur l'image A une incorporation élevée de magnétosomes AMB1VRGD dans les cellules, notamment celles qui ont commencé de migrer en 2D à partir des sphéroïdes pendant les 24 heures d'adhésion, l'image B montre qu'à 48 heures, le nombre de magnétosomes AMB1VRGD semble sensiblement plus faible.

On peut observer à 24 et encore plus à 48 heures un défaut de marquage des agrégats qui ne sont plus visibles qu'en lumière blanche (flèches rouges). L'observation des boîtes avant fixation a montré également un nombre très important de magnétosomes s'étant agrégés entre eux et ne pouvant plus rester accrochés aux cellules du fait de la taille des agrégats.

La Figure 4.22 montre que la coloration Perl's permet de retrouver moins de fer dans les sphéroïdes à 48 heures (image A), les agrégats de magnétosomes trop importants s'étant probablement partiellement décrochés. Les sphéroïdes paraissent aussi sensiblement plus denses à 48 heures, limitant l'accès des magnétosomes à l'espace entre les cellules. L'image B montre qu'après 48 heures sous agitation, certains sphéroïdes ne présentent déjà plus d'intégrines $\alpha\nu\beta_3$ en leur centre mais uniquement en périphérie, préfigurant les zones de nécrose observées sur les sphéroïdes de grande taille et les tumeurs cérébrales *in vivo*.

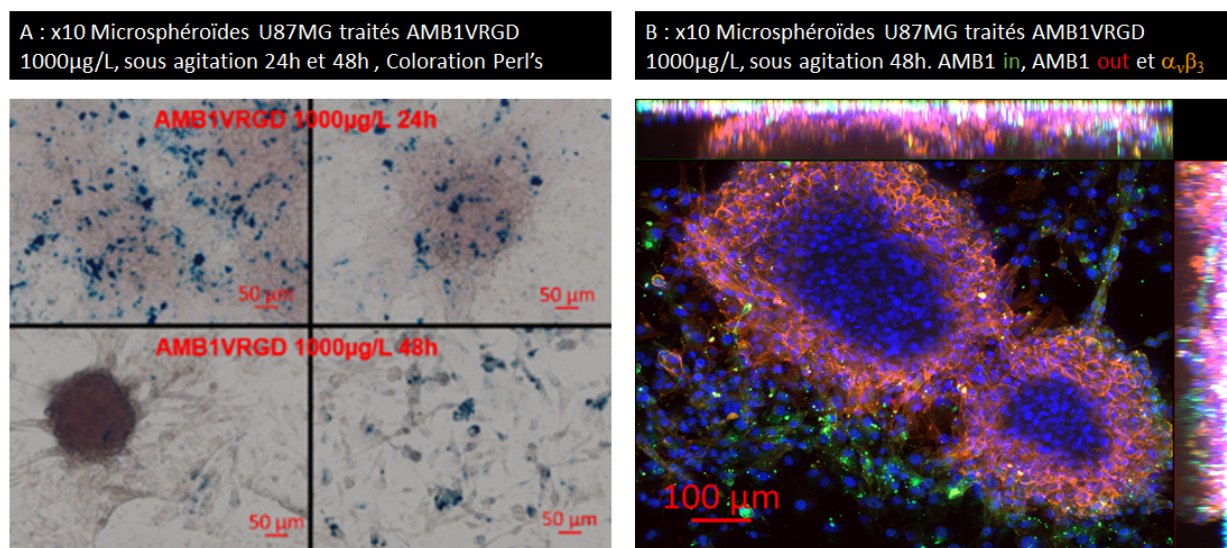


FIG. 4.22 – Microsphéroïdes monocellulaires U87MG, 24 (A) et 48h (B) d'incubation sous agitation avec les magnétosomes AMB1-VRGD, $1000 \mu\text{g}_{\text{Fe}}/\text{L}$, révélés par la coloration Perl's (A) et l'anticorps anti-AMB1 (B, 48h), grossissement x10

Ces résultats corroborent ceux obtenus en 2D, sur l'importance d'éviter l'agrégation des magnétosomes fonctionnalisés durant la mise en contact avec les cellules cibles à long terme, et sur la perte de fonctionnalité de l'anticorps anti-AMB1 sur les agrégats.

Des sphéroïdes monocellulaires U87MG non fluorescents, créés en MGI puis congelés quatre ans, décongelés et remis en croissance sous agitation, ont également été traités avec des magnétosomes AMB1-VRGD. Un premier essai a consisté à mettre en contact les sphéroïdes avec des magnétosomes AMB1-VRGD à $250 \mu\text{g}_{\text{Fe}}/\text{L}$, pendant quatre jours sous agitation, avant de rincer et fixer les échantillons, puis les congeler et les couper.

La Figure 4.23 montre que les magnétosomes fonctionnalisés sont retrouvés principalement en bordure mais également partiellement jusqu'au centre des sphéroïdes, quelles que soient les modalités de traitement. Les magnétosomes sont bien visibles en fond clair mais ne sont pas tous révélés par l'anticorps anti-AMB1. Les amas noirs non fluorescents peuvent être des agrégats de magnétosomes ou bien des résidus cellulaires, notamment dans la zone de nécrose (image A).

La révélation du fer par coloration au Bleu de Prusse (image B) confirme la présence de fer, surtout visible à la bordure du sphéroïde, avec de nombreuses particules décrochées visibles à l'extérieur des coupes. Comme déjà démontré lors du projet Mefisto, sur coupes, la quantité de fer révélé par la coloration est inférieure au nombre de magnétosomes visibles en fond clair. La comparaison avec les modèles cellulaires en 2D et les microsphéroïdes sous agitation semble montrer moins d'incorporation de magnétosomes AMB1-VRGD dans les modèles de culture cellulaire 3D préparés en MGI.

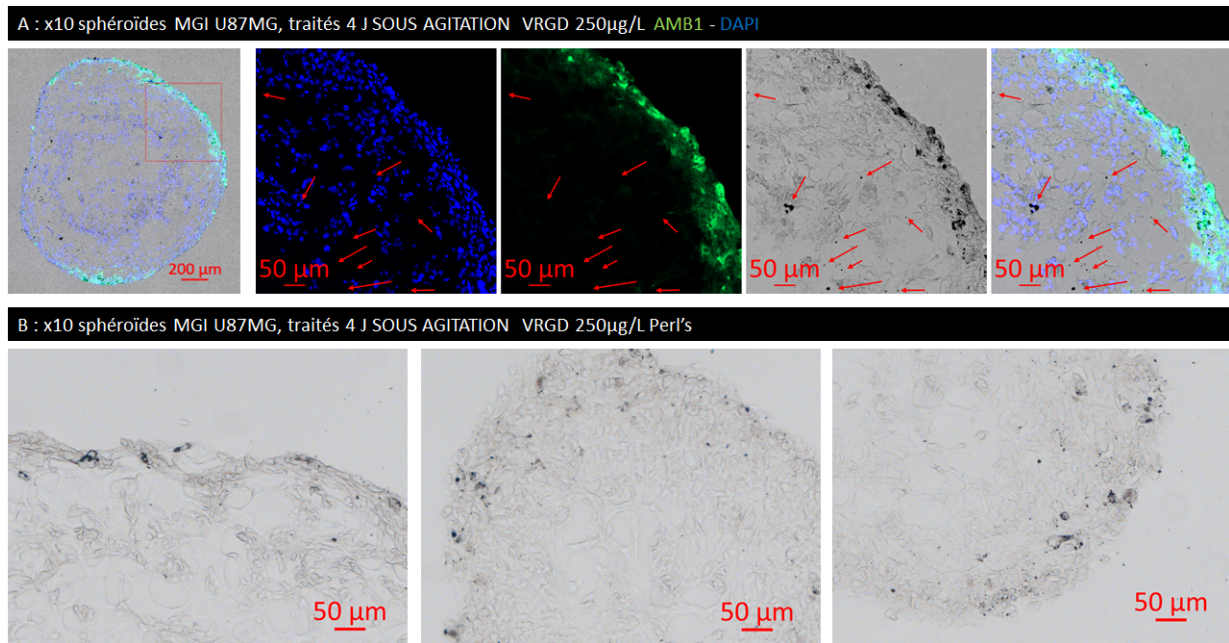


FIG. 4.23 – Coupes de sphéroïdes de cellules U87MG incubés sous agitation avec les magnétosomes AMB1-VRGD, $250 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$ pendant 4 jours, grossissement x10

Un deuxième essai avec ces sphéroïdes a été réalisé en multi-traitements, $100 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$ pendant trois jours, renouvelés trois fois, sous agitation. Puis les sphéroïdes ont été fixés au PFA 4%, congelés et coupés. En comparant les résultats obtenus entre un seul traitement à $250 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$ pendant quatre jours et les multi-traitements ($3 \times 100 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$), une différence majeure apparaît.

En effet, en traitements multiples, ($100 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$ pendant trois jours d'incubation, renouvelés trois fois), l'image A de la Figure 4.24 montre que l'anticorps anti-AMB1 révèle les corps cellulaires et leurs noyaux, alors que ce n'est pas le cas lors d'un traitement unique sur quatre jours. Ce résultat, obtenu sur deux coupes par sphéroïde (deux immunomarquages réalisés à des jours différents), sur trois sphéroïdes distincts, semble montrer que lors d'une incubation longue à faible concentration, les magnétosomes peuvent atteindre les noyaux des cellules cibles.

Les images en fond clair ne permettent pas de distinguer les particules, soulignant une incorporation sans formation d'agrégats dans ces conditions. La bordure est également plus épaisse, la durée de croissance sous agitation ayant été plus longue lors des multi-traitements. Ce paramètre a sans doute également permis une répartition plus homogène des magnétosomes dans les cellules. Cela reste à reproduire sur un autre lot de sphéroïdes pour confirmer ce résultat. L'image B montre les particules de fer retrouvées dans ces sphéroïdes, sous forme de très petits agrégats (coloration Perl's).

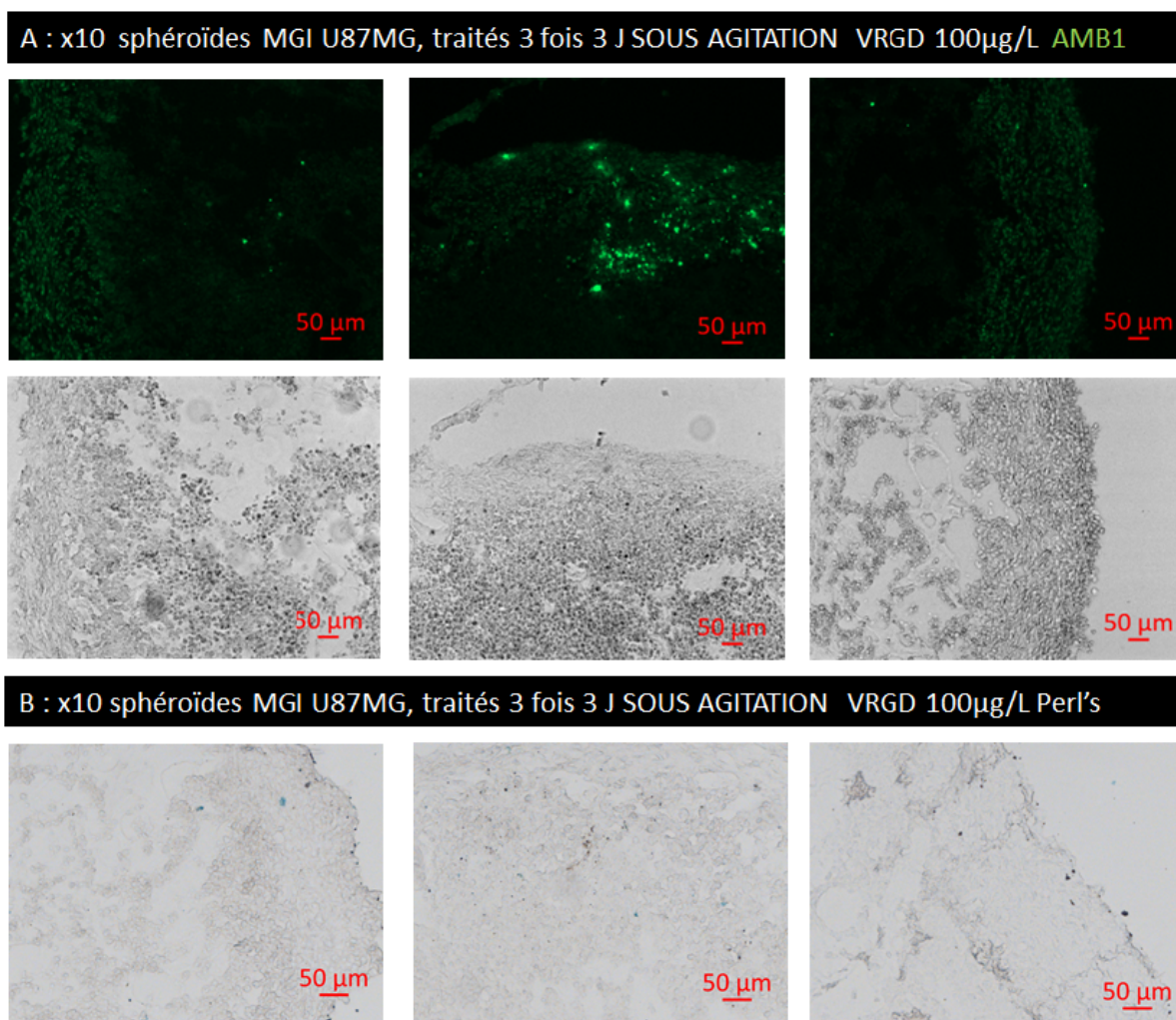


FIG. 4.24 – Coupes de sphéroïdes de cellules U87MG incubés sous agitation avec les magnétosomes AMB1-VRGD, 100 μ g_{Fer}/L pendant trois jours renouvelés 3 fois, grossissement x10

À plus fort grossissement (x 20), comme sur la Figure 4.25, il est clair que l'anticorps anti-AMB1 reconnaît spécifiquement les cellules ayant incorporé les magnétosomes (image A), le secondaire seul (image B) montrant un signal dans le bruit de fond. L'image C montre le fer, révélé par la coloration Perl's. L'image D montre un champ de vue hors sphéroïde coloré par la méthode Perl's, qui révèle que de nombreuses particules de fer se retrouve hors du tissu. En fond clair, les magnétosomes ne sont pas visibles alors que la coloration Perl's révèle de nombreuses microparticules, ce qui semble confirmer que l'incorporation des magnétosomes dans les cellules suite à une incubation à faible concentration sur une durée plus longue, est plus homogène y compris au centre et que moins d'agrégats se forment en surface.

Ces résultats sont à rapprocher des résultats obtenus en *in vivo* et présentés dans le Chapitre 2 (Paragraphe 2.3.2), qui montrent une meilleure incorporation des magnétosomes dans les tumeurs cérébrales lorsqu'ils sont administrés en doses fractionnées plutôt qu'en monodoses.

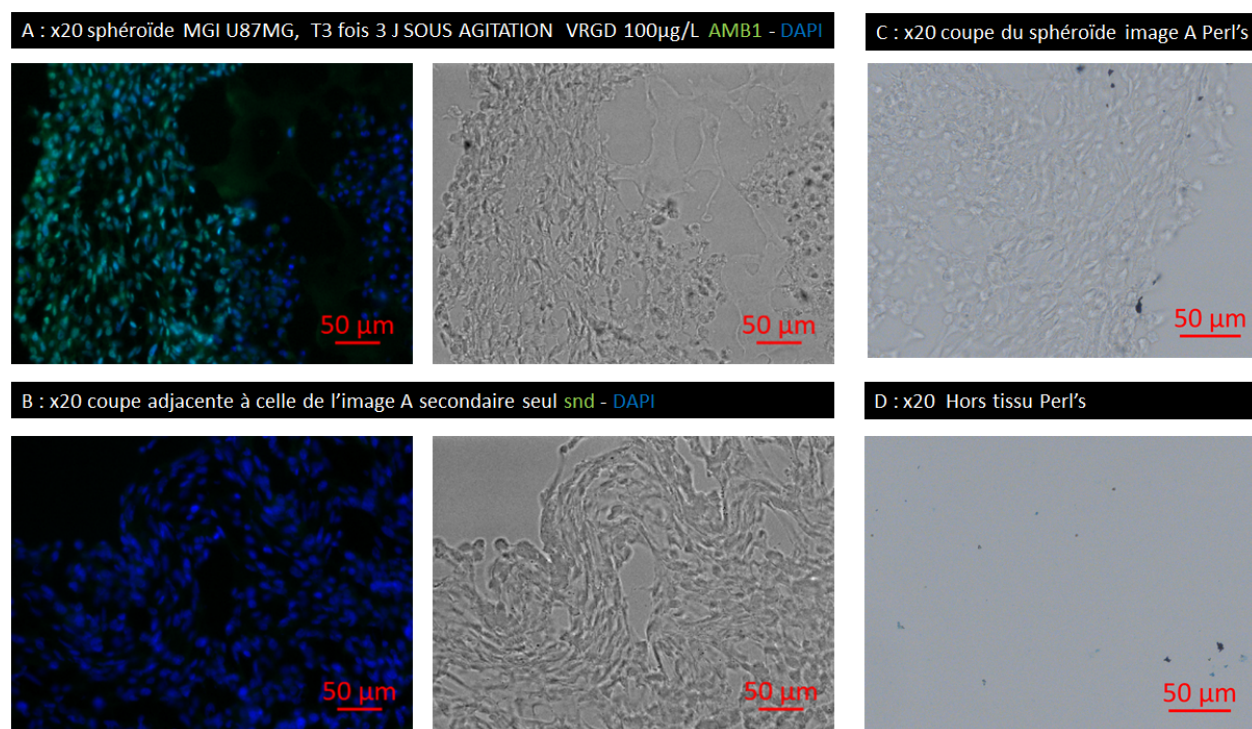


FIG. 4.25 – Sphéroïdes de cellules U87MG incubés 3 jours sous agitation avec les magnétosomes AMB1-VRGD, 100 $\mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$, renouvelés 3fois, grossissement x20

Puis des sphéroïdes bi-cellulaires fluorescents, directement créés sous agitation en plaques CELLSTAR™ Cell-Repellent ont été mis en contact avec les magnétosomes fonctionnalisés, dans les milieux de culture A, B et C, sous agitation, à 250 $\mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$. Des modèles de sphéroïdes bi-cellulaires, créés en enrobage de Matrigel™ et gardés en plaques Cell-Repellent, sous agitation, ont été aussi mis en contact avec les magnétosomes AMB1-VRGD, dans les mêmes conditions.

La Figure 4.26 montre l'incorporation des magnétosomes AMB1-VRGD après trois jours d'incubation, dans les sphéroïdes vivants. L'image A compare les sphéroïdes en enrobage de Matrigel™ 50% en fonction des milieux, l'image B montre les sphéroïdes créés sous agitation sans Matrigel™. Quel que soit le modèle, en milieu B, les magnétosomes AMB1-VRDG s'agrègent plus fortement entre eux et tombent au fond des puits, diminuant l'intérêt de ce milieu. En milieu C, les magnétosomes AMB1-VRDG sont au contraire plus dispersés, probablement grâce à l'absence de sérum. En milieu A, les magnétosomes sont plus agrégés qu'en milieu C, mais sont plus accrochés aux sphéroïdes. Afin de déterminer si l'incorporation a atteint l'intérieur des sphéroïdes, ceux-ci ont été fixés au PFA4 %, et congelés pour réaliser des coupes, ultérieurement.

Les procédures de transparaïsation et d'immunomarquages nécessitent de manipuler plusieurs fois les sphéroïdes et entraînent des pertes importantes de matière : le premier essai a ainsi vu la perte totale des sphéroïdes utilisés. Pour pallier à cette destruction, j'ai prévu d'enrober les sphéroïdes dans un gel pour les protéger.

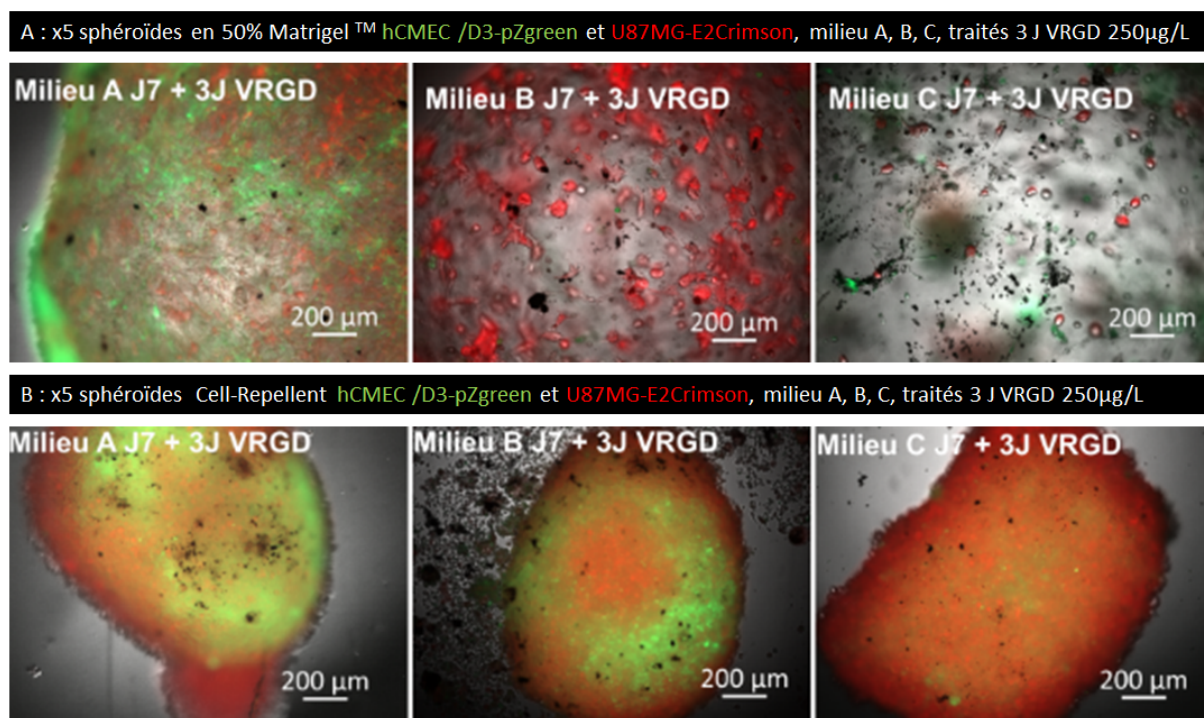


FIG. 4.26 – Sphéroïdes bi-cellulaires U87MG et hCMEC/D3, 72 heures d'incubation sous agitation avec les magnétosomes AMB1-VRGD, $250\mu\text{g}_{\text{Fe}}/\text{L}$ fer, vivants, grossissement x5

Le Phytigel™ est un réactif utilisé comme substitut à l'agar dans la culture des plantes *in vitro* [Kaçar *et al.*, 2010, Lebedev *et al.*, 2018]. Le Phytigel™, produit par une bactérie *Pseudomonas elodea* [O'Neill *et al.*, 1983], est composé d'acide glucuronique, de rhamnose et de glucose. Il permet de réaliser un gel solide et très transparent [Jaeger *et al.*, 2015], qui résiste bien aux solutions de détergents utilisées lors des études de perméabilisation du projet Transparency (voir chapitre Transparency, Paragraphe 5.5). Cet enrobage permet de manipuler beaucoup plus facilement les sphéroïdes lors des changements de solutions. Des études sont en cours pour réaliser les immunomarquages et/ou la coloration du fer dans le gel.

La Figure 4.27 montre un sphéroïde dans le Phytigel™ 1%, avant coloration (image A), ainsi qu'après coloration au Bleu de Prusse (image B), puis après transparisation en GClear17d3 (image C). Les images D, E et F montrent le même sphéroïde sous microscope avant la coloration Perl's (image D), et après coloration Perl's et transparisation (images E et F).

L'image B permet de confirmer que la coloration Perl's a eu lieu (révélation du fer en bleu). Après transparisation trois jours en G17d3, l'excès de colorant a été éliminé et seules les particules de fer sont colorées (image C). L'image F (fond clair) ne permet pas de voir les particules bien distinctement, ni très en profondeur. Cependant, comme avant transparisation, le sphéroïde apparaît complètement noir en fond clair, la transparisation permet a minima de distinguer les particules, une incubation plus longue en solution GClear sera réalisée ultérieurement.

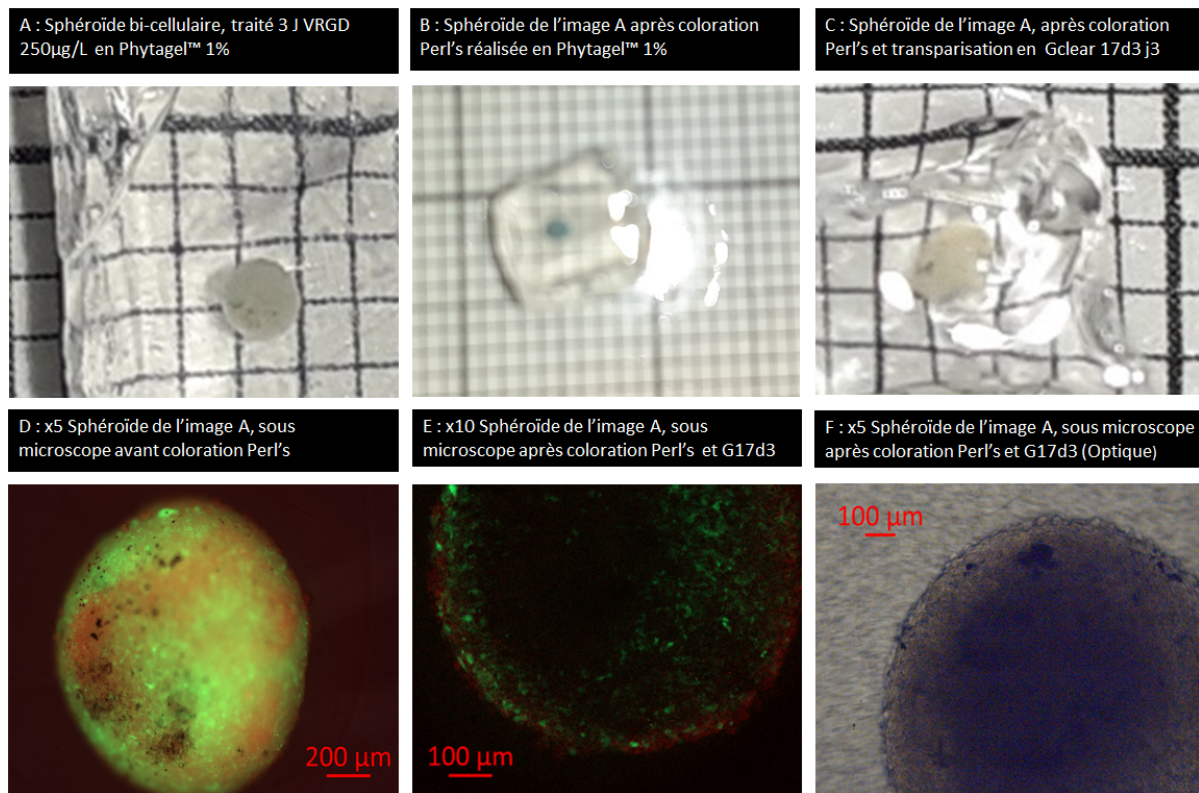


FIG. 4.27 – Sphéroïde bi-cellulaire U87MG et hCMEC/D3, 72h d'incubation sous agitation avec des magnétosomes AMB1-VRGD à $250 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$, sphéroïde dans du Phytigel™ avant coloration Perl's (images A et D), après (image B) et après transparisation (images C, E et F)

Avant coloration, dans le Phytigel™ (image D) les images en fluorescence au travers du gel sont d'égale qualité que celles prises avant la fixation (voir Figure 4.26), la transparence du gel étant très bonne. L'image E de fluorescence après coloration au Bleu de Prusse montre que la fluorescence a fortement diminué, notamment en rouge. Il est donc préférable de réaliser les images en fluorescence avant la coloration si le même échantillon est utilisé.

La Figure 4.28 montre un sphéroïde bi-cellulaire réalisé avec les cellules hCMEC/D3 pZgreen et les cellules U87MG originelles, non fluorescentes. Le sphéroïde a été cultivé en milieu C en Matrigel™ 100% et traité par les magnétosomes AMB1-VRGD à $250 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$ pendant trois jours, sous agitation, fixé et placé dans un cube de Phytigel™ 1%. Après immunomarquage avec l'anticorps anti-AMB1, le sphéroïde montre les cellules hCMEC/D3 en vert et l'anticorps anti-AMB1 en orange ainsi que les particules de fer en fond clair (images A et B). Des images prises en apotome en surface (images C et D) et en profondeur (images E) montrent que l'anticorps anti-AMB1 peut reconnaître les magnétosomes dans le sphéroïde au travers du Phytigel™, même quand les particules ne sont pas visibles en fond clair.

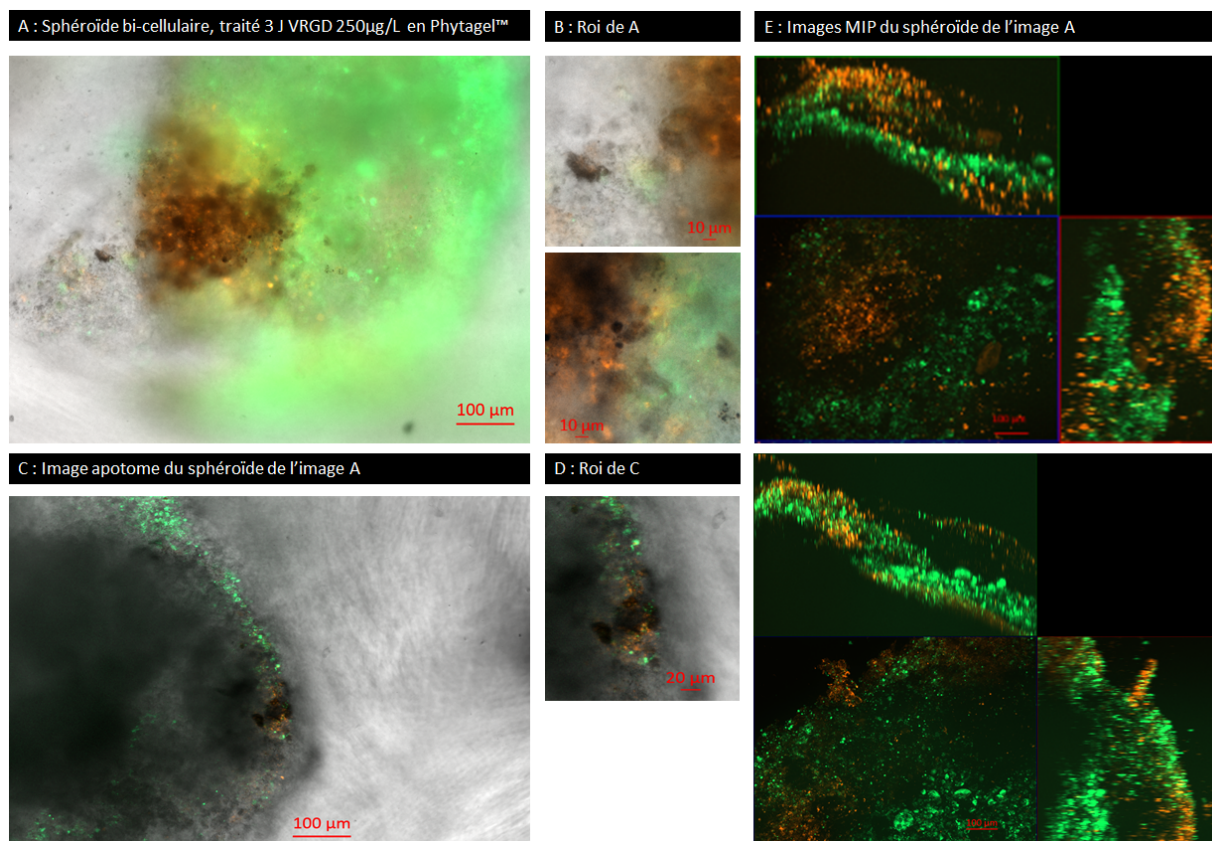


FIG. 4.28 – Sphéroïde bi-cellulaire U87MG WT et hCMEC/D3 pZgreen, 72h d'incubation sous agitation avec des magnétosomes AMB1-VRGD à $250 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$, sphéroïde dans du Phytigel™ après immunomarquage avec l'anticorps anti-AMB1

Les différentes modalités sont encore en cours d'expérimentation, je souhaite notamment investiguer plus avant les conditions de traitements en doses faibles, fractionnées. J'espère également que les modèles bi-cellulaires montreront une nécrose centrale moindre et une incorporation supérieure des magnétosomes que les modèles monocellulaires. Nos modèles seront utilisés dans le cadre de la suite du projet Mefisto, afin de tester les conditions de traitement avec les magnétosomes et avec la photothermie ou l'hyperthermie, sans recourir aux modèles animaux dans un premier temps. Les modèles cellulaires 3D ne peuvent se substituer complètement aux modèles animaux, mais ils peuvent permettre de réduire le nombre d'animaux nécessaires, dans le respect de la règle des 3R.

Les conclusions de cette partie sont donc :

- L'agitation entraîne une meilleure incorporation des magnétosomes.
- Les multi-traitements semblent donner une meilleure incorporation, confirmant les données obtenues en culture en 2D et sur les tumeurs cérébrales *in vivo*. Il semble aussi qu'une durée d'incubation longue permet d'atteindre les noyaux (à confirmer sur d'autres échantillons).
- L'inclusion des sphéroïdes en Phytigel™ 1% permet de les manipuler sans perte et de réaliser des images en microscopie au travers du gel sans perte de qualité.
- L'inclusion des sphéroïdes en Phytigel™ permet de réaliser la coloration Perl's dans le gel, ainsi que des immunomarquages.

4.6.3 Projet Orano

Modèles utilisés *in vitro*

Le modèle de microsphéroïdes obtenus sous agitation en flacons de culture standards a été utilisé pour mettre en contact les magnétosomes conjugués avec le Trastuzumab et non conjugués avec des cellules de cancer du sein (SKBR3, MDA-MB-231), des cellules non cancéreuses de sein (MCF12a) et des cellules de cancer de peau (A431).

Brièvement, les cellules sontensemencées trois jours en flacons de culture non adhérents pour obtenir des sphéroïdes. Puis les cellules sont prélevées, centrifugées et remises en flacons de culture non adhérents standards sous agitation, dans du milieu de culture contenant une concentration en magnétosomes de $1000 \mu\text{g}_{\text{Fe}}/\text{L}$, durant 3-4 jours. Le procédé a été réitéré jusqu'à trois fois (3 traitements de $1000 \mu\text{g}_{\text{Fe}}/\text{L}$). À chaque étape, tous les 3-4 jours, les sphéroïdes sont répartis en deux groupes : un groupe pour continuer le traitement et un groupe pour ensemenecer des boîtes à fond de verre, fixées après 24 heures d'adhésion, pour les études de microscopie.

La lignée cellulaire SKBR3 ne forme que très peu de sphéroïdes, de très petite taille, alors que la lignée cellulaire MDA-MB-231 forme une multitude de petits sphéroïdes, contrairement aux lignées cellulaires A431 et MCF12a qui forment des sphéroïdes de grande taille en continuant de s'agglutiner au cours du temps.

Ces résultats sont présentés dans le Chapitre Orano (Paragraphe 3.3.2) et confirment ce qui a été observé en culture cellulaire en 2D.

Les conclusions de cette partie sont donc :

- L'agitation entraîne une forte incorporation des magnétosomes, avec une légère préférence pour les magnétosomes conjugués avec le Trastuzumab pour les lignées HER2+.
- Les résultats obtenus en culture cellulaire en 2D sont confirmés, la lignée TNBC incorporant les magnétosomes conjugués ou non.

Modèles développés pour les études *in vivo*

La croissance des cellules du cancer de sein *in vivo* chez l'animal, variable d'une lignée à l'autre, est lente, avec souvent un pourcentage de prise tumorale inférieur à 100% [Iorns *et al.*, 2012, Hachim *et al.*, 2019], nécessitant pour certaines lignées une supplémentation en œstrogènes [Deken *et al.*, 2019]. Des modèles sont également réalisés directement à partir des tumeurs de patients [Dobrolecki *et al.*, 2016] ou à partir d'animaux génétiquement modifiés [Vargo-Gogola et Rosen, 2007].

En ce qui concerne les cellules SKBR3, la majorité des publications sont restreintes à des résultats *in vitro*, soulignant la difficulté de les utiliser *in vivo* chez l'animal, étant faiblement tumorigènes [Holliday et Speirs, 2011]. Les quelques publications de résultats *in vivo* sont hétérogènes concernant la croissance tumorale (8 à 17 semaines) ou les modèles murins utilisés [Xiang *et al.*, 2017, Singhal *et al.*, 2018, Hachim *et al.*, 2019]. Nous nous sommes néanmoins intéressés à la mise au point de ce modèle *in vivo*, afin de corrélérer les résultats *in vitro*, tout en mettant en place un modèle plus tumorigénique (cellules A431, voir Paragraphe 3.4, projet Orano).

Afin de mettre au point le modèle SKBR3 *in vivo* au laboratoire, différents essais ont été réalisés. Le tableau présenté en Figure 4.29 reprend les diverses méthodes utilisées. Nous avons comparé la méthode d'implantation classique, à partir de suspensions cellulaires issues de cellules cultivées en 2D, avec des méthodes de culture cellulaire en 3D.

Le premier essai a été réalisé en implantant des cellules SKBR3 chez l'animal, soit sous forme d'une suspension cellulaire à deux millions/100 μL en Matrigel™ 50% injectée sous le sein, soit en implantant des sphéroïdes préalablement mis en croissance *in vitro*.

Les sphéroïdes ont été préparés par enrobage de matrice extracellulaire comme décrit au Paragraphe 4.2.3. Puis les sphéroïdes ont été implantés au niveau du Fat Pad de l'animal (coussin graisseux du sein).

Modèles SKBR3									
Souris	cellules		types implantation	traitement	Tumeurs				
Souche	nombre	type culture			taille mm ³	nombre	prise	régression	métastases
NMRI nude	2x10 ⁶	2D	50% Matrigel, fat pad	non	70-90	2/5	5/5	5/5	non
	50 000	sphéroïdes en 50% Mat	fat pad	non	0		0/5		
	200 000	sphéroïdes en 50% Mat	fat pad	non	0		0/5		
	1x10 ⁶	3D (microsphéroïdes,	50% Matrigel, fat pad	oestrogen 10µg/ml	70-90	3/5	5/5	5/5	1 (foie)
	3x10 ⁶	3D (cell rep, film)	PBS	oestrogen 10µg/ml	0		0/5		
NOD Scid	300 000	sphéroïdes en 50% Mat	fat pad	non	0		0/4		
	2x10 ⁶	2D	50% Matrigel, fat pad	non	<20	4/4	4/4	4/4	non
	3x10 ⁶	3D (microsphéroïdes, 35h)		oestrogen 10µg/ml	75-125	4/4	4/4	4/4	1 (poumons)
	3x10 ⁶			non	<30	2/4	2/4	2/4	1 (perte poids)
		oestrogen 10µg/ml		110-200	4/4	4/4	4/4	non	
NMRI nude	3x10 ⁶	3D (microsphéroïdes, 24h)		non	70-110	4/4	4/4	4/4	non

FIG. 4.29 – Récapitulatif des différents essais d'implantation de cellules SKBR3 *in vivo*

Brièvement, l'animal reçoit un traitement antalgique (Buprécare[™] 0,1 mg/kg, 1mL/kg), 30 minutes avant le début de la chirurgie, par voie sous-cutané. Puis une anesthésie à la Xylazine/Kétamine (10/100 mg/kg, 10 mL/kg) est réalisée par injection intrapéritonéale. Les souris utilisées sont des souris NMRI Nude, immunodéficientes. La peau est désinfectée à la bétadine, une petite incision est réalisée avec des ciseaux sous le sein, la peau est soulevée et une cavité est ménagée à la pince, afin d'introduire un sphéroïde. L'ouverture est refermée à la colle chirurgicale. La plaie est à nouveau désinfectée à la bétadine et l'animal est gardé en couveuse à 34°C jusqu'à son réveil. L'état clinique de l'animal est vérifié pendant deux jours après la chirurgie, puis observé une fois par semaine pour surveiller la croissance tumorale.

Les premiers tests ont été réalisés avec des souris NMRI Nude femelles de huit semaines, implantées avec des sphéroïdes à 50 000 cellules/10 µL à J5. Après trois semaines, aucune tumeur ne s'étant développée, les mêmes animaux ont été réutilisés pour implanter, sur l'autre coté, des sphéroïdes à 200 000 cellules/20 µL à J4. Parallèlement, les souris implantées par injection sous-cutanée de suspensions cellulaires (2 millions cellules/100 µL (en Matrigel[™] 50%) montrent une prise tumorale de 100% mais une croissance très faible après quatre semaines (70-90 mm³ pour 2/5, <40 mm³ pour 3/5 animaux), les tumeurs ayant complètement régressé après huit semaines.

Pour tenter d'améliorer le modèle, une deuxième série de tests à été réalisée sur souris NOD-SCID, plus immunodéficientes, sans plus de résultats concluant pour l'implantation de sphéroïdes. Le modèle d'implantation de suspensions cellulaire permet d'obtenir une prise de 100% mais des tumeurs qui ne dépassent pas les 20 mm³. Bien que plus immunodéficientes, les souris NODSCID n'ont pas permis un développement satisfaisant des tumeurs. Mon hypothèse est que le métabolisme et notamment le niveau d'hormones, différent d'une souche à l'autre, peut avoir un fort impact sur le microenvironnement tumoral et donc stimuler ou diminuer la croissance.

Étant donné les résultats des premiers essais, j'ai abandonné l'implantation de sphéroïdes en enrobage de Matrigel™ et utilisé la méthode de culture de microsphéroïdes en 3D en matériel standard pour réaliser les implantations. La méthode est décrite au Paragraphe 4.2.2. Avec cette méthode les cellules, cultivées 24 heures sous agitation, sont en croissance et n'ont pas subi le stress lié au décollement juste avant l'implantation. Les cellules sont prélevées, centrifugées et le culot cellulaire est repris dans 100 µL de Matrigel™ 50% pour réaliser l'implantation.

J'ai également supplémenté en œstrogènes l'eau de boisson des animaux. En effet, des études ont montré l'effet pro-tumoral des œstrogènes sur des modèles ER négatives [Jordan *et al.*, 1989, Friedl et Jordan, 1994, Curran *et al.*, 2006], potentiellement en activant la voie EMT [Huang *et al.*, 2007]. L'apport en œstrogènes est souvent réalisé à l'aide d'implants sous-cutanés pour les modèles ER+ [Gottardis *et al.*, 1988] mais des études ont montré l'impact nocif de ces implants sur le système urinaire des souris [Pearse *et al.*, 2009]. La supplémentation dans l'eau de boisson est moins précise mais elle permet néanmoins de stimuler la croissance tumorale des modèles ER+ [Gordon *et al.*, 1986, Levin-Allerhand *et al.*, 2003], sans effets secondaires non désirés.

Avec un ensemencement à 1 million de cellules par souris, la croissance tumorale est similaire au modèle classique, mais la régression semble moins rapide, sur les souris NMRI nude. Un autre essai a été réalisé avec cette méthode, en utilisant une densité d'ensemencement plus élevée (trois millions de cellules par souris), en supplémentant ou non les animaux en œstrogènes.

Cet essai a permis de montrer une différence entre les animaux traités aux œstrogènes et ceux non traités. En effet, les souris NOD-SCID sous traitement œstrogénique ont un taux de prise tumorale de 100% et un volume tumoral maximal atteint nettement supérieur à celui des animaux sans supplémentation dans l'eau de boisson (taux de prise de 50%). De même, les souris NMRI Nude sous traitement œstrogénique ont des tumeurs d'un volume plus important que celles non supplémentées, bien que dans tous les cas les tumeurs finissent par régresser. L'implantation des cellules cultivées en 3D, sous traitement œstrogénique, semble également favoriser les métastases, 3/21 animaux ayant présenté une tumeur secondaire (poumon, foie, zone non déterminée mais avec une perte de poids).

Un essai d'implantation de cellules SKBR3 cultivées en matériel Cell-Repellent a également été réalisé. Les cellules formant un film dans les puits ont été prélevées et injectées directement en PBS, sans ajout de Matrigel™, pour ne pas casser trop le film formé. Cet essai n'a montré aucune prise tumorale.

Certains animaux sont euthanasiés par exsanguination-perfusion (voir protocole en Annexe B.4), pour prélever les tumeurs et les métastases potentielles, afin de vérifier l'expression d'HER2 *in vivo*. La Figure 4.30 illustre la présence du marqueur HER2 dans les tumeurs et les métastases (foie). L'expression d'HER2 est très forte dans la tumeur primaire, comme attendu. Le récepteur HER2 est présent dans les tumeurs retrouvées dans le foie, identifiant ces tumeurs comme des métastases de la tumeur primaire. Dans les métastases, l'expression est plus hétérogène. Cela est sans doute dû à la compression des cellules tumorales par le tissu hépatique et les néovaisseaux sanguins, ainsi que l'envahissement probable des métastases par les cellules immunitaires.

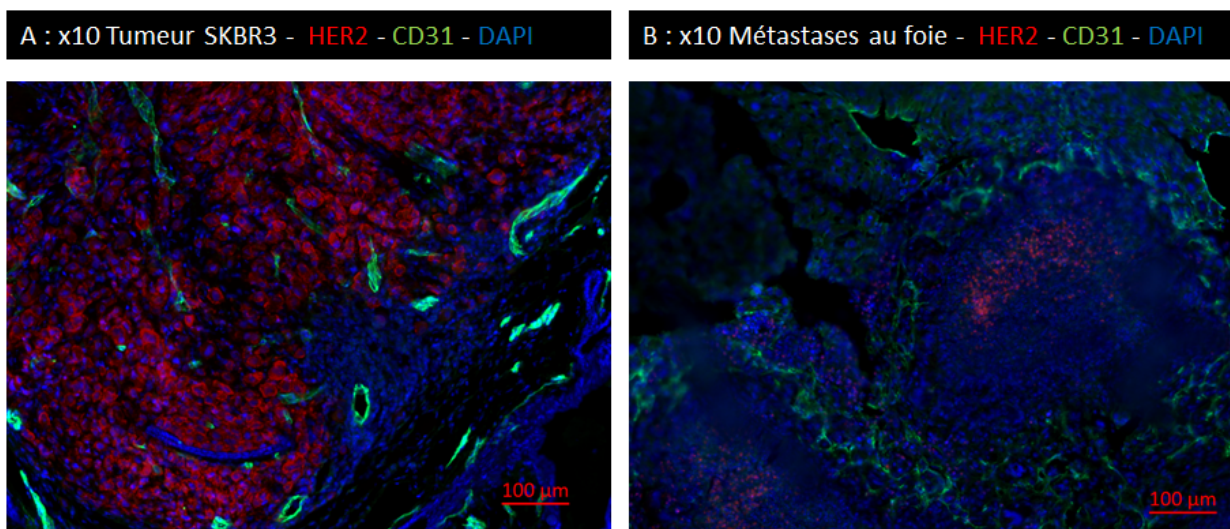


FIG. 4.30 – Immunomarcages avec un anticorps anti-CD31 et un anticorps anti-HER2 sur une coupe de tumeur SKBR3 (A) et sur une coupe de foie (B), grossissement x10

En parallèle des tests de développement de tumeur *in vivo*, des transfections sont en cours de réalisation, afin d'obtenir des lignées fluorescentes. Ces lignées permettront d'étudier plus facilement si des cellules SKBR3 implantées peuvent être retrouvées à distance du point d'implantation, notamment dans le cerveau, organe le plus fréquemment touché par les métastases des cellules de cancer du sein HER2+ [Garcia-Alvarez *et al.*, 2021]. Le même travail est réalisé sur les cellules MDA-MB-231, triple négatives, qui sont également fréquemment productrices de métastases cérébrales [Maqbool *et al.*, 2022].

La Figure 4.31 montre les premiers résultats de transfection obtenus : les lignées ne sont pas encore finalisées, ce travail est en cours.

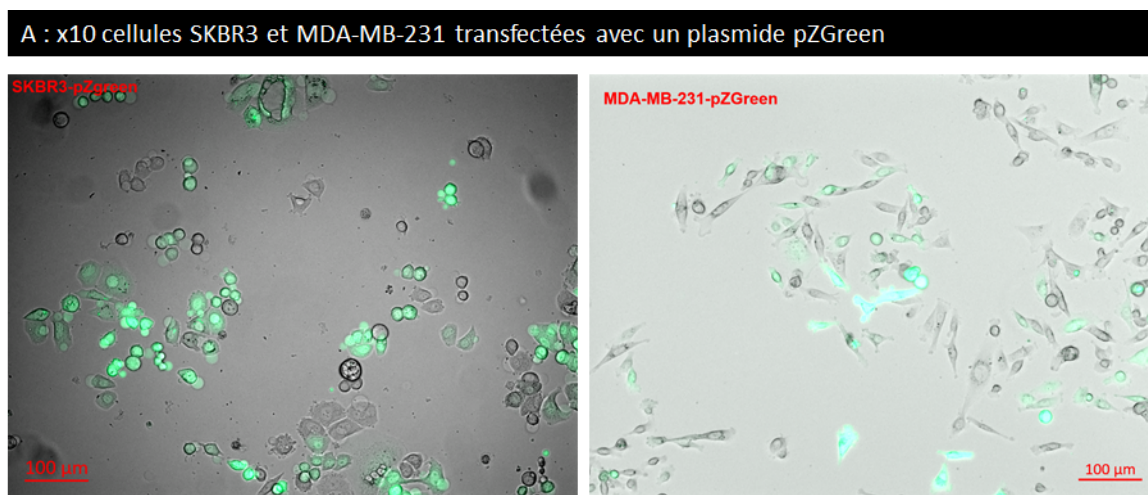


FIG. 4.31 – Lignées SKBR3 et MDA-MB-231 transfectées avec le plasmide pZgreen, grossissement x10

Les conclusions de cette partie sont donc :

- L'utilisation de sphéroïdes en enrobage de Matrigel™ ne donne pas de résultats probants de croissance tumorale, même sur des souris immunodéficientes NOD-SCID.
- L'utilisation de cellules cultivées en 3D, générées sous agitation, permet d'obtenir un taux de prise tumoral de 100% et un volume tumoral supérieur à celui obtenu avec les cellules cultivées en 2D.
- Bien que les cellules SKBR3 soit ER-, la supplémentation en œstrogènes augmente la croissance tumorale des SKBR3.
- Implantées sans Matrigel™, le taux de prise tumoral est nul.
- Bien que les tumeurs primaires régressent, des métastases apparaissent (poumon, foie, zone non déterminée) sur environ 1/7 des souris implantées avec les microsphéroïdes.

4.7 Conclusion et perspectives

Les modèles de culture cellulaire en 3D ont vu leurs développements et leurs applications augmenter de façon exponentielle durant cette dernière décade. Plus proche de la physiologie d'un organe qu'une culture cellulaire en 2D, il est également possible d'utiliser des cellules issues de patients pour être au plus près génétiquement d'un individu, comme pour l'étude des maladies rares. Il me semble particulièrement important de continuer à développer ces méthodes à l'avenir. L'utilisation de modèles bi- voire tri-cellulaires et de modèles d'organoïdes cérébraux issus de cellules souches induites permet d'imaginer toutes sortes d'applications [Pavoni *et al.*, 2018b, Pinto *et al.*, 2021]. J'ai pour projet d'améliorer mes modèles existants (utilisation de matrices différentes, de facteurs de croissance ou de chémokines pour stimuler la formation de néoangiogénèse) et de développer des organoïdes cérébraux à partir de cellules souches, incorporant des microsphéroïdes de cellules tumorales et/ou de microsphéroïdes bi-cellulaires (endothéliales plus tumorales).

Les modèles cellulaire en 3D peuvent donc être d'une grande utilité *in vitro* mais aussi *in vivo*. L'utilisation en *in vivo* peut permettre d'améliorer un modèle de tumeur difficile à mettre en place (comme pour les tumeurs SKBR3), de réduire le nombre de cellules à implanter et de préserver les relations intercellulaires en 3D plus proches de la physiologie des organes. L'utilisation *in vitro* des modèles cellulaires en 3D permet également de réduire le recours à l'animal, pour tester des paramètres de mise en contact avec un traitement ou plusieurs traitements, avec nos agents de contraste.

Par exemple, les modèles déjà présentés ici pourront être utilisés pour tester les paramètres d'hyperthermie à appliquer à nos magnétosomes fonctionnalisés afin d'induire l'apoptose des cellules tumorales cibles, avant de passer aux modèles animaux. Les sphéroïdes peuvent être utilisé directement en imagerie IRM, comme lors des projets Iseult et Mefisto, pour une durée limitée, à condition d'atteindre une taille d'environ 2 millimètres. Nous avons en projet de développer un appareillage compatible IRM pour maintenir les sphéroïdes sous IRM plus longtemps (microfluidique, contrôle du CO₂, milieu thermostaté).

Chapitre 5

Transparency

- 5.1 Contexte
- 5.2 Test des méthodes issues de publications
 - 5.2.1 Méthodes à base de solvants aqueux
 - CLARITY
 - SeeDB, Scale et ScaleS
 - CUBIC
 - 5.2.2 Méthodes à base de solvants organiques
 - iDISCO, uDISCO
- 5.3 GClear
 - 5.3.1 Mise au point
 - 5.3.2 Protocole retenu
- 5.4 Protocoles de perméabilisation
- 5.5 Visualisation de la vascularisation
- 5.6 Conclusion et perspectives

5.1 Contexte

L'étude histologique de la structure interne d'un organe, de l'organisation des cellules entre elles, et de l'expression de marqueurs spécifiques se fait classiquement en 2D, sur des coupes de tissu. Certes très informatives, ces techniques ne permettent pas d'appréhender réellement les structures 3D et la répartition d'un marqueur d'intérêt dans un grand volume. Il est possible de reconstruire en 3D des coupes 2D, mais il y a forcément une perte de tissu, une destruction partielle des structures et de l'organisation tissulaire. C'est également une méthode fastidieuse, chronophage, dispendieuse et limitée par le nombre de coupes à analyser, sans compter les problèmes de recalages des images entre elles [Toga *et al.*, 1997]. Rendre transparent les organes permettrait idéalement de voir les structures internes en 3D.

Trouver des méthodes pour rendre transparents des organes opaques, afin de mieux les étudier, est ainsi un sujet de recherche depuis le début du siècle [Spalteholz, 1914]. Schématiquement, le principe de base de la transparenisation est la délipidation, associée ou non à une déshydratation, ainsi qu'à une modification de l'indice de réfraction de l'organe, maintenu dans un liquide avec le même indice de réfraction, compris entre 1,33 et 1,45, pour permettre le passage de la lumière. Le principe de diffusion de la lumière utilisé par les méthodes de transparenisation est très bien explicité dans la publication de D. Richardson et J. Lichtman [Richardson et Lichtman, 2015].

Le développement de nouveaux types de microscope permettant l'imagerie en profondeur et/ou de grands volumes (ultramicroscope, confocal, multi-photons, microscope à feuillet de lumière) a entraîné une multiplication importante des méthodologies de transparenisation des organes depuis les années 2000. Une classification des publications est possible avec d'une part les méthodes utilisant des solvants organiques [Genina *et al.*, 2010, Becker *et al.*, 2012, Ariel, 2017], d'autre part les méthodes utilisant des solvants aqueux, [Silvestri *et al.*, 2016, Tainaka *et al.*, 2018]. La solution de Murray utilisant comme agent de déshydratation et de délipidation le benzyl-benzoate et l'alcool benzylique a été à la source des méthodes utilisant des solvants organiques avec la méthode dite BABB [Dent *et al.*, 1989]. Cette méthode a elle-même inspiré d'autres méthodes telles que 3DISCO [Ertürk et Bradke, 2013] qui introduit l'usage du tétrahydrofurane (THF, pour tétrahydrofurane), puis iDISCO [Renier *et al.*, 2014] ou encore uDISCO [Pan *et al.*, 2016]. La méthode CLARITY, développée en 2013 [Chung *et al.*, 2013], a fait grand bruit. Cette méthode associant détergents et électrophorèse a permis d'obtenir des images d'un cerveau humain adulte en 3D. Cette méthode a également été déclinée en de multiples variantes, telles que PACT ou PARS [Tomer *et al.*, 2014, Woo *et al.*, 2016, Neckel *et al.*, 2016, Huang *et al.*, 2018].

Je me suis intéressée à ces méthodes depuis 2012, à la lecture de la publication de la méthode Scale de Hiroshi Hama [Hama *et al.*, 2011]. J'ai lu de nombreuses publications à la suite de celle-ci, m'intéressant aux méthodes SeeDB [Ke *et al.*, 2013], CUBIC [Susaki *et al.*, 2014, Lloyd-Lewis *et al.*, 2016], CLARITY [Liu *et al.*, 2016], FocusClear [Fu *et al.*, 2009], 3DISCO [Ertürk et Bradke, 2013], iDISCO [Renier *et al.*, 2014, Liebmann *et al.*, 2016], RIMS [Yang *et al.*, 2014] ...

Sur le cerveau, différents auteurs se sont intéressés à utiliser la transparisation pour visualiser les réseaux de neurones rendus fluorescents par modifications génétiques [Becker *et al.*, 2012, Ertürk et Bradke, 2013, Ke *et al.*, 2013, Susaki *et al.*, 2014, Pan *et al.*, 2016], la vascularisation [Moy *et al.*, 2013, Di Giovanna *et al.*, 2017, Lugo-Hernandez *et al.*, 2017], la matière blanche [Chang *et al.*, 2017]. L'utilisation de la transparisation pour révéler des marqueurs d'intérêt en 3D par immunomarquages [Liu *et al.*, 2013b, Renier *et al.*, 2014, Miller et Rothstein, 2016, Liebmann *et al.*, 2016] est plus difficile, les anticorps ayant du mal à pénétrer en profondeur et/ou à résister aux procédures de délipidation.

J'ai mis au point au laboratoire une partie de ces protocoles. Les expériences réalisées ont montré que chaque méthode a ses avantages et ses inconvénients. J'ai donc ensuite développé des protocoles en essayant de garder les avantages de certaines méthodes tout en limitant les inconvénients. Mes objectifs sont de trouver une méthode simple, peu coûteuse, pour voir la vascularisation du cerveau en profondeur, ainsi que d'utiliser des immunomarquages en profondeur. J'ai cherché à obtenir un immun marquage en profondeur des astrocytes (GFAP), des microglies (Iba1) et de la myéline chez les rongeurs pour mes modèles tumoraux et inflammatoires. Le marquage des astrocytes et des microglies a été choisi afin de visualiser l'organisation en 3D des structures et des interactions des cellules gliales avec une région lésée, comme une tumeur. Le marquage de la myéline a quant à lui été choisi pour visualiser en 3D et à haute résolution les réseaux de fibres de matière blanche.

J'ai aussi travaillé sur des immunomarquages des neurones liés au métabolisme du calcium chez le macaque et le rongeur (Calbindine, Calrétinine, Parvalbumine). Ces immunomarquages de neurones inhibiteurs ont été réalisés pour comparer les résultats en histologie 3D et l'imagerie multi-photonique. J'ai déjà réalisé sur coupes en 2D des quadruples immunomarquages sur ces neurones, chez trois espèces (Macaque, Rat et Souris, voir Annexe C.14, Figure C.20). Des marqueurs neuronaux classiques ont également été testés (NeuN, MAP2). Dans l'idéal, j'aimerais pouvoir associer la révélation de la vascularisation avec des immunomarquages, sur le même échantillon. Je présente ici le travail réalisé avec les enseignements que j'en ai tirés.

5.2 Test des méthodes issues de publications

Je ne présente pas dans le détail les protocoles expérimentaux publiés, les réactifs et procédures utilisés étant identiques à ceux détaillés dans les différentes publications. J'ai commencé par tester ces méthodes sur des cerveaux de souris adultes, perfusées ou non avec un colorant vasculaire, le DIL (DIL, pour 1, 1'-dioctadecyl-3, 3, 3', 3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate). Ce colorant lipophile pénètre dans les cellules endothéliales et les rend fluorescentes en orange [Li *et al.*, 2008]. J'ai aussi testé les immunomarquages en développant conjointement mes propres solutions de transparisation et des protocoles de perméabilisation.

5.2.1 Méthodes à base de solvants aqueux

CLARITY

La méthode CLARITY, développée par Kwanghun Chung [Chung *et al.*, 2013], associe l'usage d'un détergent agressif (SDS, pour sodium dodecylsulfate), d'un hydrogel et d'une électrophorèse pour remplacer les lipides très rapidement. Cette méthode nécessite un appareillage dédié, disponible commercialement ou à développer au laboratoire. La méthode est très rapide, il est possible de clarifier un cerveau de souris adulte en 24-48 heures. Les cerveaux obtenus sont très clairs, mais pas complètement transparents. De plus, cette méthode n'est pas compatible avec beaucoup d'anticorps, limitant l'usage aux marqueurs fluorescents intrinsèques chez des animaux génétiquement modifiés pour exprimer des marqueurs fluorescents. Le coût de l'appareillage est également dissuasif. De nombreux auteurs ont décliné la méthode CLARITY, en augmentant la durée d'incubation sans nécessité de courant électrique pour effluer les lipides (méthodes PARS, PACT).

La Figure 5.1 illustre la clarification obtenue après 24 heures sur un cerveau de souris adulte, en utilisant l'appareil de la société MOKA, en démonstration. L'image A montre deux hémisphères d'un cerveau de souris non traitée, rendu transparents en 24 heures, l'image B montrant les deux hémisphères cérébraux d'une souris perfusée en DIL. La méthode CLARITY dégraisse très vite les tissus et le colorant est rapidement éliminé. Bien que très rapide, la méthode CLARITY nécessite beaucoup de matériel, la préparation de l'hydrogel peut également générer des artéfacts et bien que les tissus soient bien éclaircis, ils ne sont pas complètement transparents. Je n'ai pas poursuivi cette technique plus avant.



FIG. 5.1 – Méthode CLARITY appliquée à la clarification de cerveaux de souris adulte non traitée (A), perfusée en DIL (B)

SeeDB, Scale et ScaleS

La méthode *Scale* a été développée par Hiroshi Hama [Hama *et al.*, 2011] comme une alternative à Focusclear, un réactif commercial et très onéreux si l'on l'utilise sur un cerveau autre que celui d'une drosophile. Elle a été ensuite modifiée en *ScaleS* par l'utilisation de sorbitol plutôt que de glucose [Hama *et al.*, 2015].

La méthode SeeDB développée par Meng-Tsen Ke [Ke *et al.*, 2013] a été utilisée avec succès sur des embryons et des cerveaux de souris nouveaux nés, mais avec moins de résultats probants sur les souris plus âgées (2 mois). La méthode *Scale* est basée sur l'utilisation de solutions concentrées d'urée et de sucres. La méthode SeeDB est basée sur l'utilisation de solutions de fructose de concentration croissante. Je n'ai obtenu pour ma part aucun effet de transparisation intéressant sur des cerveaux de souris adulte avec la méthode SeeDB.

Les méthodes *Scale* et *ScaleS* permettent d'obtenir une transparisation partielle, insuffisante pour rendre un cerveau de souris adulte complètement clair. La méthode *Scale* entraîne également un gonflement des tissus important. Néanmoins, cette méthode est compatible avec de nombreux anticorps, permettant de réaliser des immunomarquages en profondeur (100-400 μm). Cette méthode est également compatible pendant quelques semaines avec la coloration des vaisseaux avec du DIL, avant la disparition du signal.

La Figure 5.2 illustre les résultats obtenus avec la méthode *Scale*, en immunomarquages sur souris (GFAP, image A) et sur macaque (Neurones Calbindine+, image B, Neurones MAP+, image C). Bien qu'intéressante, cette méthode donne des résultats variables et notamment un signal d'immunomarquage en profondeur relativement faible (100-200 μm), pour de nombreux anticorps testés sur les échantillons de cerveaux de souris et de macaque utilisés.

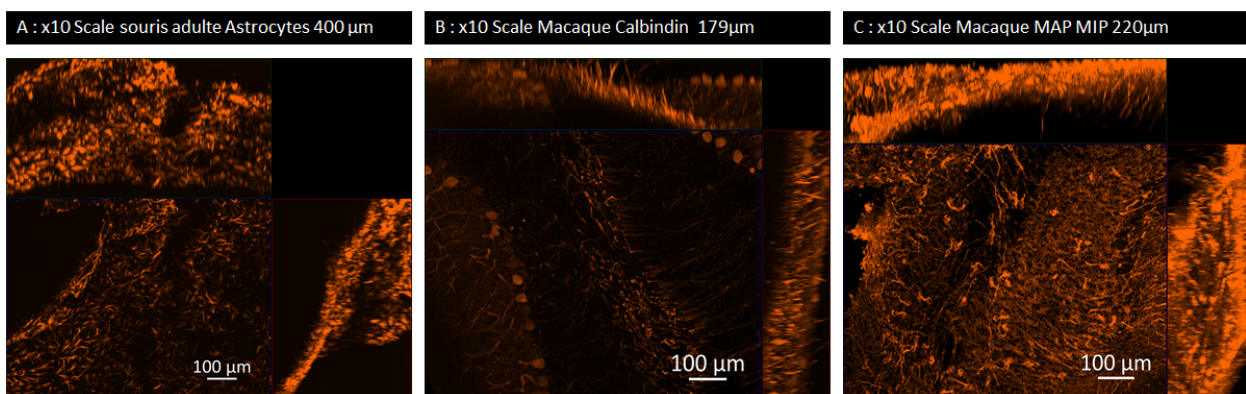


FIG. 5.2 – Transparisation par la méthode *Scale* de cerveau de souris (A, immunomarquage de GFAP), de macaque (B, immunomarquage Calbindine, C immunomarquage MAP), grossissement x10

CUBIC

La méthode CUBIC, développée par [Susaki *et al.*, 2014], est une méthode initialement basée sur la méthode Scale, modifiée par l'usage d'aminoalcool au lieu d'urée. La procédure est simple, par immersions successives dans différentes solutions, mais relativement longue, plusieurs jours étant nécessaires pour rendre transparent le cortex, plusieurs semaines pour aller plus en profondeur. J'ai utilisé cette méthode pour rendre transparents des cerveaux de souris adulte, perfusées en DIL.

La Figure 5.3 montre les résultats obtenus en utilisant le microscope Light Sheet de Zeiss, en démonstration. La coloration DIL résiste suffisamment pour qu'il soit possible de voir les vaisseaux sanguins du cortex, mais la transparenisation n'est pas suffisante pour pouvoir visualiser les vaisseaux au-delà de la zone corticale. Le colorant commence aussi à être éliminé durant les semaines nécessaires à la transparenisation.

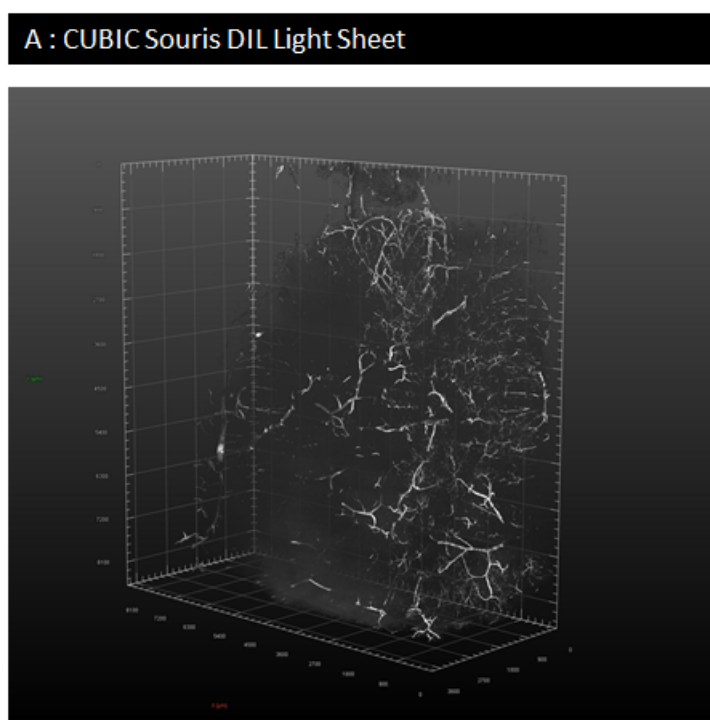


FIG. 5.3 – Cerveau de souris perfusée en DIL, transparenisé par la méthode CUBIC, 1 hémisphère

Bien que permettant d'obtenir des cerveaux assez transparents, cette méthode entraîne un ramollissement des tissus et un gonflement assez important (environ x 3), rendant la manipulation délicate et la corrélation avec les images IRM difficile. Les immunomarquages tentés n'ont pas été très concluants.

5.2.2 Méthodes à base de solvants organiques

iDISCO, uDISCO

La méthode iDISCO développée par Nicolas Reinier [Renier *et al.*, 2014] est fondée sur la méthode BABB. La méthode uDISCO est une variante de iDISCO [Pan *et al.*, 2016], plus longue, utilisant des gradients plus progressifs de solvants. Utilisant des bains de méthanol et de solvants organiques (THF...), ces méthodes sont plus toxiques pour l'utilisateur que les méthodes en solutions aqueuses. Elles sont aussi plus destructrices pour les tissus. La méthode iDISCO permet d'obtenir des échantillons clarifiés en 48 heures, mais avec beaucoup de manipulations. Les cerveaux de souris, rat ou des échantillons de cerveaux de macaque sont complètement clairs. Contrairement aux méthodes à base aqueuse, les méthodes à base de solvants organiques réduisent de façon importante la taille des organes. Cette réduction s'accompagne d'un durcissement des tissus, rendant plus facilement manipulables les tissus clarifiés.

La réduction de volume n'est pas forcément un désavantage, réduisant d'autant la quantité de données générées par l'imagerie microscopique en profondeur [Pan *et al.*, 2016]. La quantité de données générée par ces technologies est en effet d'un poids certain en termes de stockage et de puissance informatique nécessaire pour un rendu 3D. Cependant, comme pour les méthodes en base aqueuse, les variations de volume de l'organe, dont il n'est pas possible de garantir qu'elles soient isométriques, rendent plus difficile la comparaison avec les autres types d'imagerie, comme l'IRM.

Les immunomarquages sont possibles mais tous les anticorps ne sont pas compatibles avec ces méthodes de transparence. Les images obtenues sont cependant bien nettes sur une profondeur importante, il est possible de traverser complètement un échantillon sur plusieurs millimètres. Il semble cependant difficile d'obtenir une bonne pénétration des anticorps en profondeur, même si un immunomarquage sur environ 250 à 500 μm est possible sur certains échantillons. La coloration DIL, utilisée pour marquer l'arbre vasculaire, ne résiste pas du tout au processus du fait de la délipidation complète par les solvants organiques, dans les conditions testées au laboratoire. Cependant, il semble que l'utilisation d'un analogue du DIL, (CM-DIL) permet de visualiser la vascularisation après une clarification avec une version modifiée du protocole iDISCO, comme présenté à la Figure 9 de la publication de Douglas Richardson [Richardson *et al.*, 2021]. Je n'ai pas encore eu l'occasion d'acquérir cet analogue du DIL et de tester son usage, apparemment compatible également avec la méthode CLARITY [Jensen et Berg, 2016].

Cette méthode iDISCO permet néanmoins d'obtenir un très bon signal d'immunomarquage avec certains anticorps, très intense, du fait de la transparence parfaite du tissu (clair comme du cristal). La Figure 5.4 illustre une partie des résultats obtenus en immunomarquages, sur des cerveaux de souris et de macaques : la visualisation de part en part du tissu est bien nette mais la pénétration des anticorps est limitée à quelques centaines de microns, de part et d'autre du tissu.

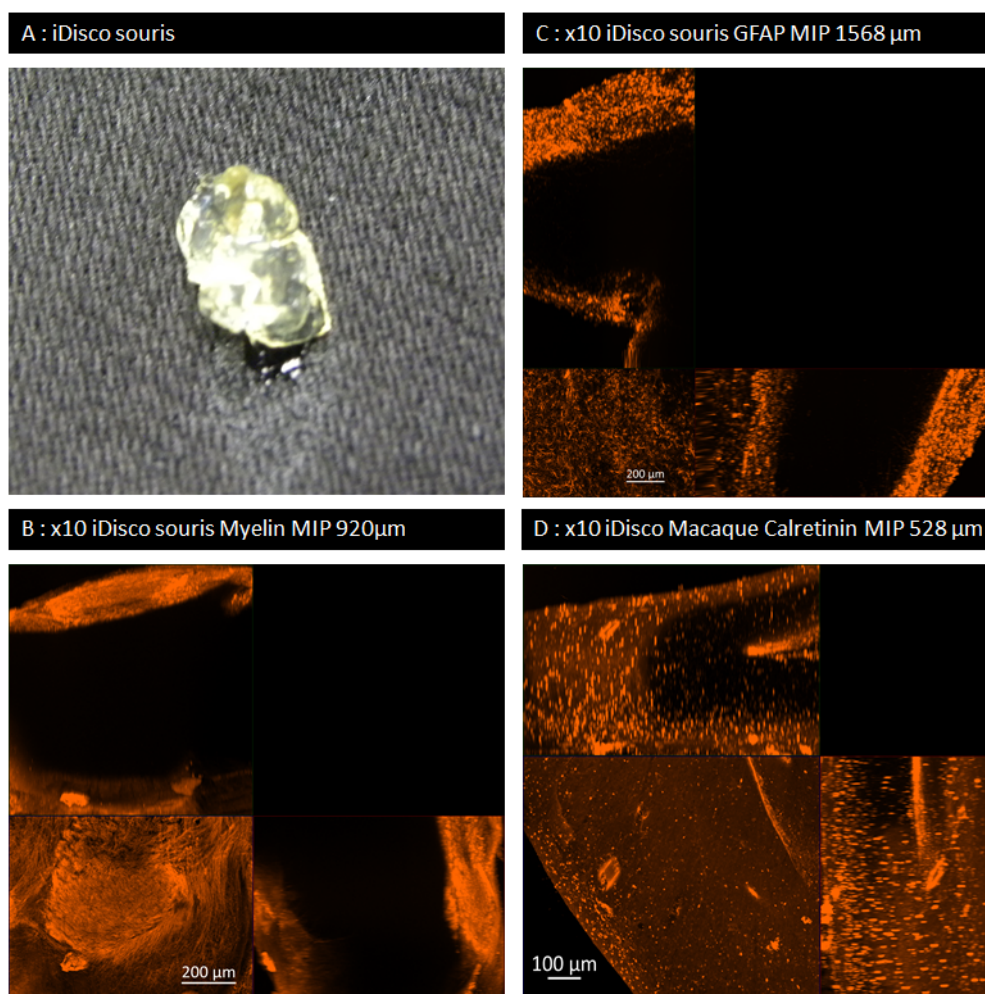


FIG. 5.4 – Méthode iDISCO appliquée sur un hémisphère de souris (A), immunomarquages sur des échantillons de souris (Myéline, B ET GFAP, C) et de macaque (Calretinine, D), grossissement x10

La Figure 5.5 montre des résultats obtenus sur un cerveau de souris APP/PS1, exprimant certains marqueurs de la maladie d'Alzheimer. La coloration ThioS, utilisée classiquement pour révéler les plaques amyloïdes sur des coupes en 2D [Gunter *et al.*, 1992], a été appliquée à un hémisphère de cerveau de souris. Le protocole de la coloration ThioS utilisé en 2D et en 3D est indiqué en Annexe C.9.

Les images ont été acquises avec le microscope à feuillet de lumière de Lavis, en démonstration. La Figure 5.5 compare la coloration ThioS sur une coupe en 2D (image A, coupe de cerveau 20 μm) et un volume en 3D (image B, un demi-hémisphère). Les plaques amyloïdes sont parfaitement révélées, cependant la coloration a réduit drastiquement les tissus, la méthode iDisco utilisée pour rendre visibles en profondeur les plaques a réduit encore l'échantillon (environ x10 au total).

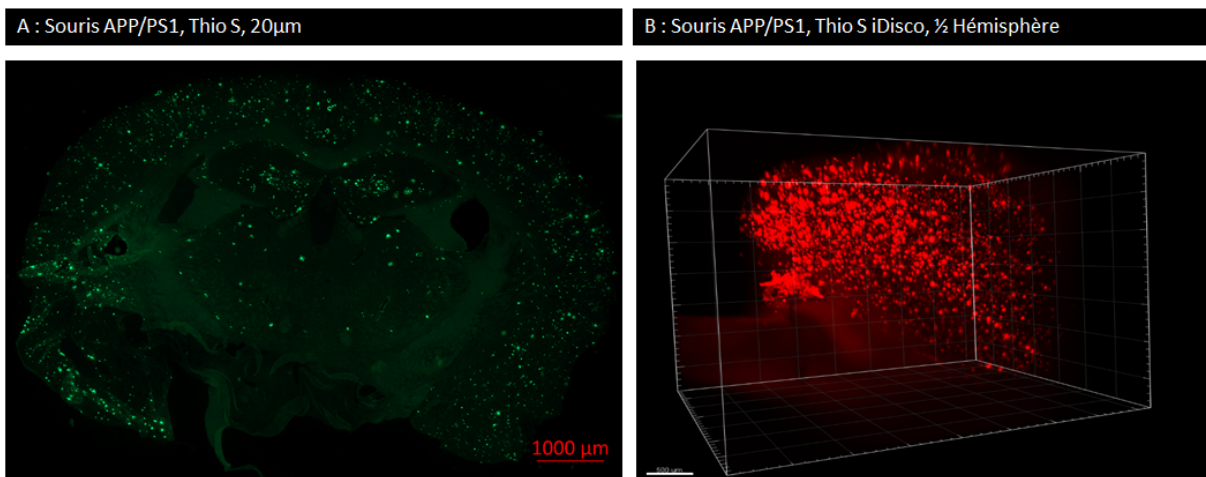


FIG. 5.5 – Plaques amyloïdes révélées par la coloration ThioS sur des échantillons de cerveau de souris en 2D (A) et 3D (B, transparisation par la méthode iDISCO)

Les conclusions de cette partie sont donc :

- Les différentes méthodes de transparisation publiées que j’ai pu tester donnent des résultats sur des échantillons de cerveaux de souris, de rat et de macaque.
- Les immunomarquages réalisés avec ces protocoles de transparisation montrent que la progression des anticorps en profondeur est difficile, des procédures de perméabilisation préalable aux immunomarquages plus efficaces sont nécessaires.
- La coloration vasculaire avec le colorant DIL n’est compatible qu’avec la méthode CUBIC mais de façon partielle.

5.3 GClear

Suite à l’ensemble des tests réalisés avec les différentes méthodes déjà publiées, j’ai préféré utiliser les méthodes en solutions aqueuses, plus compatibles avec les immunomarquages, nécessitant moins de réactifs toxiques même si cela signifie ne pas atteindre le niveau de transparence accessible avec la méthode iDISCO. Ces méthodes sont également beaucoup plus longues, mais nécessitent peu de manipulations contrairement aux méthodes iDISCO, CLARITY...

5.3.1 Mise au point

En partant de la méthode *Scale*, j'ai commencé par préparer une solution à base de Glucose (25%), Urée (7M) et Glycérol (25%), en PBS 0,1 M . Cette solution, appelée GClear, a donné quelques résultats intéressants, quoique relativement similaires à la méthode *Scale*.

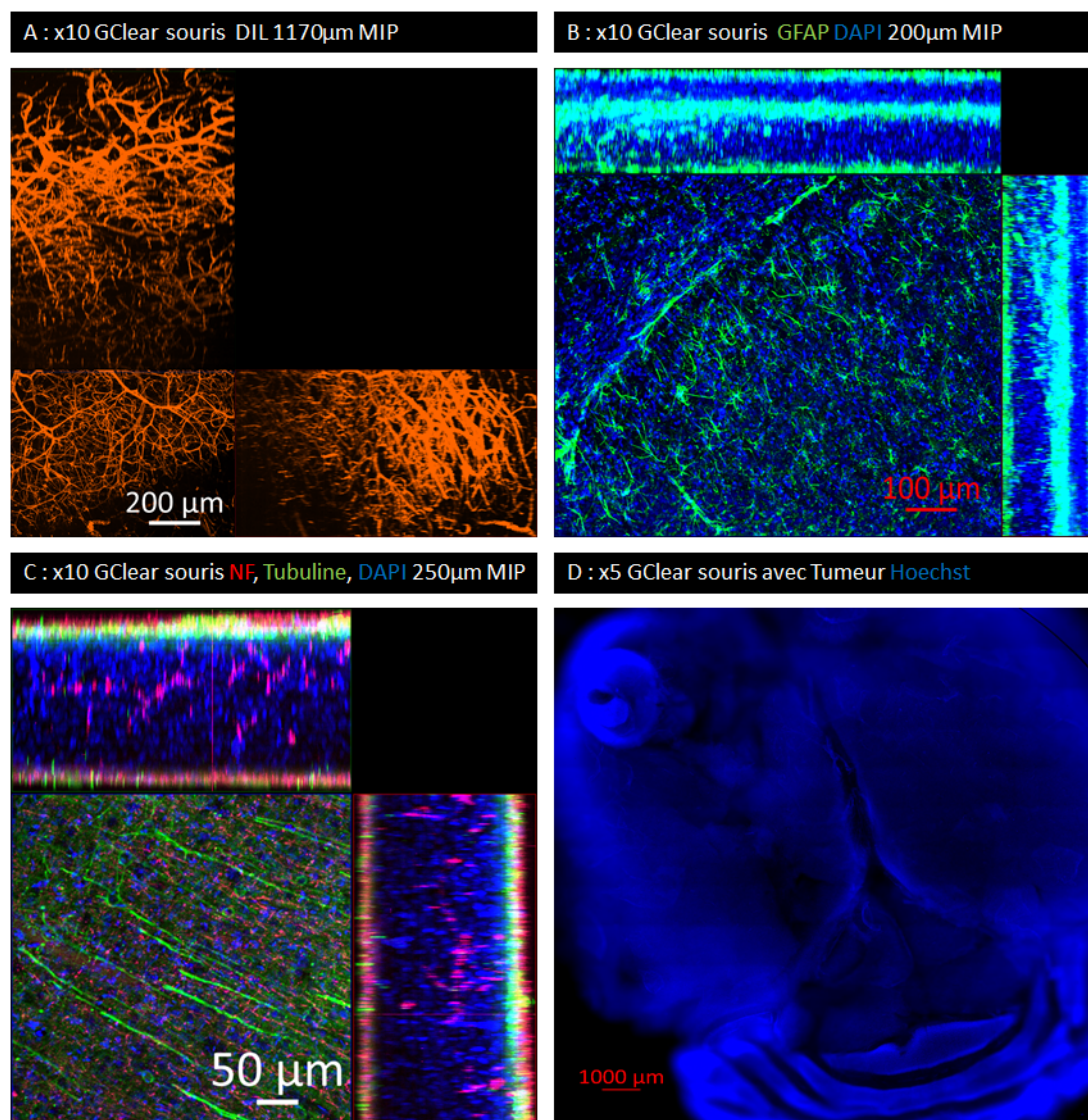


FIG. 5.6 – Échantillons de souris transparisés par la méthode GClear (A : vaisseaux en DIL, B : GFAP, C : NF plus Tubuline, D : Hoechst 33342), grossissement x10 (A, B, C) et x5 (D)

La Figure 5.6 illustre la transparisation de cerveau de souris injectées avec du DIL pour visualiser les vaisseaux sanguins (Image A). Les images B et C illustrent les résultats obtenus en immunomarquage mais la profondeur atteinte est faible (100-200 µm), certains anticorps restant uniquement en surface (Tubuline, image C). L'image D correspond à une mosaïque d'images prises en z-stack à un grossissement x5, d'un cerveau de souris porteuse de tumeur, transparisé et dont les noyaux ont été colorés avec du Hoechst 33342.

La Figure 5.7 illustre la transparenisation d'un ganglion buccal d'*Aplysia Californica*, dont les noyaux ont été colorés avec du Hoechst 33342, après 24 heures dans la solution GClear. Les limaces de mer n'ont pas un système nerveux central mais plusieurs ganglions de cellules neuronales, chaque ganglion étant relié à un type d'activité. Ces animaux ont été utilisés pour l'imagerie de la cellule unique par l'IRM à très haut champ. J'ai collaboré avec Luisa Ciobanu et Ileana Jelescu sur ce projet, en prélevant les cellules d'intérêt (R2, 500 μm) [Jelescu *et al.*, 2014], et il m'a paru intéressant de visualiser *in situ* la position des cellules les unes par rapport aux autres, en transparenisant un ganglion entier. L'image A montre le ganglion avant transparenisation, avec la gangue opaque qui recouvre les cellules. L'image B montre que le ganglion rendu transparent en GClear, les cellules sont autofluorescentes dans le rouge, les noyaux sont colorés avec du Hoechst 33342.

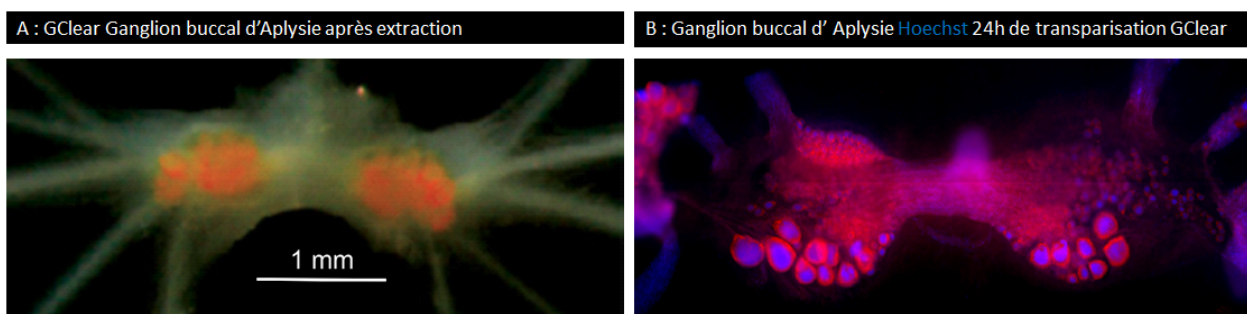


FIG. 5.7 – Méthode GClear appliquée à la transparenisation d'un Ganglion buccal d'Aplysie après extraction (A), et après transparenisation (B)

Sur les échantillons de cerveaux de rongeurs, coupes ou hémisphères cérébraux, il est possible d'inverser la transparenisation facilement en remettant les échantillons dans une solution tampon, si l'on souhaite ré-utiliser un échantillon pour un deuxième immunomarquage par exemple, comme montré en Annexe C.10, mais le gonflement du tissu perdure après l'inversion. La transparenisation est néanmoins lente sur un cerveau entier et prend plusieurs semaines pour un résultat incomplet. Un gonflement important des tissus apparaît, quoique moins important que celui observé avec la méthode CUBIC pour un effet transparent similaire à la méthode SScale.

J'ai ensuite modifié la solution afin d'essayer d'obtenir une meilleure transparenisation, en modifiant le sucre utilisé pour du sucrose (GClear2) ou du fructose (GClear3). Remplacer en partie le glycérol par un des composants de la méthode CUBIC (Tétrakis) a permis de considérablement éclaircir les tissus. J'ai modifié plusieurs fois les pourcentages avant d'obtenir une solution utilisable en une fois, sans manipulations multiples, assez satisfaisante en termes de transparenisation. Le protocole permettant de préparer les solutions GClear1 à GClear6 est détaillé à la Figure C.15 (Annexe C.10), ainsi que ceux des méthodes CUBIC et SeeDB.

La solution GClear6 m'a permis de conserver une partie de la coloration DIL et d'obtenir une image de la vascularisation en profondeur de cerveau de souris, grâce à un collaborateur de la société Zeiss qui a acquis les images sur leur microscope à feuillet de lumière, gracieusement.

La Figure 5.8 illustre les résultats obtenus sur un cerveau de souris adulte. Les inconvénients majeurs de cette solution sont le gonflement important qu'elle génère, la fragilité de l'organe ainsi transpa-risé, ainsi que la durée totale du procédé, avoisinant les deux mois.

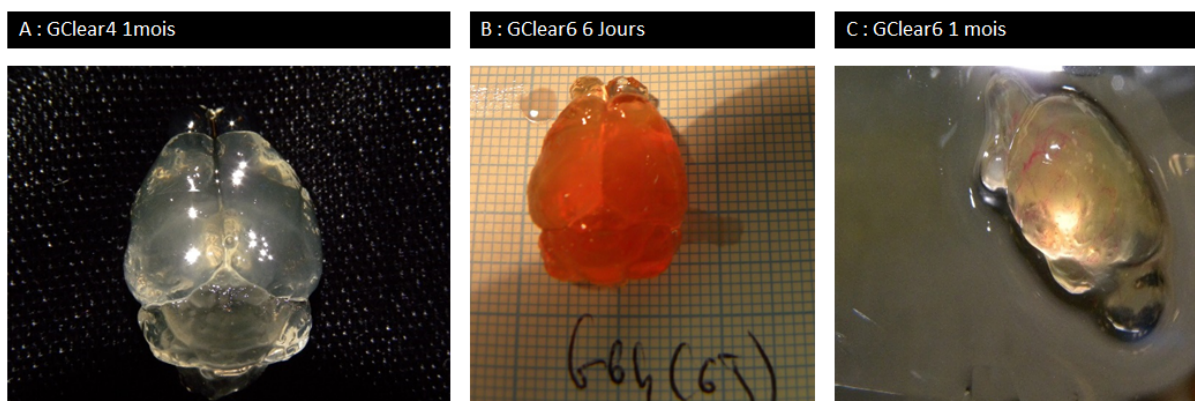


FIG. 5.8 – Cerveaux de souris transpa-risés par la méthode GClear 4 (souris non traitée A) et GClear 6 (souris perfusée avec le colorant DIL, B et C)

La Figure 5.9 illustre les résultats obtenus sur environ 1/4 de cerveau de souris, perfusée avec le colorant DIL. Bien que la coloration soit en grande partie éliminée, ce qu'il en reste suffit à bien identifier l'arbre vasculaire, capillaires compris.

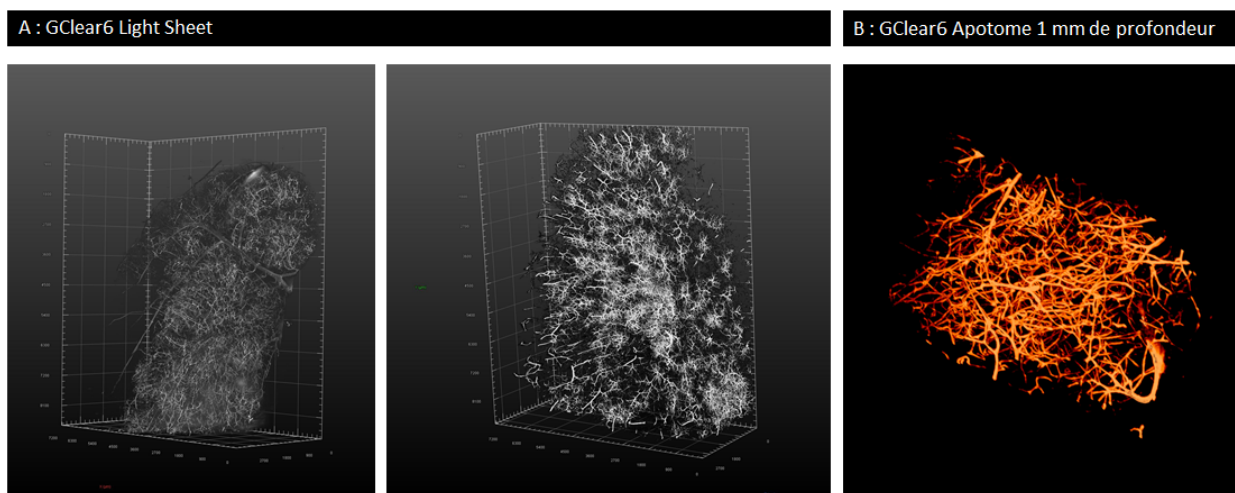


FIG. 5.9 – Méthode GClear6, coloration DIL

Je me suis ensuite attachée à réduire le gonflement des tissus induit par les solutions utilisées et à accélérer la transpa-risation. J'ai modifié de nombreuses fois mes protocoles, en fonction de mes lectures de la bibliographie et des réactifs disponibles sur le marché. Une partie des solutions, à base notamment de fructose, ne sont pas stables, une oxydation importante des sucres ayant lieu au cours du temps, jaunissant rapidement les solutions.

La Figure C.16 de l'Annexe C.10 illustre cette oxydation. L'utilisation de la vitamine C comme anti-oxydant s'est révélée insuffisante. Le remplacement par le sorbitol (inspiré de la méthode ScaleS) d'une partie des sucres a limité partiellement le gonflement et l'oxydation. L'utilisation des molécules anti-ternissement (anti-fading en anglais) que sont le gallate de propyle et la p-phenylenediamine [Longin *et al.*, 1993] pour conserver la fluorescence n'a pas donné les résultats escomptés, les sucres contenus dans les solutions s'oxydant encore plus rapidement. Cependant une autre molécule, le DABCO (DABCO pour 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane) [Valnes et Brandtzaeg, 1985], permet d'intensifier le signal sans effets de jaunissement des solutions.

L'utilisation de solution de tampon borate plutôt que de solution de tampon phosphate (inspiré de la méthode CLARITY) m'a permis de mieux conserver mes échantillons sur une durée importante et de diminuer l'auto fluorescence verte, réhaussant le signal de la fluorescence spécifique. L'utilisation d'un anti-oxydant puissant tel que l'acide oxalique a permis de réduire fortement les oxydations des sucres et mais également de réduire le gonflement. La solution RIMS [Yang *et al.*, 2014] contenant 88% d'Histodenz donne de bons résultats en transparisation, mais a un coût important, le réactif Histodenz étant relativement onéreux. En incluant le Nicodenz, un équivalent de l'Histodenz mais moins concentré (15%) dans ma solution de transparisation, j'ai gagné en vitesse de transparisation sans augmenter trop les coûts. J'ai testé l'ajout de détergents forts mais il s'en suit inmanquablement une perte de tout ou partie de l'échantillon. J'ai également testé l'effet de la température, afin de vérifier si en maintenant à 37°C mes échantillons pendant la transparisation il est possible d'accélérer le phénomène. Il m'est apparu que je perdais bien plus de signal à 37°C qu'à température ambiante (résultats non montrés).

5.3.2 Protocole retenu

Après de nombreux essais, je suis arrivée à la conclusion que ma solution GClear17d3 était ma meilleure solution de transparisation. Stable pendant des mois, d'un indice de réfraction de 1,45, elle permet d'obtenir un tissu qui va de partiellement transparent (non perméabilisé) à clair (perméabilisé), en quelques heures (pour une coupe de 500 μm) à 15 jours (pour un échantillon de quelques mm) et elle n'induit qu'un gonflement limité. Je l'ai beaucoup utilisée pour les immunomarquages, conjointement aux essais de perméabilisation (voir Paragraphe 5.4).

La solution GClear17d3 contient les ingrédients suivants en tampon borate 0.1M :

- Sorbitol 15%
- Urée 6M
- Nicodenz 15%
- Azide de sodium 0,02%
- Acide oxalique 0,025%
- Glycérol 10% (masse)
- Sucrose 7,5%
- Citrate trisodique 0,1%
- DABCO 0,1%

Le protocole de préparation de la solution est indiquée en Annexe C.11. Cette solution est utilisable avec les cerveaux perfusés avec le colorant en DIL, pour visualiser la vascularisation. Après 48 heures il est déjà possible d'obtenir un signal visible sur une profondeur de 600-800 μm . La perte du signal est limitée durant plusieurs semaines. Bien que relativement satisfaite de ma solution GClear17d3, je continue de la faire évoluer.

La solution GClear17d4 a la même composition que GClear17d3 mais sans DABCO, et elle donne de moins bons résultats. Modifiée en contenant moins d'urée (3M) et des détergents doux (gammacyclodextrine, 3-(1-Pyridinio)-1-propanesulfonate), la solution GClear17d5 permet d'obtenir un effet transparisant plus important et plus rapide, mais ne permet plus d'utiliser la méthode DIL pour visualiser les vaisseaux sanguins. La solution GClear17d5 entraîne également un gonflement plus important. Les détergents utilisés pour GClear17d5 sont ceux utilisés pour les solutions de perméabilisation (voir Paragraphe 5.4). La Figure 5.10 illustre les résultats obtenus sur coupes épaisses (1 à 2 mm) de cerveau de rat, perfusé en DIL, au cours du temps.

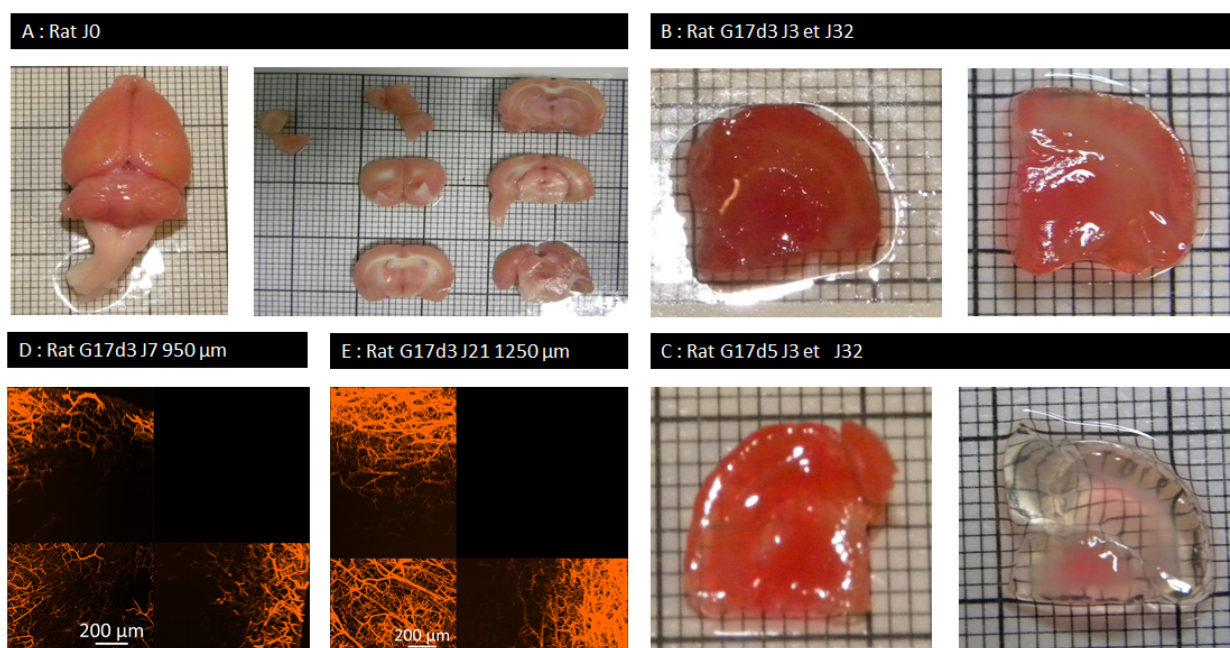


FIG. 5.10 – Rat perfusé en DIL, transparisé par la méthode GClear17d3 ou d5. Photographies prises à J0 (A), J3 et J32 (B et C), images MIP (D et E)

La Figure 5.11 illustre les résultats obtenus sur un cerveau de souris APP/PS1 coloré à la thioflavine (ThioS), comme déjà réalisé pour tester iDISCO. Cette coloration a été réalisée par Flavie Perrot, en licence par alternance au laboratoire. Les plaques amyloïdes sont bien visibles, la profondeur atteinte après six jours de transparisation atteint 1200 μm avec la solution GClear17d10 comme le montre les images réalisées en apotome. La réduction des tissus est très importante et la transparisation en solution aqueuse ne permet de contrebalancer que partiellement cette réduction.

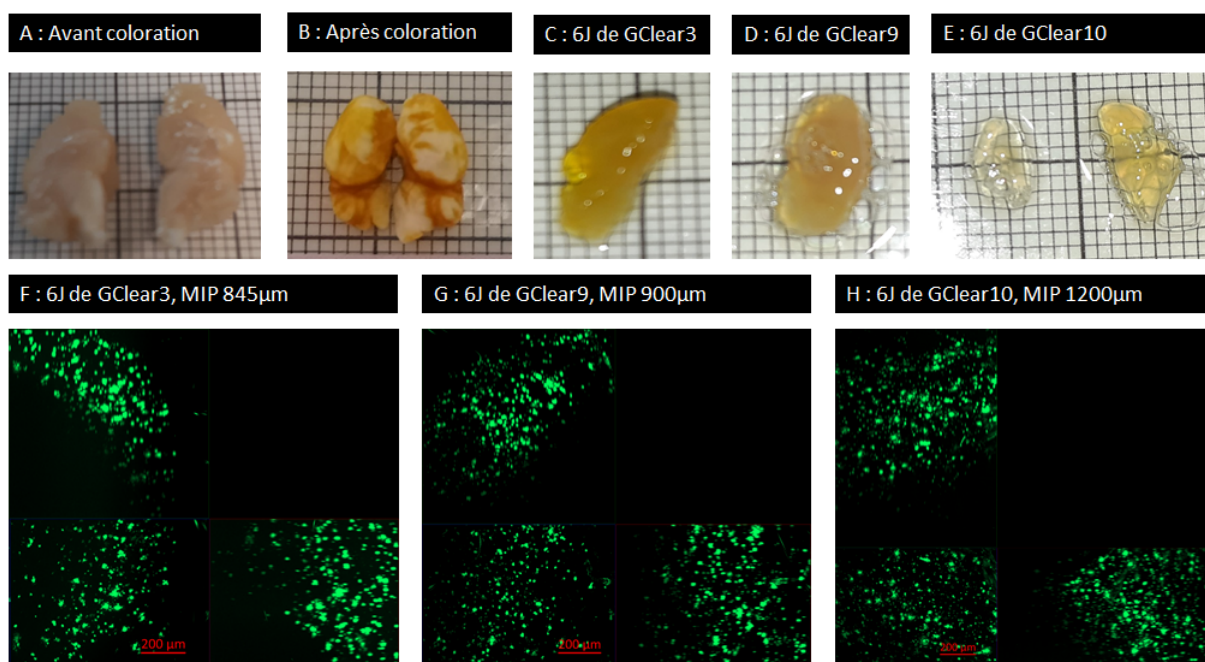


FIG. 5.11 – Photographies de cerveau de souris APP/PS1 avant la coloration à la Thioflavine (A), après coloration (B) puis transparaïsé par la méthode GClear17d3 (C, F), d9 (D, G) ou d10 (E, H)

Les échantillons seront ré-utilisés ultérieurement pour réaliser des immunomarquages. En effet, sur des coupes fines (20 µm), j'ai mis au point pour le projet TADUS la coloration Thioflavine associée à la révélation des astrocytes et des microglies par immunomarquages (voir Annexe C.13, Figure C.19) et j'aimerais tester ce protocole en 3D. Les premiers essais sont intéressants sur la révélation des astrocytes par la GFAP. La Figure 5.12 illustre les immunomarquages réalisés sur les tissus déjà colorés en thioflavine.

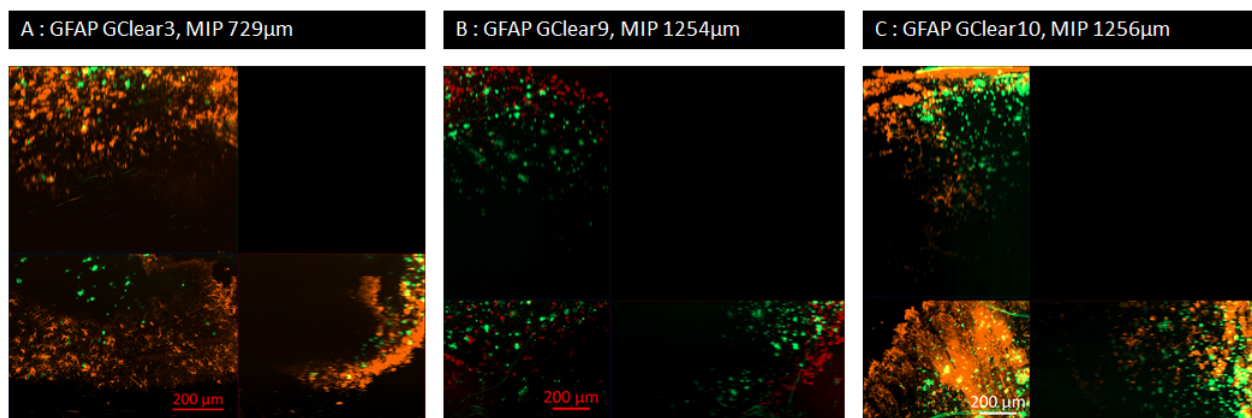


FIG. 5.12 – Cerveau de souris APP/PS1 coloré à la Thioflavine et immunomarqué en GFAP puis transparaïsé par la méthode GClear17d3 (A), d9 (B) ou d10 (C)

Des variantes intermédiaires entre les solutions GClear17d3 et GClear17d5 sont en cours d'étude pour tester la résistance des colorants vasculaires en gels (voir Paragraphe 5.5), ainsi que sur un cerveau de rat, perfusé en DIL partiellement (problème d'exanguino-perfusion).

La Figure 5.13 illustre les premiers résultats obtenus sur des coupes épaisses (un à deux millimètres) de cerveau de rat, partiellement perfusé en DIL. La transparisation à J5 est déjà suffisante pour voir les traits de la feuille de papier millimétré au travers des coupes incubées en GClear17d9 et d10 mais pas en d8. Ces essais sont en cours et seront gardés en observation pendant plusieurs semaines.

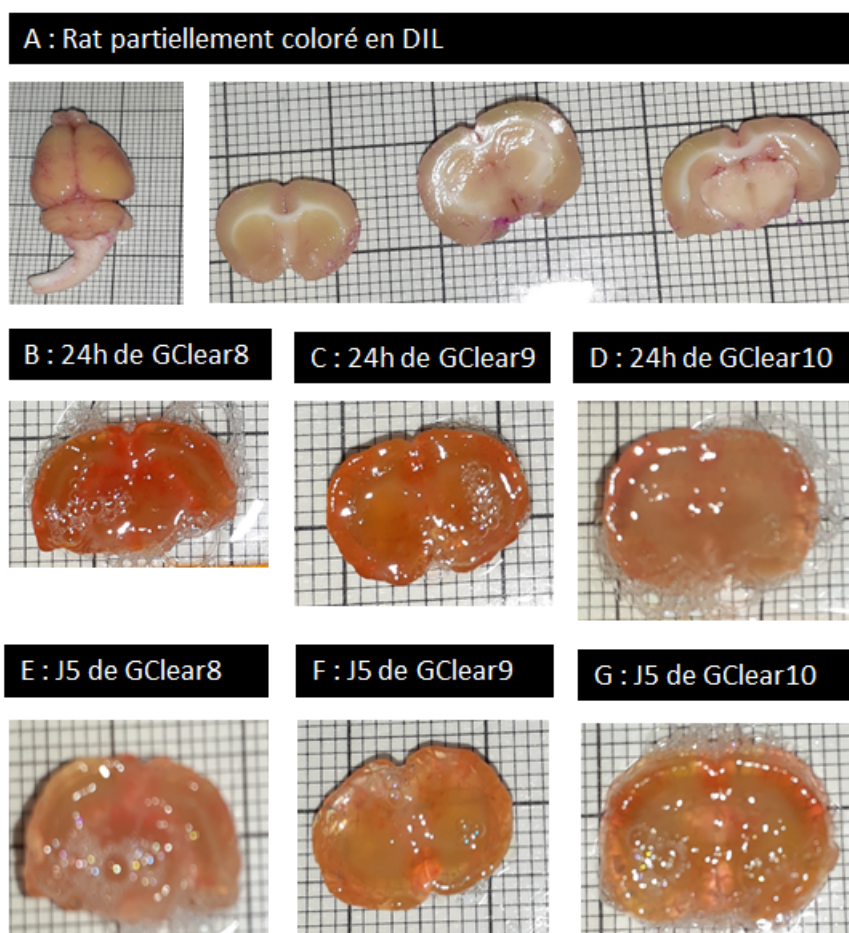


FIG. 5.13 – Photographies de cerveau de rat partiellement coloré en DIL, avant transparisation (A), après 24 heures ou cinq jours de transparisation par la méthode GClear17d8 (B, E), d9 (C, F) et d10 (D, G)

5.4 Protocoles de perméabilisation

L'utilisation des solutions de transparisation, quelle que soit la méthode employée, permet d'obtenir un tissu transparisé autorisant les images en profondeur, plus ou moins importantes selon les méthodes. Cependant les immunomarquages sont limités du fait de la profondeur que peuvent atteindre les anticorps en pénétrant et diffusant dans le tissu. Afin d'améliorer les immunomarquages, j'ai travaillé sur des protocoles de perméabilisation en même temps que je développais des solutions de transparisation.

J'ai testé différents protocoles de perméabilisation, avant d'ajouter les anticorps, à température ambiante ou à 37°C. Afin de perméabiliser en profondeur le tissu sans le détruire, j'ai testé plusieurs classes de détergents. Les détergents non anioniques, comme le Triton™ X-100 ou le TWEEN 20, sont doux mais pas assez puissants pour laisser pénétrer les anticorps. Les détergents anioniques, comme le SDS ou le sarcosinate de sodium lauroyle sont plus forts mais également plus destructeurs. Les agents zwitterioniques et les sulfobétaïnes, comme le 3-(1-Pyridinio)-1-propanesulfonate sont très doux et non destructeurs pour les protéines. Mélanger les détergents permet de préserver les antigènes tout en perméabilisant plus avant les tissus. Les solutions de perméabilisation éclaircissent également les tissus, par la délipidation qu'elles entraînent comme les méthodes de transparisation.

Dans tous les cas, les solutions de perméabilisation augmentent considérablement la transparisation des cerveaux en solution de transparisation GClear17d3, comme montré par la Figure 5.14 (cerveau de souris) et la Figure 5.15 (cerveau de rat).

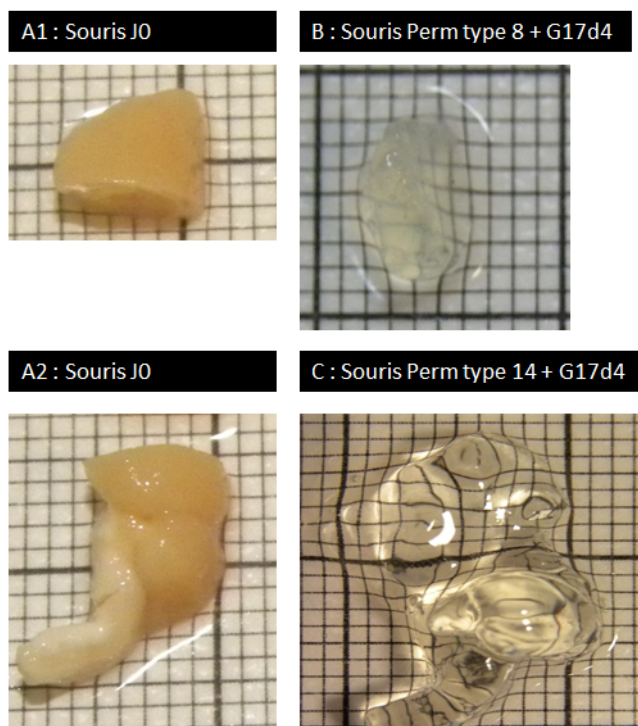


FIG. 5.14 – Cerveaux de souris perméabilisés et transparisés par la méthode GClear

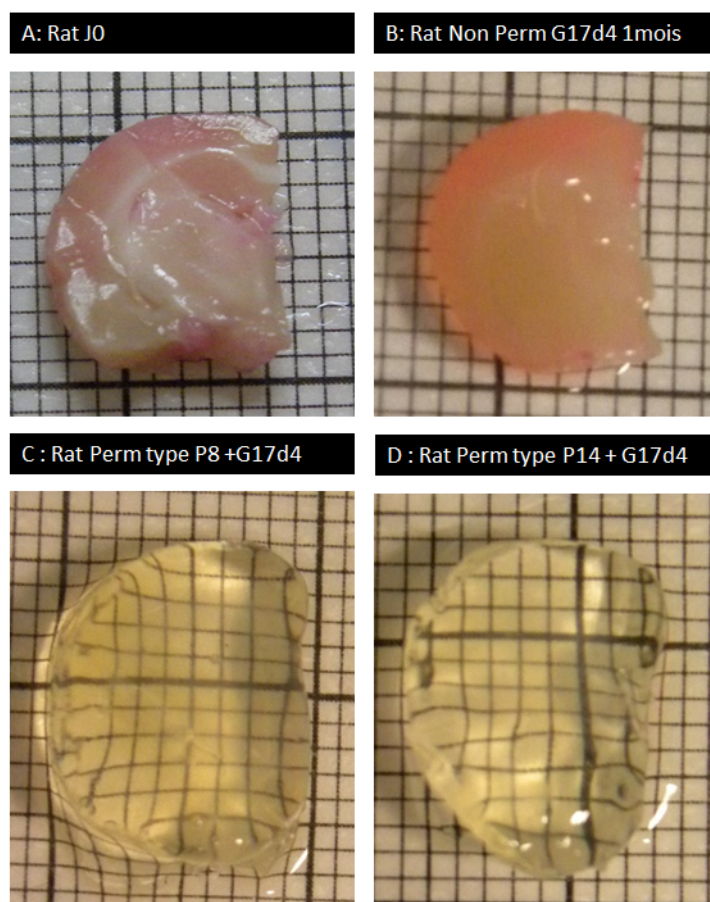


FIG. 5.15 – Cerveaux de rat perméabilisés et transparisés par la méthode GClear

Une partie des protocoles testés dérive de la méthode *Scale* par l'utilisation des cyclodextrines, ou de la méthode *iDISCO* (Triton™ X-100, méthanol), mais aussi des connaissances que j'ai pu acquérir sur les détergents utilisés en cosmétique (par exemple, sarcosinate de sodiumlauroyle, 3-(1-Pyridinio)-1-propanesulfonate, Plantapon™...). Bien qu'ils demeurent malheureusement toujours imparfaits, les protocoles développés ont permis d'augmenter la profondeur atteinte par les anticorps ou bien d'utiliser un anticorps qui ne donnait que peu de résultats précédemment, comme le marqueur des microglies *Iba1*.

Le protocole de perméabilisation et d'immunomarquage est en constante évolution à ce jour. En effet, les durées de perméabilisation, d'incubation et la concentration des anticorps doivent être adaptées à la taille et la nature de l'échantillon et des anticorps. Si j'ai obtenu de bons résultats en *Iba1* (microglies) sur des coupes de 500 μm , le marquage des astrocytes est toujours variable, les couches supérieures étant très souvent beaucoup plus intenses que les zones internes. La révélation de la myéline est délicate, trop de détergents faisant disparaître le signal, pas assez de détergents limitant le marquage aux couches superficielles.

Les anticorps anti-NeuN révélant les neurones n'ont donné des résultats que sur des coupes de 500 μm . Les anticorps liés au calcium, la Calbindine (CB, pour Calbindine), la Calrétinine (CR, pour Calrétinine) et la Parvalbumine (PV, pour Parvalbumine) déjà utilisés avec

la méthode iDISCO, ont été testés avec ces méthodes sur des coupes de cerveaux de macaque et de rat, avec une assez bonne pénétration. La Vimentine donne aussi quelques résultats sur des coupes de cerveaux de souris porteuse de tumeur U87. Les concentrations d'anticorps utilisés sont aussi un point important à résoudre, trop d'anticorps faisant apparaître une surexposition des couches en surface, et trop peu ne permettant pas de marquer les zones plus profondes.

À ce jour, mes meilleurs protocoles consistent à perméabiliser les échantillons pendant une semaine, en changeant deux fois la solution, puis à mettre les échantillons dans la même solution de perméabilisation avec les anticorps primaires pendant 15 jours ou plus. Puis les échantillons sont rincés pendant plusieurs jours dans la même solution de perméabilisation avant d'être mis en contact avec les anticorps secondaires. J'ai utilisé des demi-hémisphères de cerveaux de souris, des coupes de cerveaux de rat épaisses (1-2 mm) ou semi-épaisses (500 μm).

Mes meilleures solutions de perméabilisation sont un mélange de détergents comprenant de la méthylcyclodextrine, de la gammacyclodextrine, du 3-(1-Pyridinio)-1-propanesulfonate, du sarcosinate de sodiumlauroyl, de l'acide hyaluronique, du Plantapon™. Les solutions sont encore en développement, mais deux solutions différentes (P8 et P14) m'ont donné des résultats particulièrement intéressants. La différence entre ces solutions est l'utilisation pour la solution P14 d'un détergeant plus agressif, le Plantapon™ utilisé en industrie cosmétique, ainsi que son association avec de l'acide hyaluronique.

La solution de type P8 associe les réactifs suivants, en tampon borate 0,1M :

- Azide de sodium 0,02%
- 1 mM de methyl cyclodextrine
- 2 mM de gamma cyclodextrine
- 3-(1-Pyridinio)-1-propanesulfonate 10%
- Sarcosinate de sodiumlauroyl 15%

La solution de type P14 associe les réactifs suivants, en tampon borate 0,1M :

- Azide de sodium 0,02%
- Plantapon™ 0,25%
- 2 mM de gamma cyclodextrine
- acide hyaluronique 0,01%
- 3-(1-Pyridinio)-1-propanesulfonate 10%
- Sarcosinate de sodiumlauroyl 15%

La Figure 5.16 illustre une partie des résultats obtenus en immunomarquages chez le rat et la souris, en associant une solution de perméabilisation (type P8) et de transparenisation GClear17d3. C'est ce protocole qui permet d'avoir le meilleur immunomarquage en profondeur sur les astrocytes, à ce jour, en termes d'homogénéité du signal en profondeur (images A, C et D). Ce protocole a également donné des résultats satisfaisants sur les microglies mais uniquement sur des coupes de $500\mu\text{m}$ (Image E). Sur la myéline, les résultats sont peu profonds et restent à améliorer (image B et F).

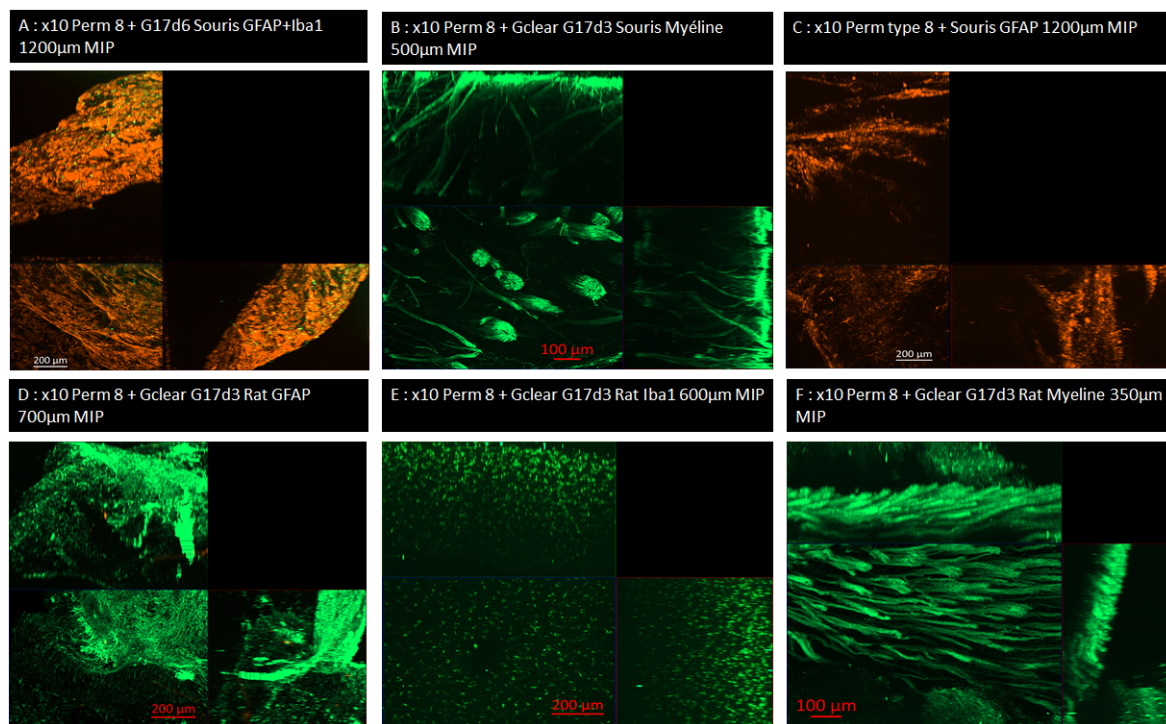


FIG. 5.16 – Immunomarquages sur des cerveaux de souris (A, GFAP plus Iba1 ; B, Myéline ; C, GFAP) et de rat (D, GFAP ; E, IBA1 ; F, Myéline) perméabilisés et transparenisés (type P8), grossissement x10

La Figure 5.17 illustre une partie des résultats obtenus en immunomarquages sur des cerveaux de rat et de souris, en associant une solution de perméabilisation (type P14) et transparenisation GClear17d3. Ce protocole permet d'obtenir un tissu très clair sur une profondeur d'au moins 2 mm, le signal étant visible de part et d'autre de l'échantillon. Cependant, le rendu 3D sur le marquage astrocytaire montre une moins bonne pénétration de l'anticorps anti-GFAP en z (images A, C et D). Ce manque de signal peut aussi être dû à la difficulté d'acquérir un signal plus faible en profondeur qu'à la surface. Le marquage des microglies est identique à celui obtenu avec la perméabilisation P8 et visible sur coupes de $500\mu\text{m}$ (image E). Le marquage de la myéline est assez inégal d'un échantillon à l'autre (images B et F), parfois uniquement visible en surface, parfois capable de montrer les fibres sur plus d'un millimètre.

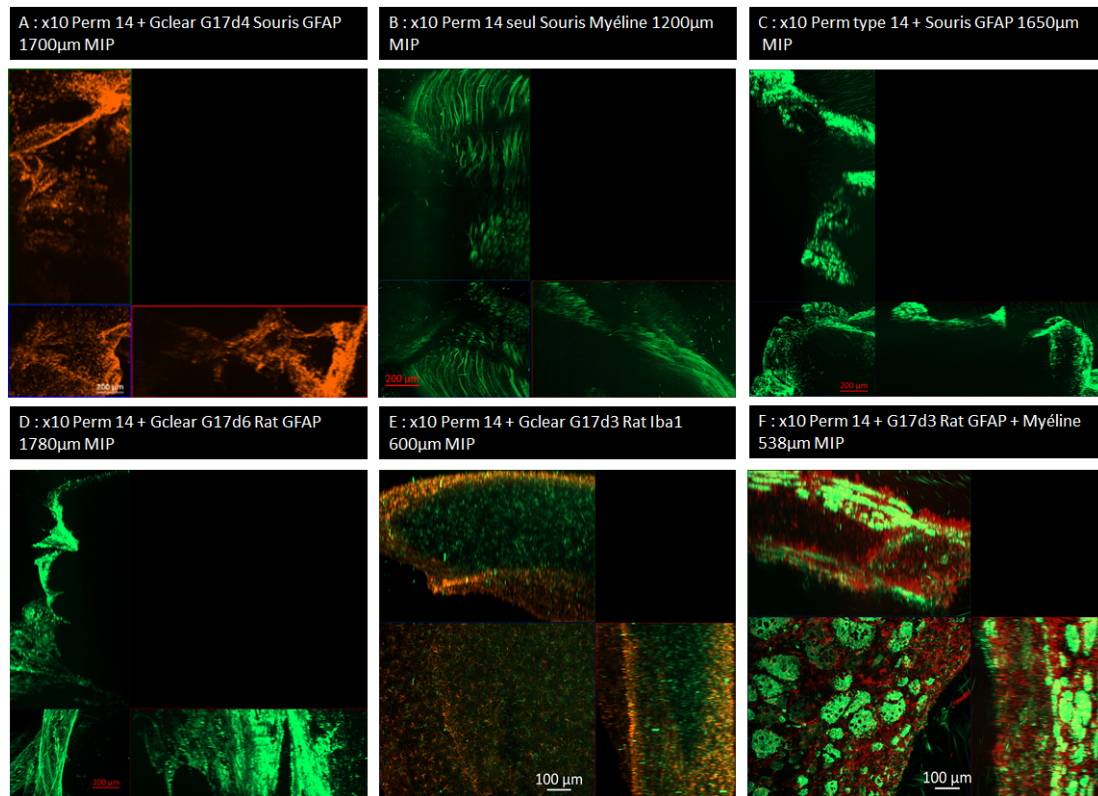


FIG. 5.17 – Immunomarcages sur des cerveaux de souris (A, GFAP ; B, Myéline ; C, GFAP) ou de rat (D, GFAP ; E, Iba1 ; F, GFAP plus Myéline) perméabilisés et transparentisés (type P14), grossissement x10

La Figure 5.18 illustre une partie des résultats obtenus en immunomarcages (Calbindine, Calrétinine, Parvalbumine, Vimentine) ou en coloration (Neurotrace™) sur des cerveaux de macaque et rongeurs, en associant une solution de perméabilisation (type P14) et de transparensation GCclear17d3. Le marquage des astrocytes ou des cellules tumorales par la Vimentine est encore insuffisant, restant en surface (image A). Les marquages des neurones inhibiteurs liés au calcium chez le macaque (CR image B, CB, image C) donnent des résultats sur une profondeur de $500\mu\text{m}$ mais guère plus. Je pense que la perméabilisation de type P8 conviendrait mieux pour ces anticorps, mais je n'ai pas encore testé cette hypothèse. Sur les cerveaux de rat, ces marqueurs donnent des résultats assez inégaux d'une structure à l'autre, le cortex (image E) donnant des résultats sur plus de profondeur que l'hypothalamus (image D), où l'on retrouve néanmoins des réseaux de neurones exprimant la parvalbumine de façon intense. L'image F illustre les résultats obtenus avec un colorant des neurones (Neurotrace™), le NeuN, marqueur des neurones le plus fréquemment utilisé en 2D ne donnant que peu de résultats en profondeur, à ce jour.

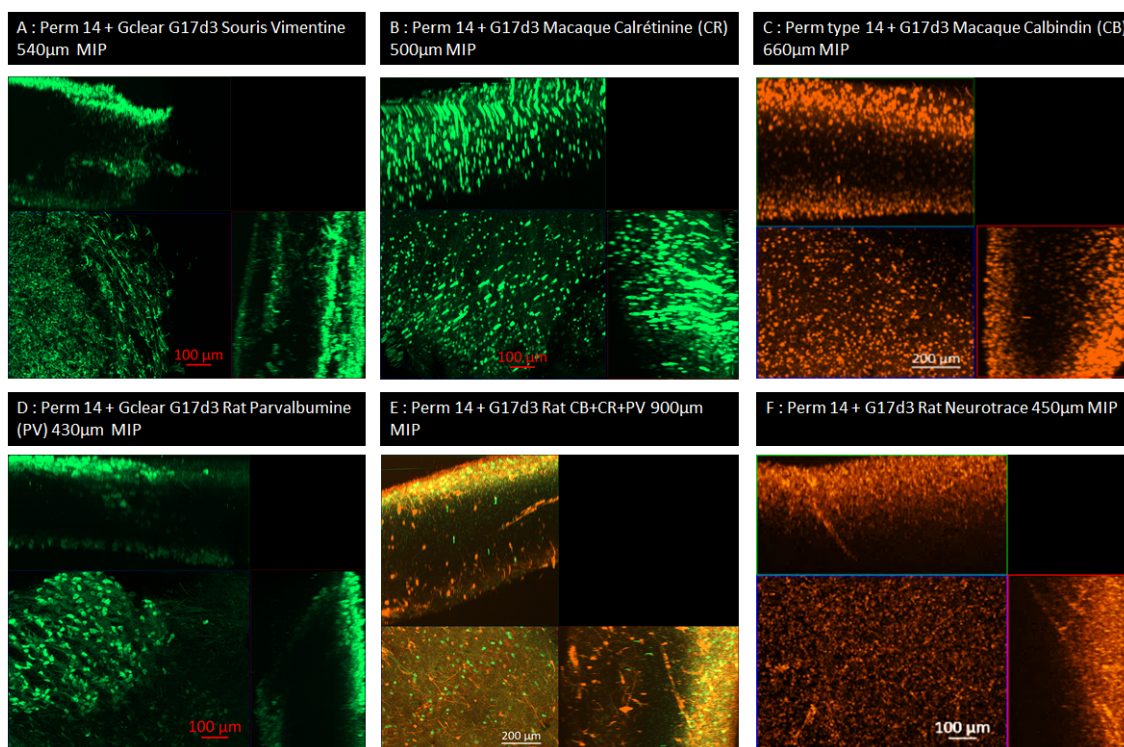


FIG. 5.18 – Immunomarquages sur cerveaux de souris (A, Vimentine), de macaque (B, Calrétinine; C, Calbindine) et de rat (D, Parvalbumine; E, Calbindine plus Calrétinine plus Parvalbumine; F, Neurotrace™), perméabilisés et transparisés (type 14), grossissement x10

Bien qu'encore insuffisants pour révéler les marqueurs dans un cerveau entier, les résultats sont assez prometteurs pour continuer dans cette voie, considérant les différentes marges de progression. La durée d'incubation des anticorps, les temps de transparisation ainsi que les solutions utilisées, les références d'anticorps sont autant de facteurs sur lesquels jouer.

Les conclusions de cette partie sont donc :

- La solution GClear est compatible avec les immunomarquages et la coloration DIL.
- La solution GClear est insuffisante seule (GClear17d3) pour rendre les tissus complètement transparents, elle complète les solutions de perméabilisation.
- Avec la perméabilisation, la coloration DIL est perdue, d'autres approches sont nécessaires pour visualiser la vascularisation cérébrale.
- Les immunomarquages peuvent donner un signal sur des coupes de 500 à 2000 μm , ils sont cependant assez variables d'un type de perméabilisation à l'autre, d'un anticorps à l'autre.

5.5 Visualisation de la vascularisation

Les méthodes de coloration des vaisseaux avec des colorants lipophiles tels que le colorant DIL [Li *et al.*, 2008] ou des lectines [Roussel et Dalion, 1988, Robertson *et al.*, 2015, Craver *et al.*, 2016] permettent de visualiser l'arbre vasculaire, en pénétrant les membranes cellulaires des cellules endothéliales. Si le colorant DIL n'est pas d'un coût excessif, ce n'est pas le cas des autres réactifs, notamment pour colorer un cerveau entier. J'ai commencé à utiliser le colorant DIL dans le cadre d'un projet sur des coupes 20 μm , le projet CIACM, avec Luisa Ciobanu (voir Figure C.18 en Annexe C.12). Lors de ce projet, j'ai testé plusieurs conditions de perfusion du colorant. Le colorant DIL est soluble dans l'éthanol absolu : une solution à 5 mM dans l'éthanol, diluée à 1/50 dans le sérum physiologique, perfusée après le sérum physiologique et avant le fixateur, permet d'obtenir un rendu satisfaisant.

J'ai testé les protocoles de transparisation sur des cerveaux perfusés avec le colorant DIL, comme montré précédemment (CUBIC, GClear). Malheureusement, les processus de transparisation utilisant des détergents ou des solvants organiques effluent les colorants lipophiles très rapidement, limitant l'utilisation de cette coloration. J'ai testé quelques autres molécules fluorescentes en perfusion post-PFA (CF640, ANSA, érythrosine B), mais la coloration est transitoire, durant 24 heures pour l'ANSA (ANSA, pour 8-Anilino-1-naphthalenesulfonic acid) ou ne résistant pas à la congélation pour l'érythrosine B.

La perfusion de billes de latex micrométriques fluorescentes donne de bons résultats, mais les détergents détruisant partiellement les membranes, les billes s'échappent des vaisseaux au cours du processus de délipidation, limitant l'intérêt. Les particules fluorescentes, en latex ou en polystyrène, sont aussi opaques, cachant potentiellement une partie des tissus.

La Tomato Lectine fluorescente couplée avec un fluorophore qui émet en 647 nm (rouge), injectée par voie intra-carotidienne cinq minutes avant l'exsanguinoperfusion, colore l'arbre vasculaire mais les procédures de perméabilisation et de transparisation diminuent le signal de façon importante, rendant l'acquisition des images en microscopie compliquée. La Figure 5.19 reprend quelques uns des résultats obtenus, en dehors du DIL, dans différentes conditions d'injection.

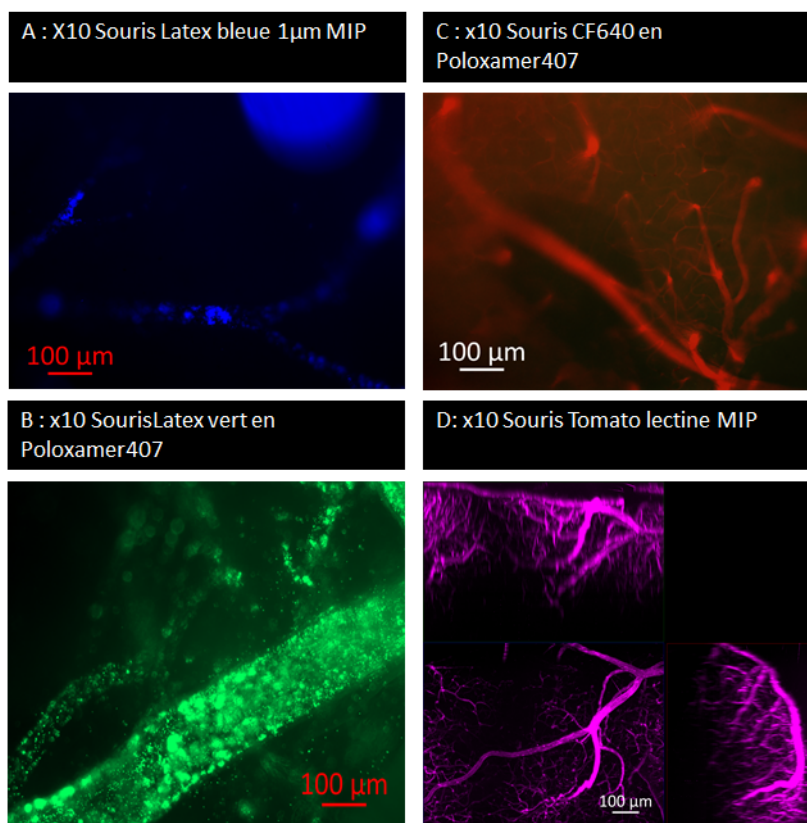


FIG. 5.19 – Visualisation de l'arbre vasculaire grâce à différents colorants : des billes de latex (A et B), par le fluorophore CF640 (C) et par une Lectine (D), grossissement x10

Le remplissage des vaisseaux sanguins par un gel fluorescent à base de gélatine contenant de l'albumine conjuguée-FITC [Di Giovanna *et al.*, 2017, Lugo-Hernandez *et al.*, 2017] donne de magnifiques images, mais à un coût excessif avoisinant les 700 euros pour une souris. J'ai repris l'idée de remplir les vaisseaux avec un matériau susceptible d'être fluorescent et de résister aux étapes de transparisation. Je me suis donc intéressée à la formation de gels et de résines.

La nécessité d'utiliser des matériaux transparents afin de pouvoir réaliser des images en profondeur limite les choix possibles de matériau. J'ai tout d'abord essayé différentes gélatines et des carraghénanes mais la température de 50-60°C nécessaire pour maintenir les solutions liquides pendant l'injection rend la perfusion délicate et les détergents utilisés pour les étapes de perméabilisation détruisent les gels, rendant inutile le remplissage des vaisseaux.

L'agar-agar est utilisable à condition de prendre une référence à bas point de fusion (low Melt) et d'une qualité ultra-transparente, relativement onéreuse, mais là aussi la température de perfusion est assez élevée. Une alternative intéressante est le Phytigel™ mais il doit être maintenu à une température également assez élevée (65-70°C) et gélifie très vite à température ambiante. Le Poloxamer407™, réactif formant des gels transparents et solides à température ambiante et restant liquide à froid [Cabana *et al.*, 1997, Fakhari *et al.*, 2017], est une possibilité également intéressante.

J'ai testé l'injection du Poloxamer 407 avec les billes de latex avec succès (image B, Figure 5.19). Cependant, la concentration élevée de Poloxamer 407 nécessaire (15-20%) rend plus difficile la perfusion, et rend indispensable de garder à température ambiante l'échantillon, ce qui est peu pratique d'un point de vue de conservation à long terme. L'inconvénient majeur étant que le gel ne résiste pas aux méthodes de perméabilisation, les billes s'échappent des vaisseaux et l'image 3D obtenue ne permet pas de visualiser l'arbre vasculaire (résultats non montrés).

L'utilisation de silicone injectable a déjà été rapportée dans la littérature [Pathak *et al.*, 2011]. J'ai testé un silicone utilisé dans les arts créatifs afin de remplir les vaisseaux sanguins, le Solaris, qui est très transparent. Ce silicone polymérise en mélangeant deux réactifs (partie A et partie B). La viscosité du mélange a donné lieu à des difficultés d'injection. La préparation du silicone injectable a été mise au point en testant différents ratios de mélange des parties A et B et d'un fluidifiant (Thinner). Le silicone ainsi préparé se solidifie après un passage de 15 minutes à 85°C. Il est possible de colorer le silicone avec du DIL ou du DIO afin de visualiser les vaisseaux en profondeur. J'ai tout d'abord utilisé la même concentration que celle testée avec méthode CUBIC (5 mM solution mère en éthanol, diluée au 1/50 dans le mélange de silicone).

La Figure 5.20 illustre le résultat obtenu en injectant du silicone avec un ratio 1/4 (A+B) et 3/4 Thinner, coloré avec du colorant DIL et transparisé en GClear17d3. Le GClear17d3 seul est insuffisant pour clarifier l'échantillon non perméabilisé au préalable. Après perméabilisation, la coloration DIL est perdue malgré le silicone. Les animaux utilisés pour ces essais sont uniquement des animaux de récupération, issus d'autres projets du laboratoire. Il n'y a pas d'animaux disponibles en permanence donc des études sur fantômes sont nécessaires pour évaluer l'utilité des injections de silicone.

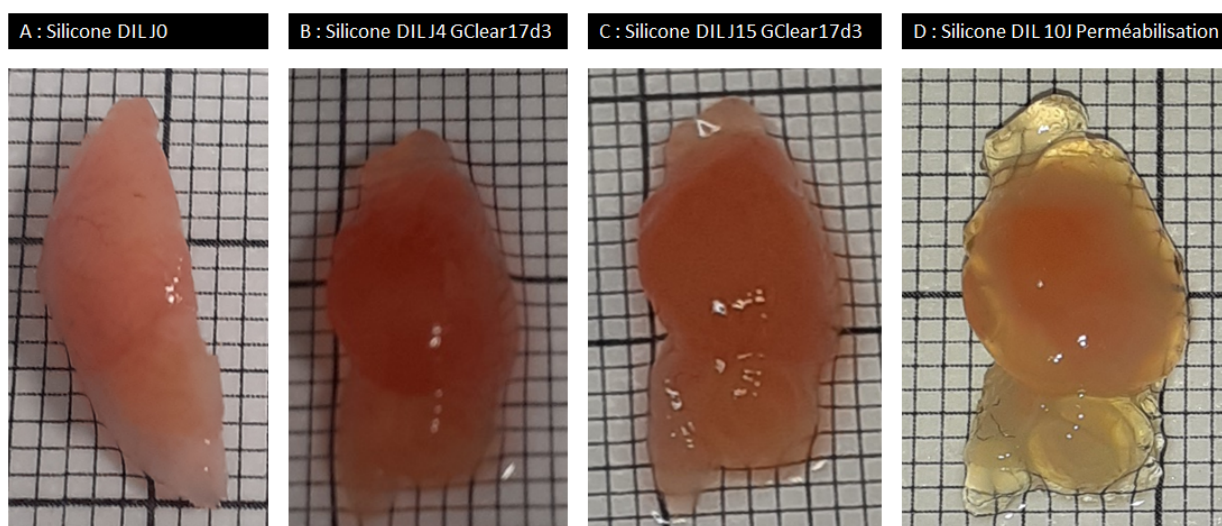


FIG. 5.20 – Test de transparisation en GClear17d3 d'un hémisphère de souris injectée avec du colorant DIL dilué en silicone à J0 (A), J4 (B), J15 (C) ou après 10 jours de perméabilisation P8 (D)

Ainsi, des essais sont en cours de réalisation avec des fantômes constitués de cubes de silicone ou de Phytigel™ 1% laissés en incubation sous agitation avec des solutions de trans- parisation et de perméabilisation. J'ai constaté qu'une augmentation du ratio DIL en éthanol/silicone était possible sans contrarier la polymérisation, jusqu'à la dilution au 1/10.

La Figure 5.21 montre les différents colorants testés en silicone, certains ne permettant pas une polymérisation normale du silicone. Le DIL, le DIO, l'ANSA (colorant fluorescent bleu) et le rouge d'aniline (peu fluorescent) forment un gel solide après 15 minutes à 85°C. La rhodamine ne se solubilise pas, l'érythrosine B et la thioflavine restent liquides même après 24 heures. Le Phytigel™ gélifie quel que soit le colorant utilisé (résultat non montré).

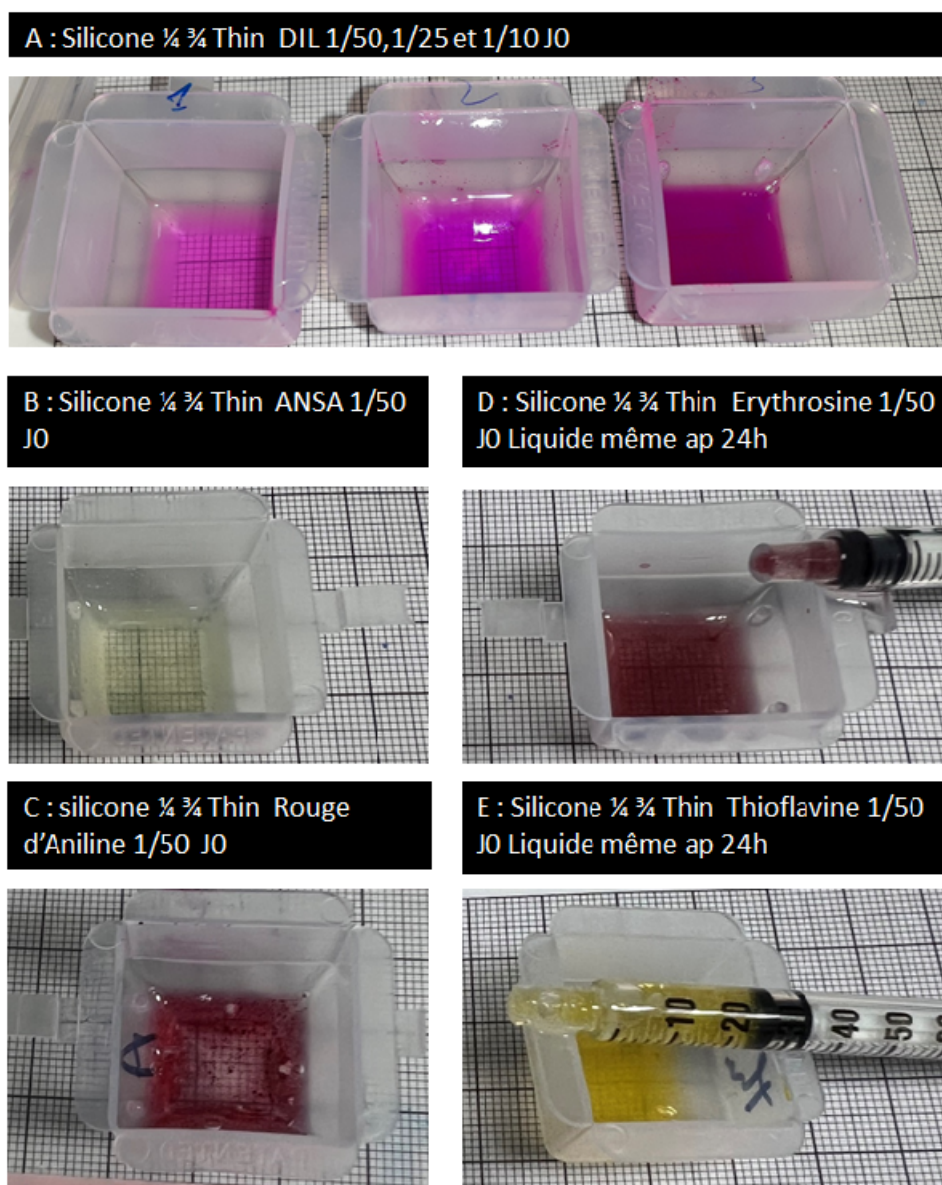


FIG. 5.21 – Différentes préparations de fantômes de silicone fluorescent à J0

La Figure 5.22 montre l'évolution au cours du temps des gels de silicone dans les solutions de transparisation avec et sans détergents. La dilution de 1/50 de la solution mère est déjà en partie éliminée du bloc de silicone après sept jours, alors que les dilutions plus concentrées tiennent plus longtemps (J14 et plus). Les solutions contenant des détergents sont à pH plus acide (pH=5,8 à 6) que ma solution GClear17d3 (pH=8) ce qui modifie la couleur du gel.

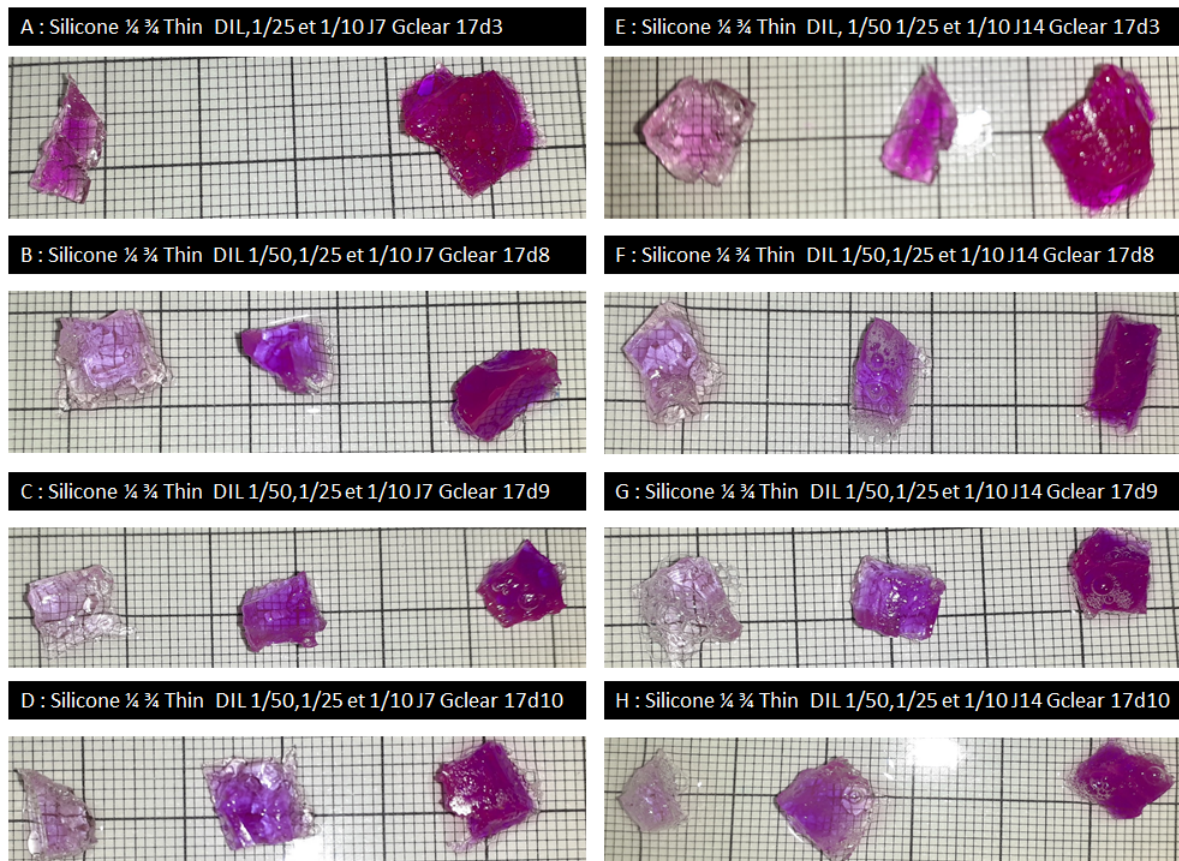


FIG. 5.22 – Différentes préparations de fantômes de silicone fluorescent dans différentes solutions de transparisation à J7 (A, GClear17d3; B, GClear17d8; C, GClear17d9 et D, GClear17d10), à J14 (E, GClear17d3; F, GClear17d8; G, GClear17d9 et H, GClear17d10)

La Figure 5.23 reprend l'évolution dans le temps des cubes de Phytigel™ dans les différentes solutions testées. La perte de coloration est plus rapide qu'en silicone mais le Phytigel™ reste solide dans les solutions de transparisation. Le colorant Thioflavine semble résister le mieux au stade J9. Á minima, le Phytigel™ permettrait de remplir les vaisseaux de particules fluorescentes (latex ou polystyrène), sans perte. La mise en solution nécessite une température supérieure à 75°C qui peut être abaissée à 60°C une fois la solution prête. La prise du gel est très rapide, des tests de perfusion sur animaux seront donc nécessaires. Le Phytigel™ est soluble dans l'éthanol à 10%, permettant d'utiliser la solution de DIL la plus concentrée si nécessaire.

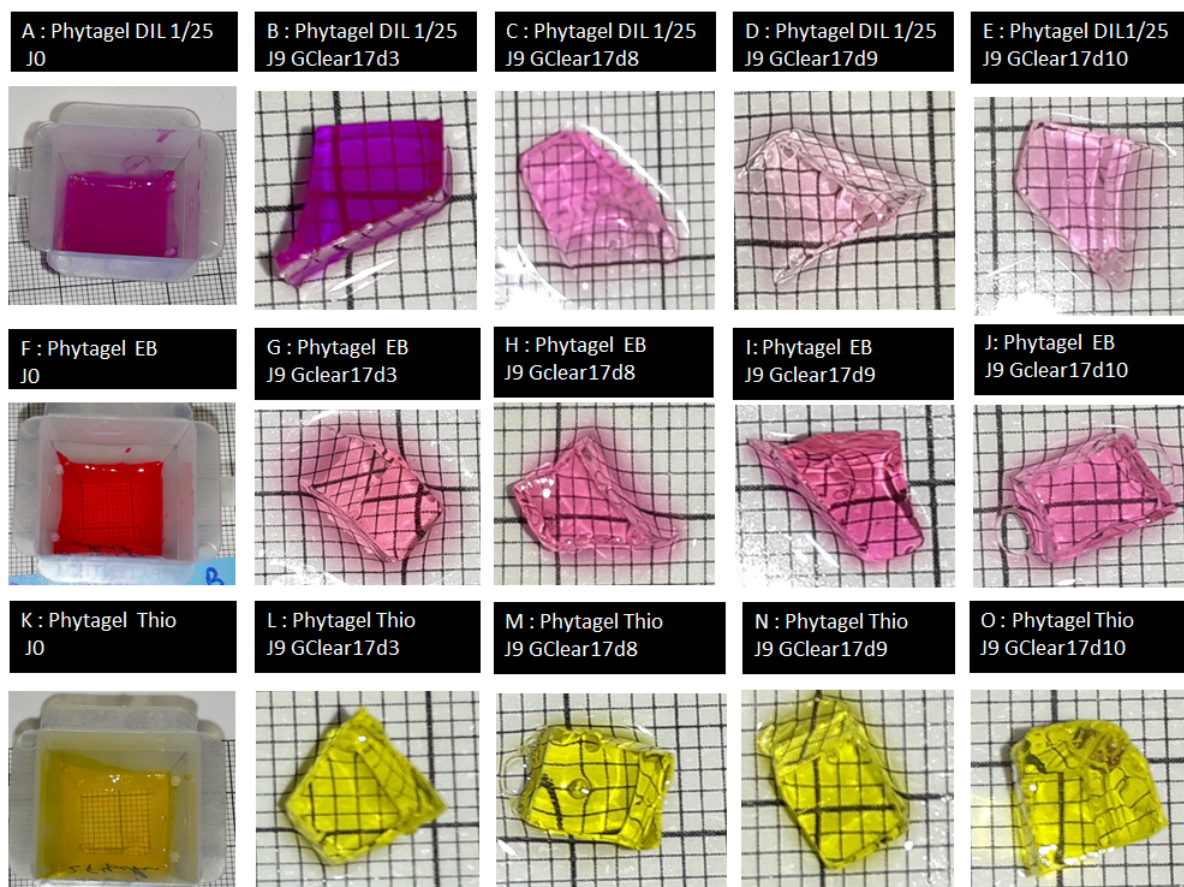


FIG. 5.23 – Fantômes de Phytigel™ colorés avec du colorant DIL (A, B, C, D, E), de l'érythrosine B (F, G, H, I, J) ou de la Thioflavine (K, L, M, N, O) à J0 (A, F, K) et à J9 en solutions de transpiration GClear17d3 (B, G,L), GClear17d8 (C, H, M), GClear17d9 (D,I,N) ou GClear17d10 (E, J,O)

Comme attendu, les colorants sont éliminés des blocs de gel au fur et à mesure, entraînant une augmentation du bruit dans les tissus environnants si le gel est perfusé, mais j'espère que le ratio signal/bruit restera cependant suffisant.

Le Phytigel™ peut aussi servir à enrober des coupes de tissu plus fines (50-200 μm) pour pouvoir les manipuler plus facilement pendant les immunomarquages et les procédures de transpiration, à condition de les garder en solutions. Cela permettra de tester les anticorps avant de passer sur des échantillons plus épais.

Les conclusions de cette partie sont donc :

- Différents colorants peuvent être utilisés pour révéler l'arbre vasculaire mais les procédés de transparençation ne permettent pas de conserver un signal fluorescent suffisant pour réaliser des acquisitions en microscopie en profondeur.
- Il est possible de remplir des vaisseaux sanguins avec différents gels (gélatine, carraghénanes, Poloxamer 407, silicone ...) rendus fluorescents par différentes molécules, mais certains de résistent pas aux détergeants utilisés lors de la transparençation.
- Des billes de latex ou de polyester fluorescentes peuvent être utilisés pour révéler l'arbre vasculaire, si elles sont dans un gel résistant aux processus de transparençation.
- Le Phytigel[™] et le silicone Solaris sont deux gels étudiés sur fantômes avant de réaliser des tests sur les animaux.
- Le Phytigel[™] peut être utilisé pour enrober des échantillons plus fins (organoïdes, coupes fines) afin de les manipuler plus facilement lors des procédures de transparençation.

5.6 Conclusion et perspectives

Je trouve fascinantes ces méthodes de transparençation, les images de rendu 3D étant extraordinaires et très informatives. Les méthodes testées sont encore très loin d'être utilisables pour toutes les études qui nous intéressent. Les difficultés d'immunomarquages, les pertes de fluorescence, les variations de volume des organes, les difficultés d'imagerie, l'accès à un microscope à feuillet de lumière, la gestion des fichiers de données générées, sont autant de facteurs limitants. Même si la profondeur atteinte n'est pas celle d'un cerveau de souris dans son entier, une coupe de 500 μm peut être utilisée pour les immunomarquages. Cela sera très utile lors de nos projets centrés sur les tumeurs cérébrales pour visualiser par exemple la biodiversité des nanoparticules testées dans et autour des tumeurs, en profondeur, qui plus est si la tumeur est issue de cellules fluorescentes, comme celles développées pour la formation des sphéroïdes. D'autres méthodes de transparençation voient le jour régulièrement, comme AdipoClear [Chi *et al.*, 2018], Fast 3D Clear [Kosmidis *et al.*, 2021], FDISCO [Qi *et al.*, 2019], OPTIClear [Lai *et al.*, 2018], PEGASOS [Jing *et al.*, 2018] ... J'ai hâte de pouvoir tester ces méthodes et de les comparer à mes résultats, ou d'associer l'une ou l'autre méthode comme cela commence à se faire [Richardson *et al.*, 2021].

Chapitre 6

Conclusion

Ce travail de rédaction m'a permis de réaliser l'étendue des différentes recherches menées au laboratoire, dans le cadre des différents projets dans lesquels je me suis impliquée, mais également hors cadre, par la réalisation de développements méthodologiques pour nos futurs projets. Comme souvent, une question en recherche conduit à vouloir résoudre d'autres questions au fur et à mesure que les données sont générées. Pour pouvoir répondre à toutes ces interrogations, il est souvent nécessaire de développer ses connaissances par la lecture des publications existantes, par la recherche de technologies susceptibles d'être utiles, par la mise au point d'outils méthodologiques. J'adore cette partie de mon métier et je suis reconnaissante à mes collègues chercheurs de me donner toujours plus de défis à relever. Une méthode développée pour un projet en particulier peut toujours être une source d'idées pour un autre projet. Tous les outils mis en place peuvent être ré-utilisés dans les projets futurs. C'est très gratifiant de réaliser ces outils méthodologiques.

Les développements de la culture cellulaire en 3D et de l'histologie en 3D sont très en vogue ces dernières années et le seront de plus en plus à l'avenir. Je suis sûre que nos travaux nous permettront de résoudre de nombreuses questions scientifiques.

Les magnétosomes sont un formidable outil pour la recherche de nouvelles solutions thérapeutiques contre le cancer, je suis particulièrement intéressée par leur développement et par notre collaboration avec le BIAM. Je suis persuadée que notre travail permettra à l'avenir d'aider les patients à surmonter ces pathologies.





Obtenir un doctorat m'ouvrira, je l'espère, de nouvelles possibilités en termes de financements ou et de ressources humaines, afin de pouvoir continuer à développer des outils pour l'avenir.

Annexes *in vitro*

- A.1 Mefisto : Posters WMIC
- A.2 Mefisto : Fonctionnalisation des Magnétosomes
- A.3 Culture Cellulaire 2D
 - A.3.1 Mefisto : U87MG
 - A.3.2 Orano : SKBR3
 - A.3.3 Orano : MDA-MB-231
 - A.3.4 Orano : A431
 - A.3.5 Orano : MCF7
 - A.3.6 Orano : MCF12A
 - A.3.7 3D : hCMEC/D3
- A.4 Mise en contact des magnétosomes avec les cellules
- A.5 Mefisto : Tests des agents de dispersion
- A.6 Mefisto : Anticorps anti-AMB1
 - A.6.1 Production de l'anticorps anti-AMB1 chez le lapin
 - A.6.2 Protocoles d'immunomarquages sur cellules
- A.7 Mefisto : Résultats *in vitro*
- A.8 Mefisto : Cytointer
- A.9 Mefisto : Coloration Perl's sur cellules
- A.10 Projet 3D : protocoles de transfection
- A.11 Projet 3D : protocoles de sous-clonage

A.1 Mefisto : Posters WMIC

Ces posters sont présentés au Paragraphe 1.4.1.

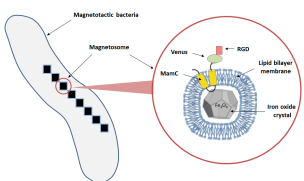
In vitro characterization of AMB1 magnetosomes as biogenic functionalized contrast agents dedicated to molecular MRI

F. Geffroy¹, M. Boucher¹, N. Ginét², S. Prévéral², L. Bellanger³, G. Adryanczyk-Perrier², M. Péan², C. T. Lefèvre², D. Garcia², D. Pignol², S. Mériaux¹

¹LUNIRS, CEA / DSV / I2BM / NeuroSpin, Gif-sur-Yvette, France
²LBC, CEA / DSV / IBEB / SBVME, Saint-Paul-lez-Durance, France
³LI2D, CEA / DSV / IBITEC-S / SPI, Bagnols-sur-Cèze, France

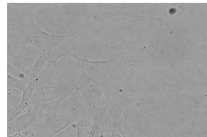
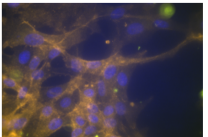
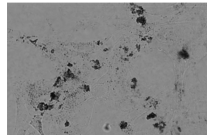
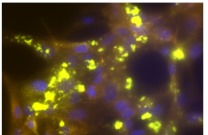
From magnetotactic bacteria to bio-nanoplatform

Genetic modification of magnetotactic bacteria [1] enable biological production of a bio-nanoplatform (magnetosome) suitable for molecular imaging with MRI, plus cross-validation with fluorescence microscopy. Magnetosomes extracted from bacteria consist in an iron oxide core (high MR contrasting properties), coated with a lipid bilayer membrane over-expressing the protein obtained by fusion of MamC (membrane protein), Venus (fluorescent protein) and RGD (functionalization peptide).



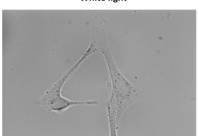
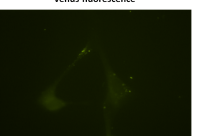
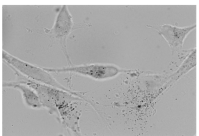
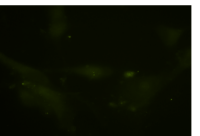
Specific experiment to test dispersion protocol of AMB1VRGD magnetosomes

Specific affinity of AMB1VRGD magnetosomes to U87 cells

	White light	Merge image
AMB1V		
AMB1VRGD		

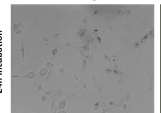
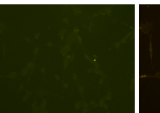
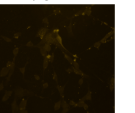
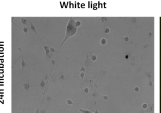
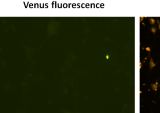
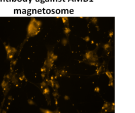
Scheme of AMB1VRGD magnetosome obtained after genetic modification of magnetotactic bacteria. Magnetosomes extracted from bacteria consist in an iron oxide core (MR contrasting properties) coated with lipid bilayer membrane over-expressing protein obtained by fusion of MamC (membrane protein), Venus (fluorophore) and RGD (functionalization).

Accumulation of AMB1VRGD magnetosomes within U87 cells

	White light	Venus fluorescence
3h30 incubation		
24h incubation		

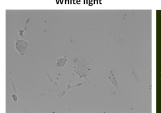
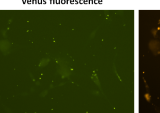
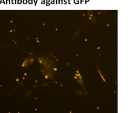
Microscopy images (x 63) of D3 U87 cells after 3h30 or 24h of incubation with media containing AMB1VRGD at low dose (250 µgFe/L). White light images show greater accumulation of AMB1VRGD within U87 cells after 24h of incubation, whereas no significant increase of Venus fluorescence signal is observed.

Detection of AMB1VRGD magnetosomes with specific antibody

	White light	Venus fluorescence	Antibody against GFP
24h incubation			
24h incubation			

Microscopy images (x 20) of D3 U87 cells after 24h of incubation with media containing AMB1VRGD at low dose (250 µgFe/L). Venus fluorescence signal and fluorescence signal obtained with antibody directed against GFP remain relatively weak, whereas strong fluorescence signal obtained with antibody directed against magnetosome membrane matches iron oxide core clusters detected on white light images. This result reveals that internalization process of AMB1VRGD within U87 cells modifies Venus functionalization of magnetosomes.


Specific experiment to test functionality of antibody directed against GFP

	White light	Venus fluorescence	Antibody against GFP
3h30 incubation			

Microscopy images (x 20) of D3 U87 cells after 3h30 of incubation with media containing AMB1VRGD at low dose (250 µgFe/L). Venus fluorescence signal and fluorescence signal obtained with antibody directed against GFP match iron oxide core clusters detected on white light image. This result shows that the immunostaining protocol with antibody directed against GFP (a protein very close to Venus) is sensitive enough to detect Venus functionalization present at magnetosomes membranes.

Acknowledgements

This work was part of the MEFISTO project, supported by the French public agency ANR (APP-P2N 2012).




Reference

[1] Ginét et al, PLoS One 2011

Contact:
francoise.geffroy@cea.fr
marianne.boucher@cea.fr
sebastien.meriaux@cea.fr

Sept.2-5, 2015
 WMIC 2015
 Honolulu, USA



LBAP 033

FIG. A.1 – Poster présenté en congrès (WMIC2015) par F. Geffroy

In vitro multimodal imaging characterization of RGD functionalized magnetosomes accumulation in U87 glioblastoma cells

F. Geffroy¹, M. Boucher¹, N. Ginet², S. Prévéral², F. Richard³, L. Bellanger⁴, G. Adrynczyk-Perrier², M. Péan², C. T. Lefèvre², D. Pignol², S. Mériaux¹

¹UNIRS, CEA / DRF / IZBM / NeuroSpin, Gif-sur-Yvette, France

²LBC, CEA / DRF / BIAM / SBVME, Saint-Paul-Lez-Durance, France

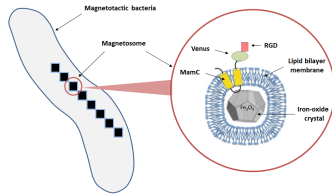
³Aix Marseille University, CNRS / IBDM, Marseille, France

⁴LIZD, CEA / DRF / IBITEC-S / SPI, Bagnols-sur-Cèze, France

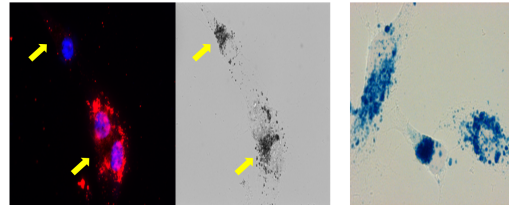
From bacteria to bio-nanoplatform for MR molecular imaging

Genetic modifications of magnetotactic bacteria [1] enable integrated production of a bio-nanoplatform (magnetosome) suitable for molecular imaging with MRI, plus cross-validation with fluorescence microscopy.

Magnetosomes extracted from bacteria consist of an iron-oxide core (high MR contrasting properties), coated with a bilipid membrane over-expressing the protein obtained by fusion of MamC (membrane protein), Venus (fluorescent protein) and RGD peptide (functionalization).

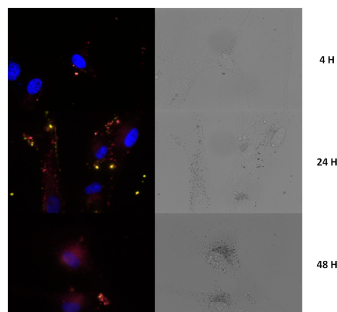


Detection of AMB1VRGD magnetosomes iron-oxide core



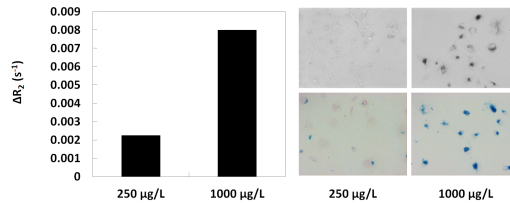
Microscopy images (x63) of U87 fixed cells after 48 h of incubation with media containing AMB1VRGD (dose of 1000 $\mu\text{g}/\text{L}$). When comparing with white light image (center), yellow arrows show the lack of magnetosome iron-oxide core detection by specific antibody directed against magnetosome membrane (left image, A647 in red), probably due to the membrane degradation during the incorporation process. Perls' staining image (right) confirms the large amount of iron incorporated inside U87 cells.

Kinetics of magnetosomes incorporation in U87 cells



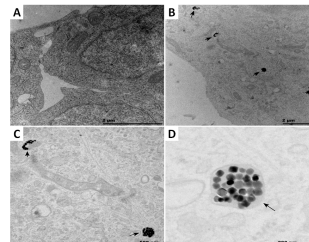
Microscopy images (x 63) of U87 fixed cells after 4, 24 or 48 h of incubation with media containing AMB1VRGD magnetosomes (dose of 250 $\mu\text{g}/\text{L}$). Merge images (left column) show nucleus (Dapi in blue), the Venus fluorophore linked with the magnetosomes (YFP in yellow) and the magnetosome membranes stained with a dedicated antibody (revealed by A647 in red). White light images (right column) show the iron-oxide core clusters. A647 and white light signals reveal the progressive AMB1VRGD accumulation in U87 cells along time, due to the specific binding of functionalized magnetosomes to $\alpha_v\beta_3$ integrins followed by internalization. YFP signal starts to decrease with incubation time after 24 h, presumably because the Venus protein is deteriorated through the incorporation process.

Quantification of iron uptake by U87 cells with *in vitro* MRI



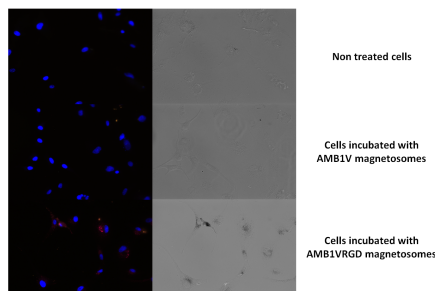
Iron uptake by U87 cells, incubated during 48 h with two different doses of AMB1VRGD magnetosomes (250 $\mu\text{g}/\text{L}$ and 1000 $\mu\text{g}/\text{L}$), is measured with quantitative *in vitro* MRI (ΔR_1 parameter, left). Higher dose of functionalized magnetosomes leads to higher incorporation of iron inside U87 cells. Microscopy images (x20, right), acquired in the same conditions, confirm, for both white light (upper row) and Perls' staining (bottom row) signals, the higher uptake of iron for the highest dose of AMB1VRGD.

TEM micrographs of U87 cells after 24 h incubation with magnetosomes



A/ TEM micrograph of U87 cells incubated 24 h with AMB1V (control) shows no magnetosomes internalization. B/ TEM micrograph of U87 cells incubated 24 h with AMB1VRGD reveals internalized magnetosomes (indicated with arrows). C,D/ Higher magnifications of the previous TEM micrograph (B) show cell vesicles containing magnetosomes (arrows).

72h incubation with magnetosomes versus non treated cells



Microscopy images (x 20) of U87 fixed cells after 72 h of incubation with media containing AMB1V or AMB1VRGD magnetosomes (dose of 250 $\mu\text{g}/\text{L}$), versus non treated U87 cells. Merge images (left column) show nucleus (Dapi in blue) and the magnetosome membranes stained with a dedicated antibody (revealed by A647 in red). White light images (right column) show the iron-oxide core clusters. **Non treated and AMB1V treated U87 cells exhibit the same behavior after 72 h: no specific magnetosomes internalization is detected. On the other hand, white light image reveals that U87 cells continue to incorporate AMB1VRGD magnetosomes after 72 h.**

Conclusion:

RGD functionalized magnetosomes can progressively accumulate in U87 cells during 48 h without signs of toxicity, according to the recycling mechanism of $\alpha_v\beta_3$ integrins [2]. Furthermore, *in vitro* MRI quantification of iron uptake confirms a dose effect at 48 h incubation time.

Acknowledgements

This work was part of the MEFISTO project, supported by the French public agency ANR (APP-P2N 2012).

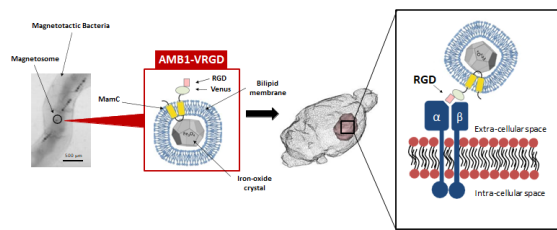
References

- [1] Ginet et al, *PLoS One*, 2011
[2] Hak S et al, *Angiogenesis*, 2014

francoise.geffroy@cea.fr

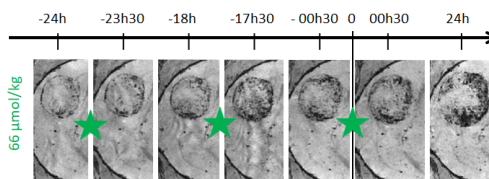
From bacteria to bio-nanoplatform for MR molecular imaging

Genetic modifications of magnetotactic bacteria [1] enable integrated production of a bio-nanoplatform suitable for molecular imaging with MRI, plus cross-validation with fluorescence microscopy. Magnetosomes extracted from bacteria consist of an iron-oxide core (high MR contrasting properties [2]), coated with a bilipid membrane over-expressing the protein obtained by fusion of MamC (membrane protein), Venus (fluorophore) and RGD peptide (functionalization).

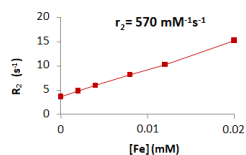


Toward smaller dose of AMB1 VRGD injected during tumor growth

FLASH images are acquired at 11.7 T for different time points before and after three injections of 66 $\mu\text{mol}/\text{kg}_{\text{BW}}$ of RGD magnetosomes (green stars) to brain tumor bearing mouse. These images show that the first injection of a third of the whole dose already leads to an increase in the number of hypo-intense voxels detected in the tumor. The second injection increases this effect as already observed with the double injection protocol. The third injection also induces the emergence of additional hypo-intense voxels in the tumor, but in smaller proportion than for the two previous ones. Finally, 24 h after the whole dose (200 $\mu\text{mol}/\text{kg}_{\text{BW}}$) injection, a vast extend of tumor area still appears dark, especially the tumor periphery.

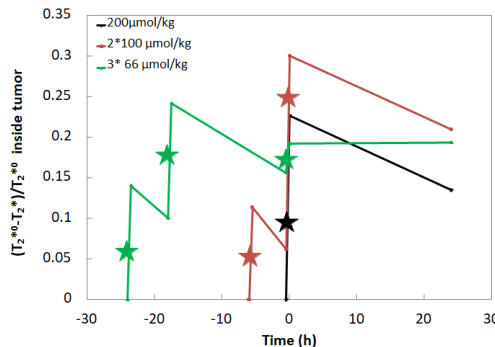


AMB1 VRGD magnetosomes exhibit high contrasting properties for MRI



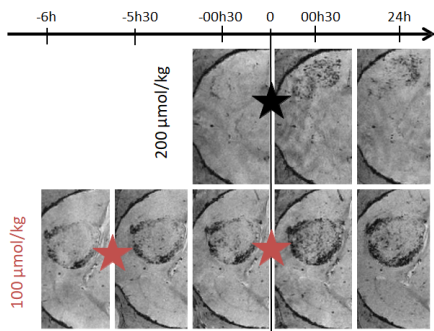
Relaxometry measurements using phantoms containing 7 tubes filled with different concentrations of AMB1 VRGD are performed at 11.7 T with a MSME sequence (TE = 8 ms, 64 echoes). Transverse relaxivity r_2 is estimated as the slope of the linear fit of $R_2 (= 1/T_2)$ versus iron concentration in each tube.

Estimation of tumor iron uptake reveals a higher uptake for the double injection protocol



Double injection of AMB1 VRGD to enhance MRI contrast in brain tumor compared to single injection

FLASH images are acquired at 11.7 T for different times points before and after one single injection of 200 $\mu\text{mol}/\text{kg}_{\text{BW}}$ of RGD magnetosomes (black star), versus two injections of 100 $\mu\text{mol}/\text{kg}_{\text{BW}}$ (red stars), to brain tumor bearing mouse. These images show that the first injected half dose already leads to numerous hypo-intense voxels detected in the tumor, meaning that this dose is still high enough to induce a detectable contrast enhancement. 30 min after the second half dose injection of magnetosomes, a greater number of hypo-intense voxels arises in the tumor when compared with one single injection. 24 h after the whole dose (200 $\mu\text{mol}/\text{kg}_{\text{BW}}$) injection, a greater contrast enhancement is observed in the tumor with the double injection of AMB1 VRGD.



$(T_2^{*0}-T_2^*)/T_2^{*0}$ computed from MGE images, is an indirect measure of magnetosomes concentration, which reveals that a higher uptake is reached in mouse brain tumor with double versus single injection, when the entire dose (200 $\mu\text{mol}/\text{kg}_{\text{BW}}$) is administered (red versus black curve). Multi-injection of smaller doses of RGD magnetosomes induces an enhancement of brain tumor targeting, probably because this maximizes the time during which functionalized magnetosomes can reach their target, the $\alpha_v\beta_3$ integrins over-expressed by neoangiogenic tumor vessels. However, a triple injection protocol, lasting 2 days, is also performed while the tumor is continuing to grow (green curve). The tumor volume growth, between the first and the last FLASH images, is estimated to 50% for this experiment, while it is around 23% for the single and double injection protocols. The contact time between the RGD magnetosomes and the targeted $\alpha_v\beta_3$ integrins is probably lengthened using this triple injection protocol, but the tumor growth may induce an increase of targets number: thus, the accumulation of magnetosomes is constantly diluted, leading to a constant contrast enhancement observed in the tumor. Multiple injections of RGD functionalized magnetosomes can increase tumor iron uptake compared to single one, and also enable to maintain a steady contrast enhancement in the tumor with time.

Conclusion:
 We produce RGD magnetosomes with specific affinity for U87 brain tumor, and we propose an optimized administration method to increase tumor iron uptake, which could be useful to perform magnetic hyperthermia treatment.

Acknowledgements



This work was part of the MEFISTO project, supported by the French public agency ANR (APP-P2N 2012).

References

- [1] Ginot et al, PLoS One 2011
- [2] Mériaux et al, Adv Health Mat 2015

sebastien.meriaux@cea.fr

LBAP193



FIG. A.3 – Poster présenté en congrès (WMIC2016) par M. Boucher

A.2 Mefisto : Fonctionnalisation des Magnétosomes

Ces Figures sont présentées au Paragraphe 2.1.5.

Primer	Sequence	Features
Opd-F	5'-CACCATGTCGATCGGCACAGGC-3'	Sequence for cloning in pET100 (underline)
Opd-R	5'-TCATGACCCCGCAAGTTCG-3'	Stop codon (bold)
MamC-F	5'-AGAATTCAGGACAACAGCGATGCCCTTTCACCTTGCCCCCTATCTGG-3'	EcoRI restriction site (underline), initiation codon (bold)
MamC-R	5'-TATACCCGGGGCCCTGGAAGTACAGTTCTCGGCCAGTTCGTCGCCCAAGATG-3'	XmaI restriction site (underline), TEV protease cleavage site (bold)
B-Opd-F	5'-AAAGGATCCTCGATCGGCACAGGC-3'	BamHI restriction site (underline)
S-Opd-R	5'-AGAGCTCTCATGACCCCGCAAGTTCGG-3'	SacI restriction site

doi:10.1371/journal.pone.0021442.t001

FIG. A.4 – Liste des Primers utilisés pour la fonctionnalisation (Crédit : Nicolas Ginet)

Deux plasmides ont été bioingénérés par biologie moléculaire, en utilisant les primers listés en Figure A.4 [Ginet *et al.*, 2011]. Chaque plasmide code pour une protéine fusionnant le gène codant pour la protéine MamC et la protéine Vénus ou VénusRGD.

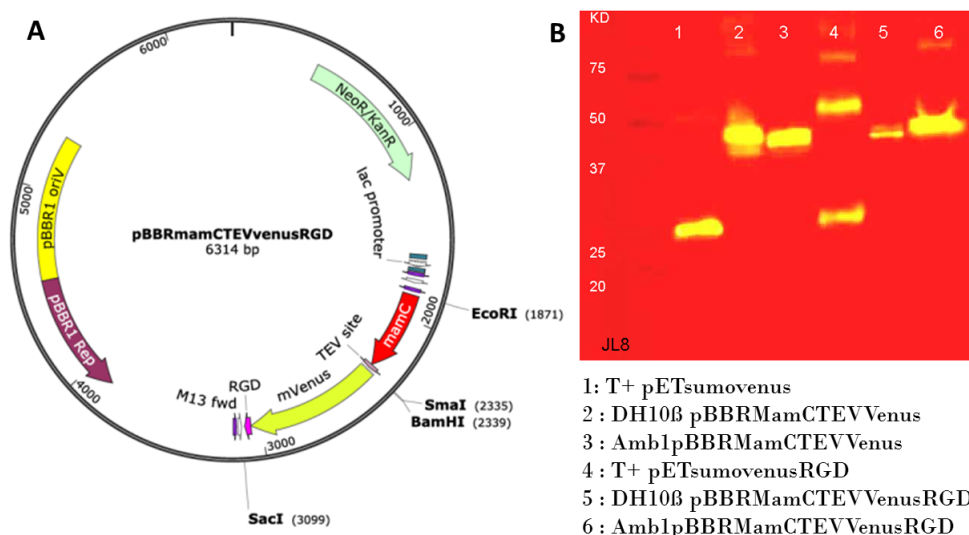


FIG. A.5 – A : Schéma du plasmide portant la modification MamC-VRGD. B : Western Blot montrant l'expression de la protéine Venus dans les bactéries modifiées (lignes 1 à 3 : V, lignes 4 à 6 : VRGD). Les Lignes 1 et 4 montrent la protéine d'intérêt V ou VRGD, les lignes 2 et 5 les protéines fusion MamC-V ou MamC-VRGD, les lignes 3 et 6 montrant le lysat cellulaire de chaque souche modifiée. (Crédit : Nicolas Ginet, Marianne Boucher)

Les plasmides ont été introduits dans la bactérie WT *Magnetospirillum magneticum* AMB1. Les bactéries ayant incorporé les plasmides sont déterminées par l'expression de la fluorescence Vénus, par Western Blot comme présenté en Figure A.5.

A.3 Culture Cellulaire 2D

Les références des réactifs utilisés pour la culture cellulaire sont présentées en Annexe [D.3](#), quel que soit le projet.

A.3.1 Mefisto : U87MG

Ce protocole est présenté au Paragraphe [2.2.1](#).

Les cellules U87-MG sont cultivées sous atmosphère à 5% de CO₂, en milieu DMEM low glucose contenant 10% de SVNN, 1% de L-Glutamine, 1% de Pénicilline/Streptomycine, 1% pyruvate et 35 μ l de gentamicine, filtré à 0,22 μ m. Les cellules sont entretenues par trypsination 3 fois par semaine. Brièvement, les cellules sont rincées au DPBS, puis mise en contact avec la trypsine diluée au 1/2, pendant 4 minutes à 37°C. La trypsine est inactivée avec du milieu complet et les cellules sont centrifugées 5 minutes à 1500 tours/min. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est repris par du DPBS pour effectuer un comptage en cellule de Thoma. Pour l'entretien de routine, les cellules sontensemencées en flacons de culture traités TC[™] à 1x10⁵ cellules/mL du lundi au mercredi et du mercredi au vendredi, et à 3x10⁴ cellules/mL du vendredi au lundi. Les cellules prélevées pour implantation chez l'animal sont centrifugées, concentrées à 60 millions/mL en PBS et gardées sur glace jusqu'à la fin du protocole d'implantation (maximum 3heures).

A.3.2 Orano : SKBR3

Ce protocole est présenté au Paragraphe [3.2](#).

Les cellules SKBR3 sont cultivées sous atmosphère à 5% de CO₂, en milieu MacCoy's contenant 10% de SVF, 1% de L-Glutamine, 1% de Pénicilline/Streptomycine, 1% pyruvate et filtré à 0,22 μ m. Les cellules sont entretenues par trypsination 2 à 3 fois par semaine. Brièvement, les cellules sont rincées au DPBS, puis mises en contact avec la trypsine diluée au 1/2, pendant 10 minutes à 37°C. La trypsine est inactivée avec du milieu complet et les cellules sont centrifugées 5 minutes à 1500 tours/min. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est repris par du DPBS pour effectuer un comptage en cellule de Thoma.

A.3.3 Orano : MDA-MB-231

Ce protocole est présenté au Paragraphe [3.2](#).

Les cellules MDA-MB-231 sont cultivées sous atmosphère à 5% de CO₂, en milieu DMEM high glucose contenant 10% de SVF, 1% de L-Glutamine, 1% de Pénicilline/Streptomycine, 1% pyruvate, filtré à 0,22 μ m. Les cellules sont entretenues par trypsination 2-3 fois par semaine. Brièvement, les cellules sont rincées au DPBS, puis mises en contact avec la trypsine diluée au 1/2, pendant 6 minutes à 37°C. La trypsine est inactivée avec du milieu complet et les cellules sont centrifugées 5 minutes à 1500 tours/min. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est repris par du DPBS pour effectuer un comptage en cellule de Thoma.

A.3.4 Orano : A431

Ce protocole est présenté au Paragraphe 3.2.

Les cellules A431 sont cultivées sous atmosphère à 5% de CO₂, en milieu DMEM high glucose contenant 10% de SVF, 1% de L-Glutamine, 1% de Pénicilline/Streptomycine, 1% pyruvate, filtré à 0,22 μm . Les cellules sont entretenues par trypsination 2-3 fois par semaine. Brièvement, les cellules sont rincées au DPBS, puis mises en contact avec la trypsine non diluée, pendant 15 minutes à 37°C. La trypsine est inactivée avec du milieu complet et les cellules sont centrifugées 5 minutes à 1500 tours/min. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est repris par du DPBS pour effectuer un comptage en cellule de Thoma.

A.3.5 Orano : MCF7

Ce protocole est présenté au Paragraphe 3.2.

Les cellules MCF7 sont cultivées sous atmosphère à 5% de CO₂, en milieu EMEM high glucose contenant 10% de SVF, 1% de L-Glutamine, 1% de Pénicilline/Streptomycine, 1% NEAA, filtré à 0,22 μm . Les cellules sont entretenues par trypsination 2-3 fois par semaine. Brièvement, les cellules sont rincées au DPBS, puis mises en contact avec la trypsine diluée au 1/2, pendant 3 minutes à 37°C. La trypsine est inactivée avec du milieu complet et les cellules sont centrifugées 5 minutes à 1500 tours/min. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est repris par du DPBS pour effectuer un comptage en cellule de Thoma.

A.3.6 Orano : MCF12A

Ce protocole est présenté au Paragraphe 3.2.

Les cellules MCF12A sont cultivées sous atmosphère à 5% de CO₂, en milieu DMEM high glucose 1/2, milieu Ham's F12 1/2, contenant 5% de SH, 1% L-Glutamine, 20 ng/mL EGF humain, 100 ng/mL Toxine de cholera, 0,01 mg/mL Insuline bovine, 500 ng/mL Hydrocortisone, filtré à 0,22 μm . Les cellules sont entretenues par trypsination 2-3 fois par semaine. Brièvement, les cellules sont rincées au DPBS, puis mises en contact avec la trypsine non diluée, pendant 5 minutes à 37°C. La trypsine est inactivée avec du milieu complet et les cellules sont centrifugées 5 minutes à 1500 tours/min. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est repris par du DPBS pour effectuer un comptage en cellule de Thoma.

A.3.7 3D : hCMEC/D3

Ce protocole est présenté au Paragraphe 4.3.1.

Les cellules hCMEC/D3 sont cultivées sous atmosphère à 5% de CO₂, en milieu EGM2 composé de milieu EBM2 et du kit de facteur de croissance fourni par LONZA, filtré à 0,22 μm . Les cellules poussent sur une couche de collagène de type I, il est indispensable de préparer à l'avance les contenants de culture, en laissant incuber à 37°C une solution de collagène de queue de rat (dilution 1/20 en DPBS, 1h). Après une heure, la solution est enlevée et les cellules peuvent êtreensemencées. Les cellules sont entretenues par trypsination 2-3 fois par semaine. Brièvement, les cellules sont rincées au DPBS, puis mises en contact avec la trypsine non diluée, pendant 6 minutes à 37°C. La trypsine est inactivée avec le réactif TNS (Trypsin Neutralizing Solution) et les cellules sont centrifugées 5 minutes à 1500

tours/min. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est repris par du DPBS pour effectuer un comptage en cellule de Thoma.

A.4 Mise en contact des magnétosomes avec les cellules

Les cellules sont mises en contact avec les magnétosomes pour le Projet Mefisto et pour le Projet Orano en condition 2D ou 3D. Les essais de mise en contact avec les magnétosomes ont eu lieu en utilisant des supports de type LabTekII et MilliEZ, de 8 puits par lame, ou des boîtes à fond de verre.

Les cellules sont cultivées 2-3 jours sur ce support avant la mise en contact. Puis les cellules sont lavées en DPBS avant d'ajouter le milieu contenant les magnétosomes (milieu normal ou de dispersion, selon les essais). Les cellules sont laissées en incubation durant le temps souhaité, avant d'être rincées deux fois au DPBS puis fixées au PFA 4% (15 minutes), et de nouveau rincées deux fois en DPBS, afin de les utiliser pour les observations en microscopie.

Toutes les observations en microscopie ont été réalisées avec un microscope Axio Observer Z1 équipé du logiciel Zen Blue Edition (Zeiss).

A.5 Mefisto : Tests des agents de dispersion

Ces résultats sont présentés au Paragraphe 2.2.2. Les références des réactifs chimiques utilisés sont présentées en Annexe D.1, quel que soit le projet.

Les agents de dispersion ont été mis en contact avec les cellules U87-MG en milieu sans sérum sur une durée de 48 heures.

Le tableau présenté à la Figure A.6 montre l'effet nocif en fonction de la concentration de certains des agents testés : une concentration maximale utilisable a donc été déterminée pour chacun des agents de dispersion.

Test agents de dispersion : observation des cultures après contact				
agents	concentration	Observations		
		3h30	24h	48h
Glycérol	1%	id Témoin	id Témoin	id Témoin
	2%	qq arrondies	id témoin	id témoin
	5%	ttes arrondies	ttes arrondies	détachées
	10%	ttes rondes	détachées	détachées
Citrate trisodique	10mM	id témoin	bq rondes	détachées
	25mM	rondes et détachées		
	50mM	Détachées		
	100mM	Détachées		
Ovalbumine	1%	croissance	id Témoin	arrondies
	5%	plus	rondes	
	10%	rapide	rondes	
Lysolécithine	0,05%	arrondies		
	0,10%	mortes		
	0,50%	mortes		

agents	concentration	Observations		
		3h30	24h	48h
glycérol	0,0001%	id Témoin	id Témoin	id Témoin
	0,0005%			
	0,001%			
	0,005%			
	0,01%			
	0,05%			
	0,1%			
	0,5%			
	1%			
	2%			
qq arrondies				
Citrate trisodique	0,0005mM	id témoin	id témoin	id témoin
	0,001mM			
	0,005mM			
	0,01mM			
	0,05mM			
	0,1mM			
	0,5mM			
	1mM			
	5mM			
	10mM			
arrondies	rondes	rondes		
arrondies	détachées	détachées		

agents	concentration	Observations		
		3h30	24h	48h
Ovalbumine	0,0005%	id Témoin	id témoin	id témoin
	0,001%			
	0,005%			
	0,01%			
	0,05%			
	0,1%			
	0,5%			
	1%			
arrondies	arrondies	arrondies	arrondies	
arrondies	arrondies	arrondies	arrondies	
arrondies	arrondies	arrondies	arrondies	
KCl	0,1mM	id témoin	id témoin	id témoin
	0,5mM			
	1mM			
	5mM			
	10mM			
qq détachées	qq détachées	qq détachées	qq détachées	
aspect granuleu	détachées	détachées	détachées	
Lysolécithine	0,001%	id Témoin	id Témoin	id Témoin
	0,005%			
	0,01%			
	0,05%			
	0,10%			
	0,50%			
	arrondies	mortes	mortes	mortes
mortes	mortes	mortes	mortes	
mortes	mortes	mortes	mortes	

FIG. A.6 – Effets des agents de dispersion sur les cellules U87-MG, après 48h d'incubation

La Figure A.7 illustre l'effet des agents de dispersion sélectionnés sur la réduction ou non de la taille et du nombre d'agrégats de magnétosomes V et VRGD mis en contact à la concentration de 2 mg_{Fer}/L durant 3 heures 30. Les agents sélectionnés sont la lysolécithine, le glycérol, le citrate et la caséine.

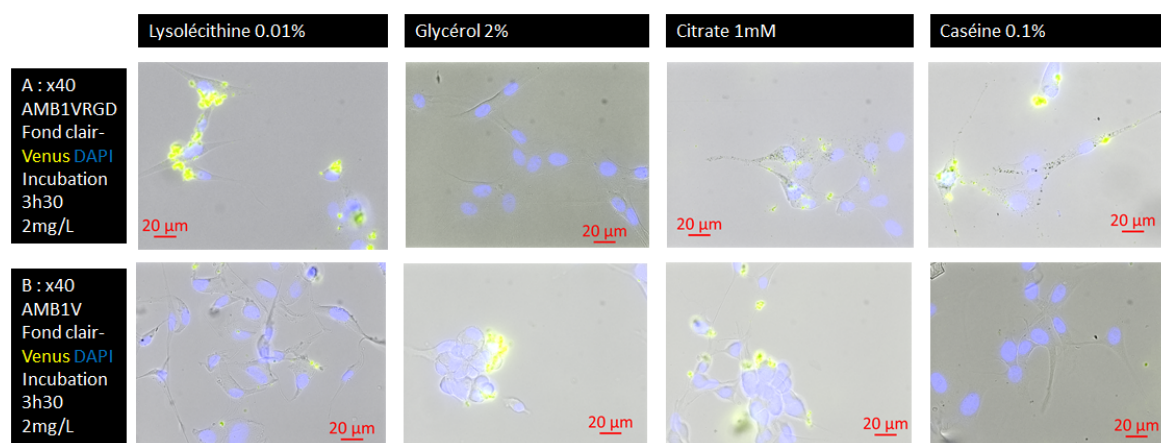


FIG. A.7 – Effets des agents de dispersion sélectionnés sur les cellules U87-MG incubées 3h30 avec les magnétosomes AMB1VRGD (A) et AMB1V (B) à 2mg F_{er} /L, grossissement x40

A.6 Mefisto : Anticorps anti-AMB1

L'anticorps anti-AMB1 est présenté au Paragraphe 2.2.3.

A.6.1 Production de l'anticorps anti-AMB1 chez le lapin

L'anticorps anti-AMB1 a été produit au CEA Marcoule par l'équipe de Laurent Bellanger, selon le protocole suivant : une suspension de magnétosomes AMB-1 (450 mg, 215 mL) a été mélangée à un volume égal d'adjuvant de Freund (Sigma Aldrich), puis injectée par voie sous-cutanée à deux lapins Néo-Zélandais (Charles River) de 3 mois. Les injections ont été réalisées aux temps 28, 58 et 91 jours. 14 jours après chaque injection, des prélèvements sanguins ont été effectués et les anticorps ciblant les magnétosomes ont été recherchés et mesurés avec un test Elisa.

A.6.2 Protocoles d'immunomarquages sur cellules

Toutes les références des anticorps sont rassemblées dans un tableau, présenté en Annexe D.4. Les protocoles d'immunomarquages sur cellules, quelque soit le projet, sont présentés dans un tableau récapitulatif (Figure A.8).

Chaque incubation est précédée d'une étape de rinçage en PBS (2 x 5min), le tampon de blocage contenant 5% de sérum d'âne et 1% de sérum albumine bovine, avec ou non un détergent pour perméabiliser la membrane.

Les anticorps sont dilués en tampon contenant du sérum d'âne 5%. Les noyaux sont révélés soit par l'ajout de Hoechst (1/2000) avec l'anticorps secondaire, ou bien par un montage en milieu de montage contenant du DAPI.

Les protocoles "in&out" ont été présentés au Paragraphe 2.2.5 pour le projet Mefisto et au Paragraphe 3.3.1 pour le projet Orano.

Immunomarquages sur cellules								
Tampon de blocage et/ou perméabilisation	Durée Incubation	Anticorps primaire	Durée Incubation	Anticorps secondaire	Durée Incubation	Anticorps secondaire bis	Durée Incubation	Utilisé pour
Triton 0.2%	30 min	α v β 3 1/100	1h	-	-	-	-	Mefisto
Triton 0.2%	30 min	GFP 1/100	1h	Ac anti-rabbit Dylight594 1/250	1h	-	-	Mefisto
Triton 0.2%	30 min	AMB1 1/5000	1h	Ac anti-rabbit Dylight594 1/250	1h	-	-	Mefisto
Tampon de blocage	30 min	HER2 1/100	1h	Ac anti-rabbit Alexa594 1/250	1h	-	-	Orano
Tampon de blocage	30 min	HER2 1/100	1h	Ac anti-rabbit Alexa647 1/250	1h	-	-	Orano
Tampon de blocage	30 min	MAB95471 1/250	1h	Ac anti-rabbit Alexa488 1/250	1h	-	-	Orano
Tampon de blocage	30 min	MAB9547 1/100	1h	Ac anti-ms Alexa594 1/250	1h	-	-	Orano
Tampon de blocage	30 min	MAB9589 1/100	1h	IgG goat anti- humain 1/100	1h	Ac anti-Goat 594 1/250	1h	Orano
Triton 1%	2h	SV40T 1/100	1h	Ac anti-ms Alexa594 1/250	1h	-	-	3D
Triton 1%	2h	SV40T 1/101	1h	Ac anti-ms Alexa647 1/250	1h	-	-	3D
Triton 1%	2h	Occludin 1/50	1h	Ac anti-rabbit Alexa488 1/250	1h	-	-	3D
Triton 1%	2h	MAP2 1/500	1h	Ac anti-chick Cy3 1/250	1h	-	-	3D
Triton 1%	2h	Vimentine 1/500	1h	Ac anti-rabbit Alexa488 1/250	1h	-	-	3D
Triton 1%	2h	VCAM-1 1/100	1h	Ac anti-rabbit Alexa488 1/250	1h	-	-	3D

FIG. A.8 – Protocoles d'immunomarquages sur cellules

Un tableau récapitulatif de la procédure est présenté à la Figure A.9, chaque incubation d'anticorps est suivie de 2 rinçages en tampon phosphate, et 3 rinçages à l'étape finale.

in & out sur cellules								
Anticorps primaire	Durée Incubation	Anticorps secondaire	Tampon de perméabilisation	Durée Incubation	Anticorps primaire	Durée Incubation	Anticorps secondaire	Projet
rab anti-AMB1 1/5000	1h	anti-rab Alexa 647 1/250	Triton 0.2%	30 min	rab anti-AMB1 1/5000	1h	anti-rab Alexa 488 1/250 + Hoest 1/2000	Mefisto, Orano, Culture 3D
rab anti-AMB1 1/5000	1h	anti-rab Alexa 647 1/250	Triton 0.2%	30 min	rab anti-AMB1 1/5000	1h	anti-rab Alexa 488 1/250 + Hoest 1/2000 + $\alpha v\beta 3$ 1/100	Mefisto, Culture 3D
MAB95471 1/100	1h	anti-rab Alexa 647 1/250	Triton 0.2%	30 min	MAB95471 1/100	1h	anti-rab Alexa 488 1/250 + Hoest 1/2000	Orano, Culture 3D

FIG. A.9 – Protocole d'immunomarquage in&out sur cellules

A.7 Mefisto : Résultats *in vitro*

La gamme de concentrations 1 à 10 $\text{mg}_{\text{Fer}}/\text{L}$ a été présentée au Paragraphe 2.2.1. La Figure A.10 montre la différence d'incorporation des magnétosomes V et VRGD dans les cellules U87MG après 3 heures 30 d'incubation à la dose de 10 $\text{mg}_{\text{Fer}}/\text{L}$.

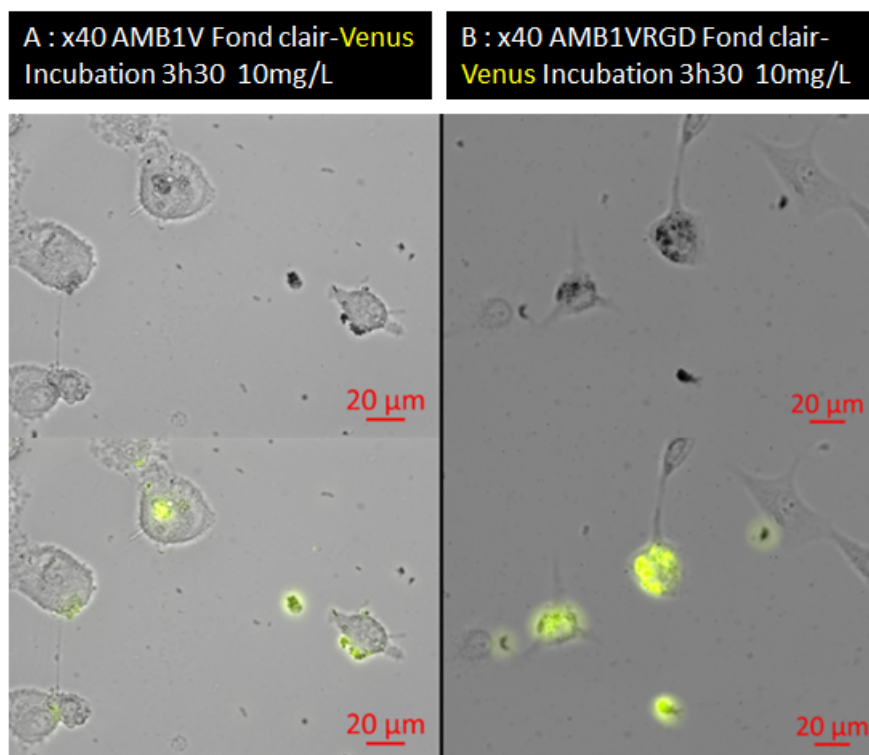


FIG. A.10 – Différence d'incorporation des magnétosomes V (A) et VRGD (B) apportés à forte concentration (10 $\text{mg}_{\text{Fer}}/\text{L}$), sur les cellules U87MG, temps d'incubation 3H30, grossissement x40

La cinétique d'incorporation des magnétosomes VRGD à 24, 48 et 72 heures a été présentée au Paragraphe 2.2.5.

La Figure A.11 montre la différence d'incorporation des magnétosomes V et VRGD dans les cellules U87MG au cours du temps à la dose de $250 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$.

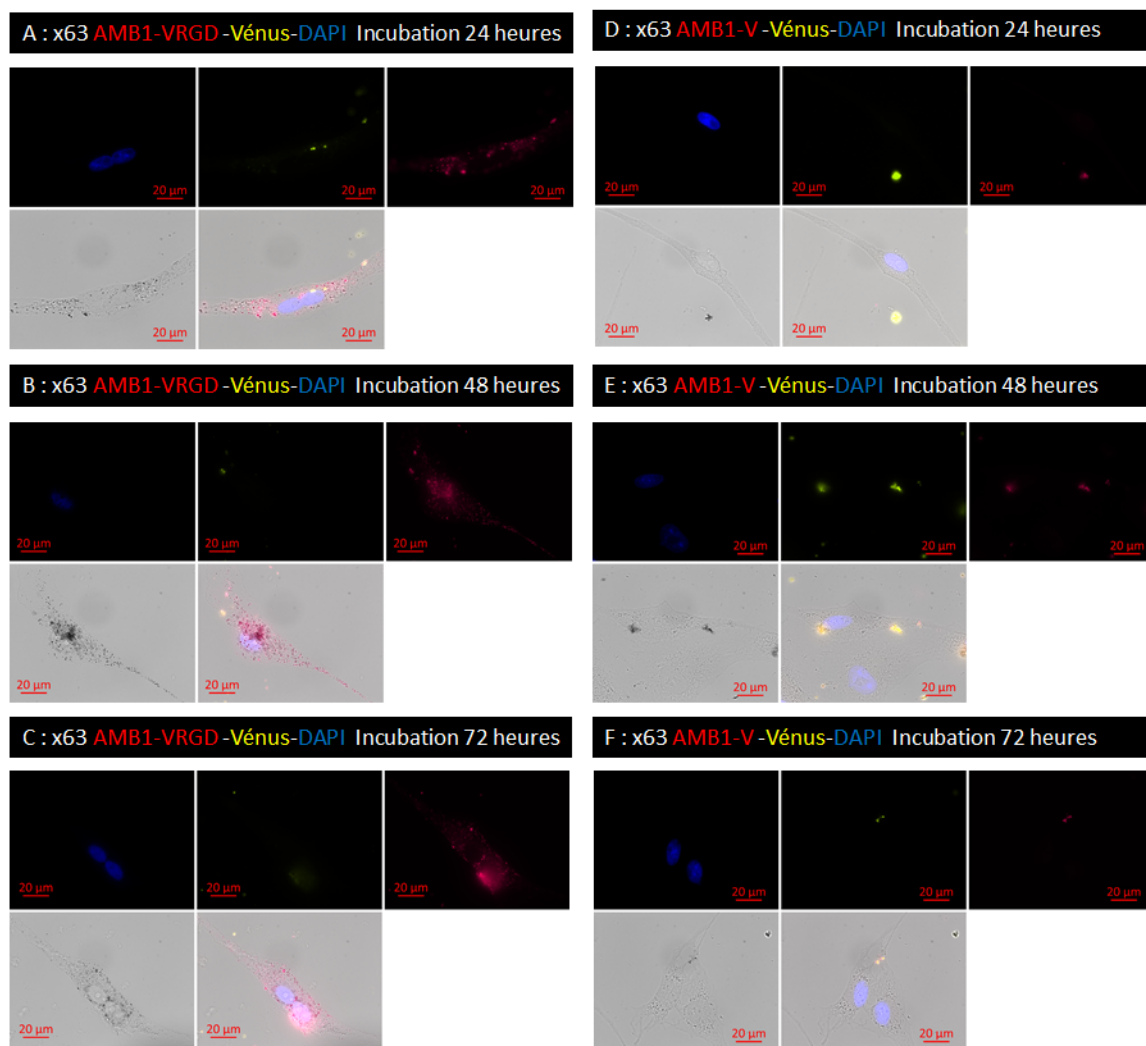


FIG. A.11 – Cinétique d'incorporation des magnétosomes V et VRGD à la concentration de $250 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$, sur les cellules U87MG, grossissement x63

A.8 Mefisto : Cytopainter

Le protocole suivi pour déterminer le devenir des magnétosomes dans le cytoplasme cellulaire est le suivant : les cellules sont incubées 24 heures avec les magnétosomes AMB1-VRGD, à la concentration de $250 \mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$, en milieu de dispersion. 2 heures avant la fin de l'essai, le colorant Cytopainter est ajouté à la concentration de 1/50 000, pour une heure. Puis l'anticorps anti-AMB1 est ajouté à la concentration de 1/5000, puis rincé après 30 minutes. Un anticorps secondaire anti-lapin A647 est ajouté dans le milieu pour également 30 minutes. Les cellules sont alors rincées au DPBS puis fixées au PFA 4%, avant d'être de nouveau rincées au DPBS deux fois.

A.9 Mefisto : Coloration Perl's sur cellules

La coloration Perl's est présentée au Paragraphe 2.2.4. Nous avons utilisé le kit de marquage HT20 de Sigma Aldrich pour la coloration et modifié légèrement le protocole afin de marquer le fer incorporé dans les endosomes/lysosomes.

Les cellules fixées au PFA 4% sont conservées à $+4^\circ\text{C}$ en DPBS jusqu'au jour de la coloration. Les cellules sont perméabilisées par un bain de triton 0,2% pendant 2 heures en monocouche ou en coupes $20 \mu\text{m}$, et pendant 24 heures en sphéroïdes.

Un rinçage rapide à l'éthanol 70% est réalisé, puis un rinçage à l'eau. Les cellules sont incubées ensuite avec le réactif du kit préparé extemporanément, pendant 2 heures sur cellules en 2D et 2x2 heures (en refaisant la solution) en microsphéroïdes. Ce réactif est composé d'un mélange 1 :1 d'HCl et d'ions cyanhydriques.

Une contre-coloration au rouge d'aniline (fournie avec le kit) peut être réalisée si nécessaire. La solution colorée est diluée dans l'eau au 1/50, les cellules sont incubées 2 minutes avec la solution puis rincées 2 fois à l'éthanol 70%. Cette contre-coloration n'est pas utile en 3D. Selon le support utilisé, les cellules sont gardées ensuite en PBS (boîtes à fond de verre) ou montées entre lames et lamelles, soit en milieu aqueux (PermafluorTM), soit en résine Eukitt. Pour le montage en résine, les lames sont déshydratées par des bains d'éthanol de concentration croissante (70, 96 et 100%) avant d'être plongées dans du xylène et montées avec de l'Eukitt.

La Figure A.12 montre bien la différence obtenue avec et sans étape de perméabilisation.

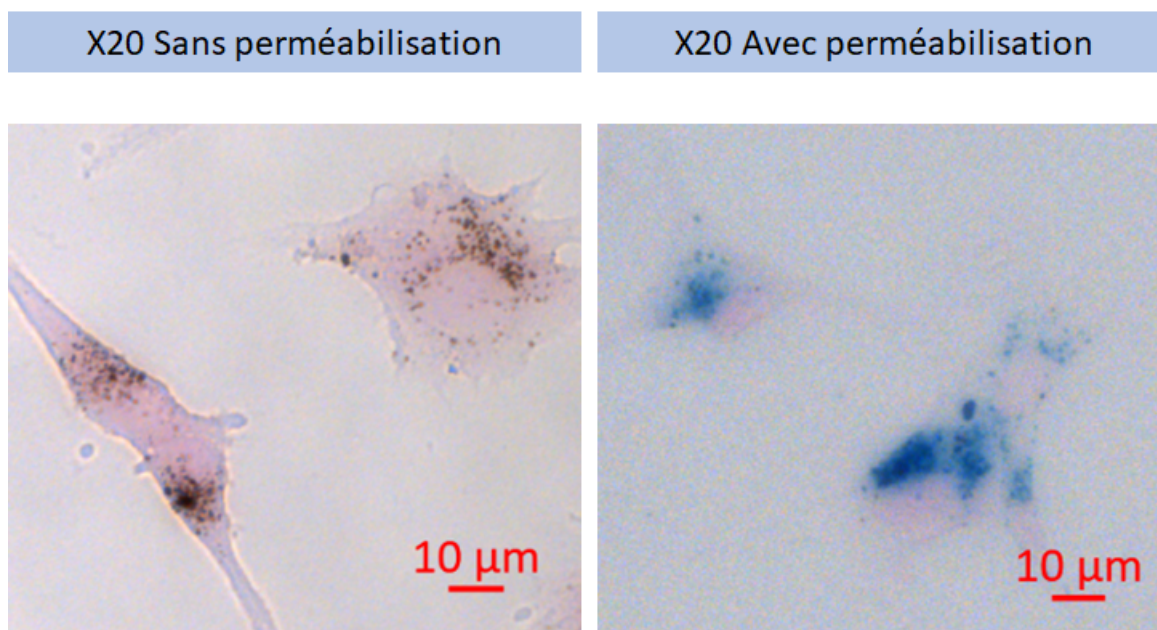


FIG. A.12 – Coloration Perl's avec et sans étape de perméabilisation sur les cellules U87MG incubées 24h avec les magnétosomes AMB1-VRGD, grossissement x20

A.10 Projet 3D : protocoles de transfection

Les protocoles sont présentés au Paragraphe 4.5.1. Des kits commerciaux ont été utilisés, Genecellin™ et JetOptimus™. Le kit JetOptimus, donnant de meilleurs résultats, a été choisi pour la majeure partie des transfusions. Les protocoles suivis sont ceux donnés par les fabricants.

Brièvement, les cellules sontensemencées pour être à 70% de confluence le jour de la transfection. Les plasmides sont mis en contact avec un tampon ou du milieu de culture pendant 15 minutes, avec un réactif de transfection. Puis la suspension de plasmides est mise en contact avec les cellules pour 24 heures, avant d'être enlevée et remplacée par du milieu de sélection. Le milieu de sélection contient un antibiotique (G418), qui élimine toutes les cellules n'ayant pas intégré le plasmide, qui confère le gène de la résistance à cet antibiotique aux cellules. Un test préalable est nécessaire pour déterminer quelle concentration de G418 est nécessaire et suffisante pour tuer 100% des cellules, en condition de transfection (avec les réactifs mais sans plasmides). En effet, les réactifs seuls ont souvent un impact négatif sur les cellules, diminuant le pourcentage de G418 nécessaire, par rapport à l'usage de l'antibiotique seul.

La Figure A.13 présente le tableau des ratios plasmides/réactifs du kit JetOptimus™. J'ai utilisé des plaques 24 puits, avec des plasmides exprimant des protéines fluorescentes vertes (pZgreen), oranges (DsRed2) ou rouges (E2 Crimson), les références étant données en Annexe D.3.

Quantities per well, dish or flask

Culture vessel	W = volume of jetOPTIMUS® buffer	X = amount of DNA added	Y = volume of jetOPTIMUS® reagent
96-well	12.5 µL	0.13 µg	0.13 – 0.19 µL
24-well	50 µL	0.5 µg	0.5 – 0.75 µL
6-well / 35 mm	200 µL	2 µg	2 – 3 µL
60 mm / flask 25 cm ²	500 µL	4 µg	4 – 6 µL
100 mm / flask 75 cm ²	1000 µL	10 µg	10 – 15 µL

DAY 2-3: Measure gene expression

See back page for optimization tips

Download complete protocol on www.polyplus-transfection.com/resources/product-literature/

FIG. A.13 – Kit de transfection JetOptimus™

A.11 Projet 3D : protocoles de sous-clonage

Les transfections successives ne permettant pas d'obtenir une lignée 100% fluorescente, avec une fluorescence suffisamment exprimée, une sélection a été nécessaire. Les U87MG ont été sous-clonées par la méthode dite de dilution limite. Les cellules sontensemencées à très faible densité en plaque 96 puits. Les cellules U87MG ne supportant pas une dilution limite maximale (1 cellule/puits), une dilution intermédiaire (10 cellules/puits) a permis d'obtenir des clones comportant entre 60 et 100% de cellules fluorescentes. Le premier clone sélectionné à 100% de cellules exprimant E2 Crimson a cependant montré une croissance bien inférieure à la lignée WT. Un clone à 90% de cellules transfectées a été utilisé pour re-sélectionner un clone à 100% de cellules fluorescentes, en éliminant cette fois-ci les puits contenant au moins une cellule non fluorescente.

Un sous-clonage sera également nécessaire pour les cellules MDA-MB-231 et les cellules SKBR3 transfectées.

Annexes *in vivo* et *ex vivo*

- B.1 Mefisto : Séquences IRM utilisées
- B.2 Mefisto : Angiogrammes MV1 et Ferrumoxide
- B.3 Mefisto : IRM *in vivo*
 - B.3.1 Mefisto : Caractérisation du modèle tumoral en IRM
 - B.3.2 Mefisto : Résultats d'IRM moléculaire avec les magnétosomes AMB1V et AMB1VRGD
- B.4 Protocole d'exsanguination-perfusion
- B.5 Protocoles d'immunohistochimie
- B.6 Mefisto : Coloration Perl's sur coupes
- B.7 Mefisto : Analyse Imaris
- B.8 Mefisto : Immunomarquage Nestine
- B.9 Mefisto : Immunomarquage Vimentine
- B.10 Orano : Tumeurs A431
- B.11 Orano : Résultats IRM

B.1 Mefisto : Séquences IRM utilisées

Cette liste se rapporte à l'ensemble des études réalisées en IRM, quel que soit le scanner.

FLASH, 7T, T_2^* -weighted FLASH (Fast Low Angle SHot) sequence
TE/TR = 16/485 ms, champ de vue $1,92 \times 1,68 \text{ cm}^2$, résolution spatiale $160 \times 160 \mu\text{m}^2$, 22 coupes de $320 \mu\text{m}$ d'épaisseur, 48 répétitions, durée d'acquisition 40 min.

RARE, 11,7T, T_2 -weighted RARE (Rapid Acquisition with Refocused Echoes) sequence
TE/TR = 11/2500 ms, champ de vue $2 \times 2 \text{ cm}^2$, résolution spatiale $78 \times 78 \mu\text{m}^2$, 14 coupes de $500 \mu\text{m}$ d'épaisseur, 2 répétitions, durée d'acquisition 2 min 40s.

FLASH, 11,7T, T_2^* -weighted FLASH (Fast Low Angle SHot) sequence
TE/TR = 8/1600 ms, champ de vue $1,92 \times 1,47 \text{ cm}^2$, résolution spatiale $75 \times 75 \mu\text{m}^2$, 90 coupes de $75 \mu\text{m}$ d'épaisseur, 1 répétition, durée d'acquisition 5 min.

MGE, 11,7T, Parametric T_2^* mapping MGE (Multi Gradient Echo) sequence
TE = 3,5/7/10,5/14/17,5/21/24,5/28 ms, TR = 90 ms, champ de vue $1,9 \times 1,42 \times 0,8 \text{ cm}^3$, résolution spatiale $100 \times 100 \times 100 \mu\text{m}^3$, 1 répétition, durée d'acquisition 17 min.

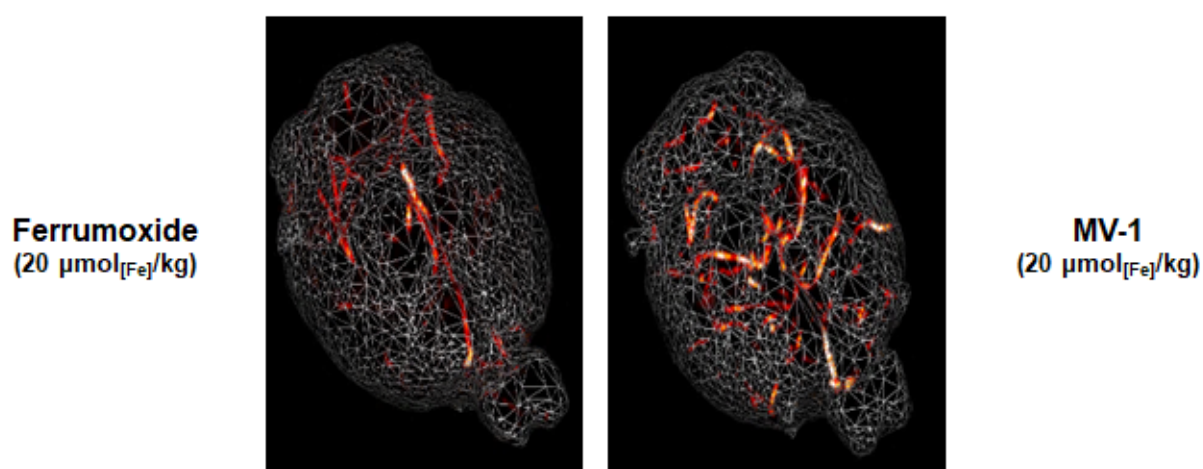
RARE, 17,2T, T_2 -weighted RARE (Rapid Acquisition with Refocused Echoes) sequence
TE/TR = 10/3000 ms, champ de vue $2,016 \times 2,016 \text{ cm}^2$, résolution spatiale $90 \times 90 \mu\text{m}^2$, 20 coupes de $360 \mu\text{m}$ d'épaisseur, 8 répétitions, durée d'acquisition 22 min 24s.

FLASH, 17,2T, T_2^* -weighted FLASH (Fast Low Angle SHot) sequence
TE/TR = 8/680 ms, champ de vue $2,016 \times 2,016 \text{ cm}^2$, résolution spatiale $90 \times 90 \mu\text{m}^2$, 36 coupes de $180 \mu\text{m}$ d'épaisseur, 12 répétitions, durée d'acquisition 30 min

B.2 Mefisto : Angiogrammes MV1 et Ferrumoxide

La Figure B.1 se rapporte au Paragraphe 2.1.4.

Faible dose de Magnetosome :
réhaussement du signal à 17,2 T



Mériaux et al, Adv Health Mat, 2015

FIG. B.1 – Angiogrammes de cerveaux de souris après injection intraveineuse de magnétosomes MV1 versus Ferrumoxide

B.3 Mefisto : IRM *in vivo*

Ces données se rapportent au Paragraphe 2.3.2.

B.3.1 Mefisto : Caractérisation du modèle tumoral en IRM

La Figure B.2 illustre l'effet EPR dans la tumeur. La tumeur retient plus de particules que le tissu sain environnant. La relaxivité R_2^* observée dans les deux zones est significativement différente.

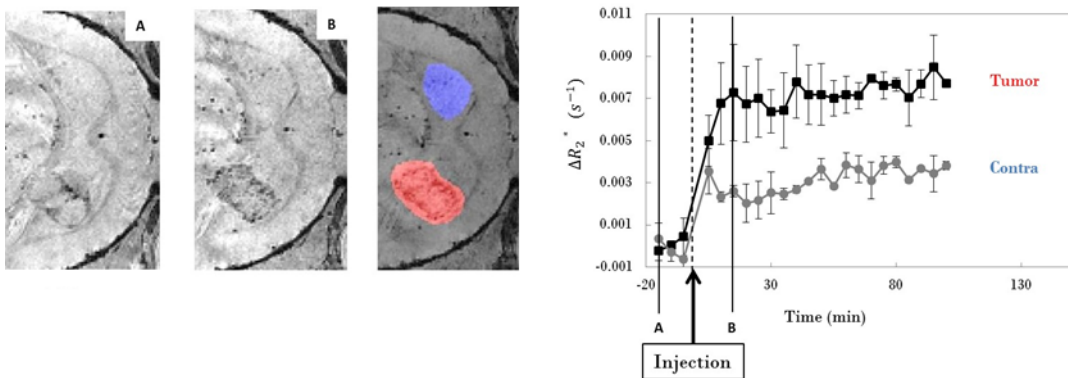


FIG. B.2 – Effet de rétention des magnétosomes WT dans la tumeur par rapport au tissu sain contra-latéral. Images obtenues en séquence FLASH avant (A) et 15 minutes après l'injection (B) à $200 \mu\text{mol}[\text{Fe}]/\text{kg}$, la tumeur est représentée en rouge, le tissu contra-latéral en bleu

B.3.2 Mefisto : Résultats d'IRM moléculaire avec les magnétosomes AMB1V et AMB1VRGD

La Figure B.3 illustre le réhaussement du signal après injection des magnétosomes AMB1-V et AMB1-VRGD, jusqu'à 100 minutes après l'injection. Les magnétosomes conjugués avec VRGD permettent d'obtenir un réhaussement du signal supérieur à celui obtenu avec les magnétosomes AMB-V.

La Figure B.4 illustre les résultats IRM individuels des souris après injection des magnétosomes conjugués et non conjugués.

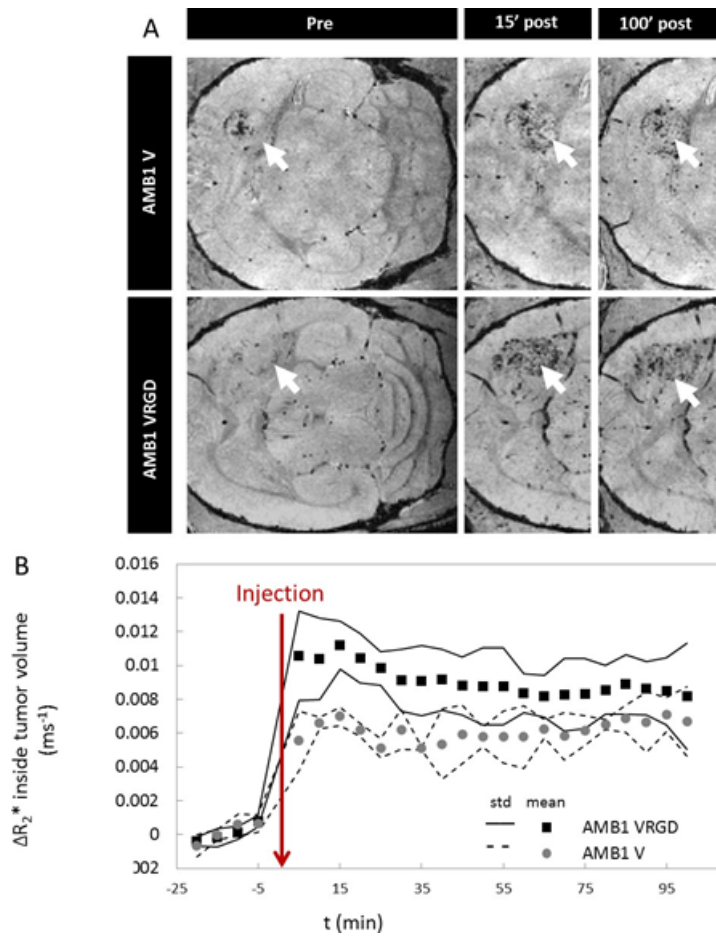


FIG. B.3 – A : Images IRM (séquence FLASH) avant et après injection à $200 \mu\text{mol}[\text{Fe}]/\text{kg}$ des magnétosomes AMB1V et AMB1VRGD chez la souris porteuse de tumeur U87MG. B : réhaussement du contraste R_2^* après injection ($n=2$, pour chaque condition).

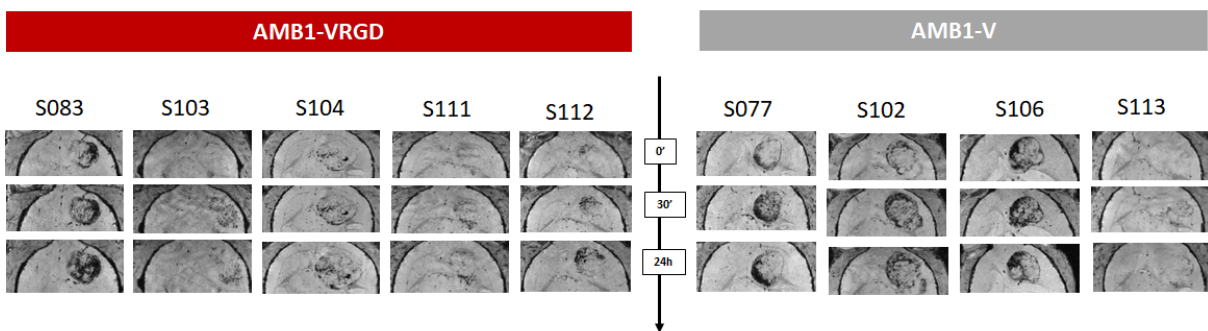


FIG. B.4 – Images IRM individuelles (séquence FLASH) avant et après injection à $200 \mu\text{mol}[\text{Fe}]/\text{kg}$ des magnétosomes AMB1V et AMB1VRGD chez des souris porteuses de tumeur U87MG.

B.4 Protocole d'exsanguination-perfusion

Ce protocole est présenté au Paragraphe 2.4.1.

Pour le prélèvement d'organes avec exsanguination-perfusion, une antalgie sera réalisée par injection sous-cutanée de Buprénorphine (0,06 mg/kg pour les souris et 0,03 mg/kg pour les rats), 30 minutes avant l'anesthésie. Les animaux sont anesthésiés par une injection intrapéritonéale d'un mélange Kétamine/Xylazine (100/10 mg/kg, dose de 10 mL/kg).

Après avoir vérifié l'anesthésie profonde (pincement de la patte arrière), une ouverture est pratiquée au niveau du sternum afin de découper une partie des côtes et de dégager le cœur. Une aiguille montée sur un perfuseur est positionnée dans le ventricule gauche et l'oreillette droite est sectionnée. Une première perfusion de sérum physiologique permettra l'exsanguination.

Pour les études immunohistochimiques, cette exsanguination est suivie par une perfusion de paraformaldéhyde (PFA) à 4% pour fixer les organes.

Les organes d'intérêt sont alors prélevés, puis post-fixés 2 heures en PFA 4%. Des bains de sucrose sont alors réalisés (15 puis 30%, en PBS 0,1M), suivis d'une congélation dans l'isopentane refroidi à -30°C.

Pour les études de biodistribution (dosage des nanoparticules par ICP), les organes d'intérêt sont prélevés après la première perfusion de sérum physiologique et congelés par trempage dans un bain d'azote. Finalement, les organes d'intérêt sont conservés à -80°C jusqu'au jour de leur utilisation.

B.5 Protocoles d'immunohistochimie

Les organes congelés sont découpés au cryostat, en coupes fines de 20 μm . Les coupes sont conservées à -30°C jusqu'au jour de leur utilisation.

Une étape de blocage des sites non spécifiques et une étape de perméabilisation sont souvent nécessaires, réalisées conjointement ou non, avec du tampon contenant 1% de BSA, 5% de sérum d'âne et un pourcentage variable de détergent (Triton X100) en fonction des anticorps, en PBS 0,01M en sérum physiologique. Tous les anticorps sont dilués dans du sérum d'âne à 5%, des rinçages en PBS 0,01M en sérum physiologique sont réalisés entre chaque incubation d'anticorps (2 x 5 min minimum). Les milieux de montages utilisés sont soit le Prolong[™] avec ou sans DAPI (colorant nucléaire), soit du Permafluor[™]. Toutes les références des anticorps sont rassemblées dans une table, présentée en Annexe D.4.

Les immunomarquages sont présentés au Paragraphe 2.4.1 pour le projet Mefisto et au Paragraphe 3.4.2 pour le projet Orano.

Les protocoles d'immunomarquages sur coupes, quel que soit le projet, sont présentés dans des tableaux récapitulatifs (Figure B.5, Figure B.6, Figure B.7 et Figure B.8, en fonction du nombre de marquages réalisés (simple, double, triple ou quadruple marquages)).

Simple marquage							
Tampon de blocage/perméabilisation	Durée Incubation	Anticorps primaire	Durée Incubation	Anticorps secondaire	Durée Incubation	tissus	Projet
Triton 1%	2h	Rab anti-HER2 1/100	1h	Dk Anti-Rab 594 1/250	1h	Tumeur A431	Orano
Triton 1%	2h	Rat anti-CD31 1/25	1h	Dk anti-Rat-A594 1/250	1h	Tumeur A431	Orano
-	-	Ms anti- α v β 3- PE 1/100	1h	-	-	Coupe de sphéroïdes U87-MG	3D
Triton 0.2%	2h	Rab anti- Vimentine 1/500	1h	Dk Anti-Rab 488 1/250	1h	Coupe de sphéroïdes U87-MG	3D
Triton 1%	2h	Rab anti-Ki67 1/500	1h	Dk Anti-Rab 647 1/250	1h	Coupe de sphéroïdes U87-MG	3D
Triton 1%	2h	Ms anti-SV40T 1/100	1h	Dk anti-Ms A594	1h	Coupe de sphéroïdes hCMEC/D3 pzGreen	3D
Triton 1%	2h	Rab anti-AMB1 1/5000	1h	Dk Anti-Rab 488 1/250	1h	Coupe de sphéroïdes U87-MG	3D

FIG. B.5 – Protocoles d'immunomarquages à un anticorps sur coupes *ex vivo*

Double marquage + Noyaux révélés en Hoest ou en DAPI									
Tampon de blocage/perméabilisation	Durée Incubation	Anticorps primaire	Durée Incubation	Anticorps secondaire + colorant membranaire	Durée Incubation	tissus	Projet		
Triton 0.2%	30 min	Rab anti-Caspase3 1/500	1h	Anti-Rab Alexa594 1/250 + agglutinine de germe de blé couplé Alexa488 1/500	1h	foie de souris porteuses de tumeur U87-MG	Mefisto		
Triton 0.2%	30 min	Rab anti-RIP3 1/100	1h	Anti-Rab Alexa594 1/250 + agglutinine de germe de blé couplé Alexa488 1/500	1h	foie de souris porteuses de tumeur U87-MG	Mefisto		
Tampon de blocage/perméabilisation	Durée Incubation	Anticorps primaire	Durée Incubation	Anticorps secondaire + Anticorps primaire couplé	Durée Incubation	tissus	Projet		
Triton 1%	2h	Rab anti-CD133 1/50	1h	Dk Anti-Rab 488 1/250 + ms α v β 3-PE 1/100	1h	cerveaux de souris porteuse de tumeur U87-MG	Mefisto		
Triton 0.2%	2h	Goat anti-Sox2 1/100	1h	Dk Anti-Goat 488 1/250 + ms α v β 3-PE 1/100	1h	cerveaux de souris porteuse de tumeur U87-MG	Mefisto		
Triton 0.2%	2h	Goat anti-S100A4 1/100	1h	Dk Anti-Goat 488 1/250 + ms α v β 3-PE 1/100	1h	cerveaux de souris porteuse de tumeur U87-MG	Mefisto		
Triton 0.2%	2h	Rat anti-IDH1 1/100	1h	Dk Anti-Rab 488 1/250 + ms α v β 3-PE 1/100	1h	cerveaux de souris porteuse de tumeur U87-MG	Mefisto		
Triton 1%	2h	Rab anti-Vimentine 1/500	1h	Dk Anti-Rab 488 1/250 + ms α v β 3-PE 1/100	1h	cerveaux de souris porteuse de tumeur U87-MG	Mefisto		
Tampon de blocage/perméabilisation	Durée Incubation	Anticorps primaire 1	Durée Incubation	Anticorps primaire 2	Durée Incubation	Anticorps secondaires 1 et 2	Durée Incubation	tissus	Projet
Triton 1%	2h	Rab anti-AMB1 1/5000	1h	Rat anti-CD68 1/100	1h	Dk Anti-Rab 647 1/250 + Dk anti-Rat A488 1/250	1h	foie de souris porteuses de tumeur U87-MG	Mefisto
Triton 1%	2h	Rab anti-AMB1 1/5000	1h	Rat anti-CD31 1/25	1h	Dk Anti-Rab 647 1/250 + Dk anti-Rat A488 1/250	1h	Tumeur A431	Orano
Triton 1%	2h	Rab anti-Trastuzumab 1/100	1h	Rat anti-CD31 1/25	1h	Dk Anti-Rab 647 1/250 + Dk anti-Rat A488 1/250	1h	Tumeur A431	Orano
Triton 1%	2h	Rab anti-HER2 1/100	1h	Rat anti-CD31 1/25	1h	Dk Anti-Rab 647 1/250 + Dk anti-Rat A488 1/250	1h	Tumeur A431	Orano
Triton 1%	2h	Rab anti-HER2 1/100	1h	Rat anti-CD31 1/25	1h	Dk Anti-Rab 647 1/250 + Dk anti-Rat A488 1/250	1h	Tumeur SKBR3	Orano
Coloration Thioflavine puis Triton 1.5%	2h	Chicken anti-GFAP 1/500	1h	Goat anti-Iba1 1/500	1h	Dk Anti-Rab 647 1/250 + Dk anti-Goat A594 1/250	1h	Cerveau de souris Alzheimer	Transparency

FIG. B.6 – Protocoles d'immunomarquages à deux anticorps sur coupes *ex vivo*

Triple marquage + Noyaux révélés en Hoest ou en DAPI											
Tampon de blocage/perméabilisation	Durée Incubation	Anticorps primaire 1	Durée Incubation	Anticorps primaire 2	Durée Incubation	Anticorps secondaires 1, 2 et Anticorps primaire couplé		Durée Incubation	tissus	Projet	
Triton 0.2%	30 min	Rab anti-AMB1 1/5000	1h	Rat anti-CD31 1/50	1h	Dk Anti-rab 647 1/250 + Dk anti-rat A488 1/250 + ms α v β 3-PE 1/100		1h	cerveaux de souris porteuse de tumeur U87-MG	Mefisto	
Triton 0.2%	30 min	Rab anti-Caspase 3 1/500	1h	Rat anti-CD31 1/50	1h	Dk Anti-rab 647 1/250 + Dk anti-rat A488 1/250 + ms α v β 3-PE 1/100		1h	cerveaux de souris porteuse de tumeur U87-MG	Mefisto	
Ethanol/Acide 10 min puis Triton 1%	2h	Rat anti-BCRP 1/100	2h	Rab anti-AMB1 1/5000	1h	Dk Anti-rab 647 1/250 + Dk anti-rat A488 1/250 + ms α v β 3-PE 1/100		1h	cerveaux de souris porteuse de tumeur U87-MG	Mefisto	
Triton 0.2%	2h	Guinea Pig anti-Vimentine 1/50	2h	Chicken anti-GFAP 1/500	1h	Dk Anti-GP 647 1/100 + Dk anti-Chicken A488 1/250 + ms α v β 3-PE 1/250		1h	cerveaux de souris porteuse de tumeur U87-MG	Mefisto	
Triton 0.2%	2h	Goat anti-S100A4 1/100	1h	Rab anti-lBa1 1/500	1h	Dk Anti-Rab 647 1/100 + Dk anti-Goat A488 1/250 + ms α v β 3-PE 1/250		1h	cerveaux de souris porteuse de tumeur U87-MG	Mefisto	
Ethanol/Acide 10 min puis Triton 1%	2h	Rab anti-AMB1 1/5000	1h	Rat anti-BCRP 1/100	2h	Dk Anti-Rab 647 1/250 + Dk anti-Rat A594 1/250 + ms NestinA488 1/250		1h	cerveaux de souris porteuse de tumeur U87-MG	Mefisto	
Ethanol/Acide 10 min puis Triton 1%	2h	Rab anti-AMB1 1/5000	1h	Rat anti-BCRP 1/100	2h	Dk Anti-Rab 647 1/250 + Dk anti-Rat A594 1/250 + msCD133A488 1/50		1h	cerveaux de souris porteuse de tumeur U87-MG	Mefisto	
Tampon de blocage/perméabilisation	Durée Incubation	Anticorps primaire 1	Durée Incubation	Anticorps primaire 2	Durée Incubation	Anticorps primaire 3	Durée Incubation	Anticorps secondaires 1, 2 et 3	Durée Incubation	tissus	Projet
Triton 0.2%	2h	Rab anti-AMB1 1/5000	1h	Rat anti-CD31 1/50	1h	Goat anti-lba1 1/500	1h	Dk anti-rab A647 + DK anti-Chicken A488 + Dk anti-Goat A594	1h	cerveaux de souris porteuse de tumeur U87-MG	Mefisto

FIG. B.7 – Protocoles d'immunomarquages à trois anticorps sur coupes *ex vivo*

Quadruple marquage													
Tampon de blocage perméabilisation	Durée Incubation	Anticorps primaire 1	Durée Incubation	Anticorps primaire 2	Durée Incubation	Anticorps primaire 3	Durée Incubation	Anticorps secondaires 1, 2 et 3 + 1 Anticorps primaire couplé	Durée Incubation	tissus	Projet		
Triton 0.2%	2h	Chicken anti-GFAP 1/500	1h	Goat anti-Iba1 1/500	1h	Rab anti-AMB1 1/5000	1h	Dk anti-rab A350 1/100 + DK anti-Chicken A488 1/250 + Dk anti-Goat A647 1/250 + Ms anti- α v β 3-PE 1/100	1h	cerveaux de souris porteuse de tumeur U87-MG	Mefisto		
Triton 0.2%	30 min	Rab anti-AMB1 1/5000	1h	Rat anti-CD31 1/50	1h	Goat anti-Iba1 1/500	1h	Dk anti-rab A350 1/100 + DK anti-rat A488 1/250 + Dk anti-Goat A647 1/250 + Ms anti- α v β 3-PE 1/100	1h	cerveaux de souris porteuse de tumeur U87-MG	Mefisto		
Triton 0.2%	30 min	Rab anti-AMB1 1/5000	1h	Rat anti-CD31 1/50	1h	Chicken anti-Nestin 1/500	1h	Dk anti-rab A350 1/100 + DK anti-rat A647 1/250 + Dk anti-Chicken A88 1/250+ Ms anti- α v β 3-PE 1/100	1h	cerveaux de souris porteuse de tumeur U87-MG	Mefisto		
Triton 0.2%	2h	Rab anti-AMB1 1/5000	1h	Guinea Pig anti-Vimentine 1/50	2h	Rat anti-IDH1 1/100	1h	Dk anti-rab A350 1/100 + DK anti-rat A488 1/100 + Dk anti-GP647 1/100 + Ms anti- α v β 3-PE 1/100	1h	cerveaux de souris porteuse de tumeur U87-MG	Mefisto		

Tampon de blocage perméabilisation	Durée Incubation	Anticorps primaire 1	Durée Incubation	Anticorps primaire 2	Durée Incubation	Anticorps secondaire 2	Anticorps primaire 3	Durée Incubation	Anticorps secondaires 1 et 3	Durée Incubation	Anticorps Primaire couplé	Durée Incubation	tissus	Projet
Triton 0.2%	2h	Guinea Pig anti-Vimentine 1/50	2h	Goat anti-S100A4 1/100	1h	Dk anti-Goat A594 1/250	Rab anti-AMB1 1/5000	1h	Dk anti GP A647 1/100 + Dk anti-RabA350 1/100	2h	ms Anti-Nestin A488 1/100	1h	cerveaux de souris porteuse de tumeur U87-MG	Mefisto
Triton 0.2%	2h	Guinea Pig anti-Vimentine 1/50	2h	Goat anti-S100A4 1/100	1h	Dk anti-Goat A594 1/250	Rab anti-AMB1 1/5000	1h	Dk anti GP A647 1/100 + Dk anti-RabA350 1/100	2h	Rat anti-Sox2A488 1/100	1h	cerveaux de souris porteuse de tumeur U87-MG	Mefisto

Tampon de blocage perméabilisation	Durée Incubation	Anticorps primaire 1	Durée Incubation	Anticorps primaire 2	Anticorps primaire 3	Anticorps primaire 4	Durée Incubation Ac 2,3 et 4	Anticorps secondaire 1	Anticorps secondaire 2	Anticorps secondaire 3	Anticorps secondaire 4	Durée Incubation chaque Ac	tissus	Projet
Démasquage citrate puis Triton 1%	2h	Ms anti-NeuN 1/100	2h	Guinea Pig anti-Parvalbumine 1/1000	Rab anti-Calbindin 1/1000	Goat anti-Calretinin 1/100	1h	Anti-Rab 350 1/100	Anti-Goat A488 1/250	Anti-Ms A594 1/250	Anti-GP A647 1/100	1h	Cerveaux de souris, Rat et Macaque	Transparency

FIG. B.8 – Protocoles d'immunomarquages à quatre anticorps sur coupes *ex vivo*

B.6 Mefisto : Coloration Perl's sur coupes

La coloration du Fer sur les coupes *ex vivo* du projet Mefisto est présentée au Paragraphe 2.4.1.

Globalement, le marquage du fer est réalisé avec le kit HT120 de la société Sigma, avec ou non une étape de perméabilisation avec différents détergents, et avec ou sans une contre-coloration au rouge d'aniline.

La Figure B.9 montre quelques exemples des résultats obtenus. Le protocole classique avec contre-coloration n'a permis de visualiser que quelques amas bleus, avec des amas bruns et des cellules vaguement plus foncées, sans pouvoir déterminer avec certitude si s'agit d'une coloration brune ou bleue. Des études de perméabilisation ont été ajoutées, avec différentes concentrations de Triton, de SDS et d'un mélange de plusieurs détergents, avec des résultats variables, allant de la visualisation de beaucoup plus d'amas bruns que de bleus, d'une coloration non spécifique des fibres blanches à un meilleur rendu en coloration bleu. Le meilleur protocole ne donne pas un marquage du fer correspondant aux immunomarquages, sur des coupes adjacentes.

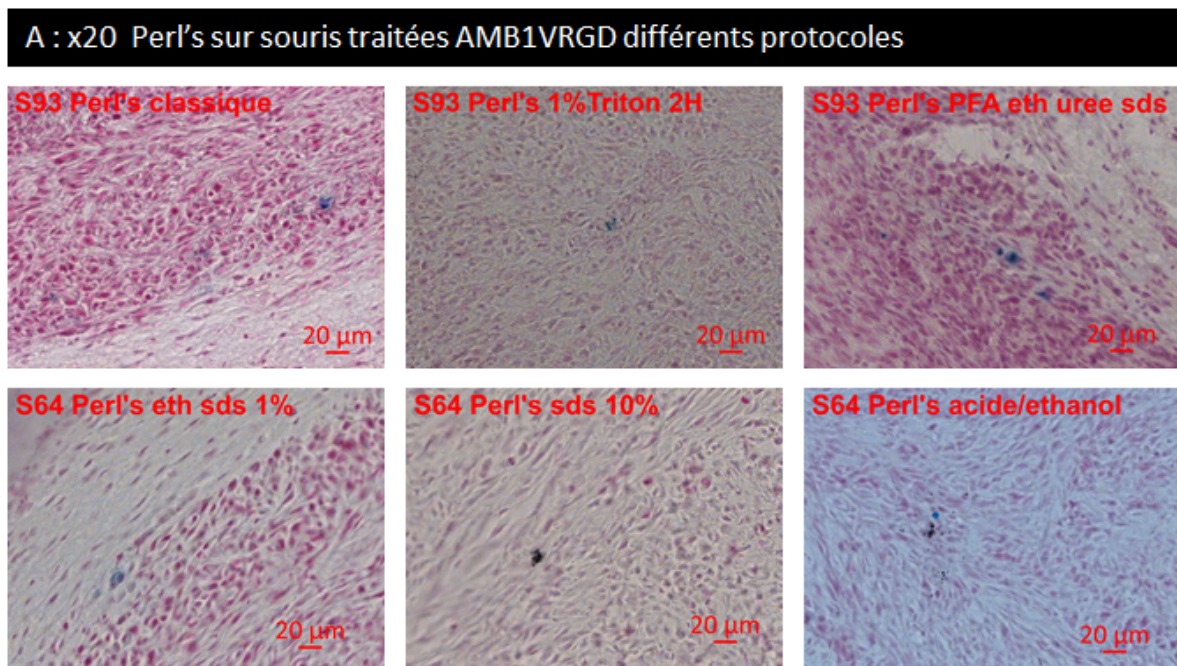


FIG. B.9 – Marquage du fer sur des coupes *ex vivo* à l'aide de différents protocoles

La coloration du Fer sur les coupes *ex vivo* du projet Orano est présentée au Paragraphe 3.4.2. La perméabilisation avec du triton 0.2% pendant 48h avant la coloration est le protocole le plus satisfaisant.

B.7 Mefisto : Analyse Imaris

Cette analyse est présentée au Paragraphe 2.4.1.

La Figure B.10 reprend les valeurs obtenues en analysant les images avec le logiciel Imaris. La comparaison entre les images obtenues après l'apport de la dose des magnétosomes en une ou deux injections permet de démontrer que l'incorporation des magnétosomes est supérieure en scindant les doses.

										CD31 SUR MASK AMB1				
NPS	souris	aire tumeur μm^2	aire amb1 ds tumeur	% surface AMB1+ ds Tumeur	nb de surfaces AMB1	aire vaisseaux ds tumeur	% surface CD31 + dans tumeur	nb de surfaces CD31	aire de surface CD31+ ds AMB1+	% surface AMB1+ CD31+ ds tumeur	% surface AMB1+ ds vaisseaux tumeur	nb de surfaces amb1+ CD31+	SURFACE AMB1+ CD31-	% AMB1 non coloc avec CD31 ds Tumeur
SIMPLE	MEF83	18892500	777801	4.12	1189	3725849	19.72	19640	214724	1.14	5.76	2686	563077	2.98
	MEF103	6290807	166523	2.65	223	1010355	16.06	4838	164284	2.61	16.26	224	2239	0.04
	MEF104	22219600	1391271	6.26	1806	3773703	16.98	4345	1334358	6.01	35.36	1802	56913	0.26
	MEF111	15207950	870838	5.73	1565	2527902	16.62	3831	737974	4.85	29.19	1347	132864	0.87
	moyenne	15652714	801608	4.69	1196	2759452	17.35	8164	612835	3.65	21.64	1515	188773	1.04
ECART TYPE	6866909	502127	1.64	696	1300716	1.63	7662	546487	2.19	13.25	1024	255220	1.34	
DOUBLE	MEF78	27500000	2215737	8.06	1380	6250249	22.73	24616	1937504	7.05	31.00	738	278233	1.01
	MEF93	20120899	1700017	8.45	211	3624895	18.02	5115	1341159	6.67	37.00	198	358858	1.78
	MEF101	13713600	974287	7.10	1494	1454295	10.60	3310	541503	3.95	37.23	894	432784	3.16
	MEF108	23263100	2640377	11.35	2292	2925163	12.57	2826	1756722	7.55	60.06	1089	883655	3.80
	moyenne	21149400	1882605	8.74	1344	3563651	15.98	8967	1394222	6.30	41.32	730	488383	2.44
ECART TYPE	5806513	717304	1.83	858	2006540	5.48	10479	620888	1.61	12.82	382	270968	1.27	

FIG. B.10 – Analyses semi-quantitatives du contenu en magnétosomes dans des images de microscopie (logiciel Imaris)

B.8 Mefisto : Immunomarquage Nestine

Ces résultats sont présentés au Paragraphe 2.4.1.

Un anticorps polyclonal de poulet ciblant la Nestine murine a été utilisé sur les cellules humaines pour déterminer s'il est capable de reconnaître également a minima la Nestine humaine. La Figure B.11 illustre l'expression de la Nestine en 2D (image A) et en 3D (image B), en comparant dans chaque cas avec l'anticorps secondaire seul : l'intensité du signal est faible mais significative.

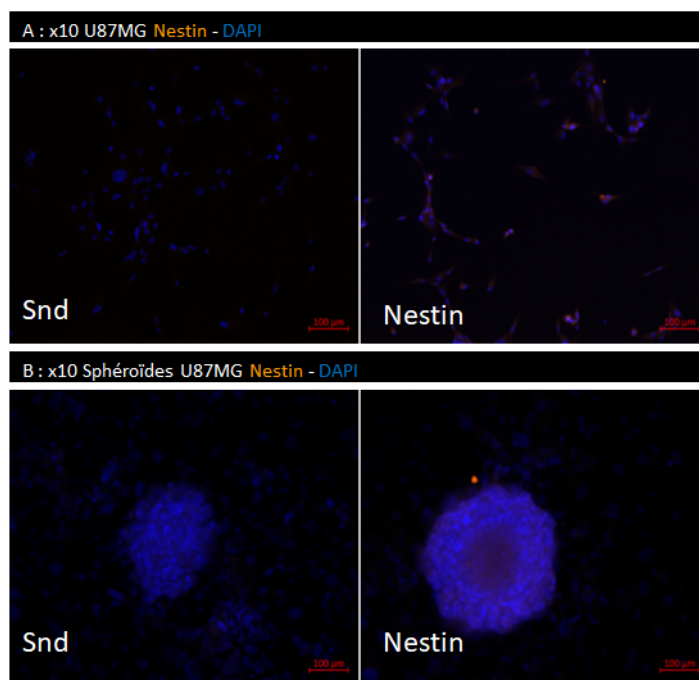


FIG. B.11 – Immunomarquages avec un anticorps de poulet anti-Nestine versus l'anticorps secondaire seul, sur des modèles cellulaires U87MG 2D et 3D

B.9 Mefisto : Immunomarquage Vimentine

Ces résultats sont présentés au Paragraphe 2.4.1.

Un anticorps polyclonal de lapin ciblant la Vimentine humaine et murine a été utilisé pour déterminer si la voie de signalisation EMT est bien surexprimée dans nos tumeurs U87MG. La Figure B.12 illustre l'expression de la vimentine et la comparaison avec notre marqueur d'intérêt l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

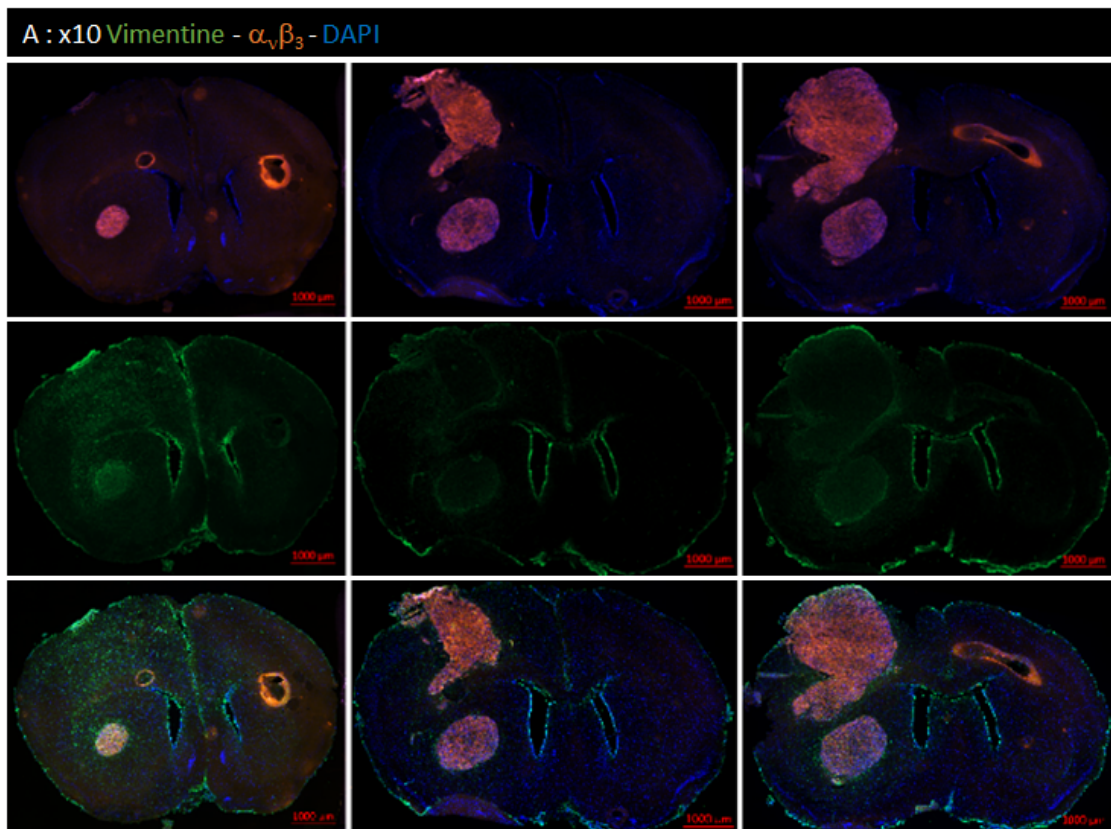


FIG. B.12 – Double immunomarquage anti-Vimentine (Vert) et anti- $\alpha_v\beta_3$ (orange) sur des coupes de cerveaux de souris traitée par des magnétosomes AMB1VRGD (2 x100 μmoles Fer)

B.10 Orano : Tumeurs A431

Ces résultats sont présentés au Paragraphe 3.4.

Les cellules A431 ont été implantées chez un modèle de souris NMRI nude femelle, dans 3 conditions différentes. Le lot 1 a été réalisé sans anesthésie, implantation sous-cutanée de 5 millions de cellules, les lots 2 et 3 ont été réalisés sous anesthésie, (5 et 2.5 millions de cellules respectivement).

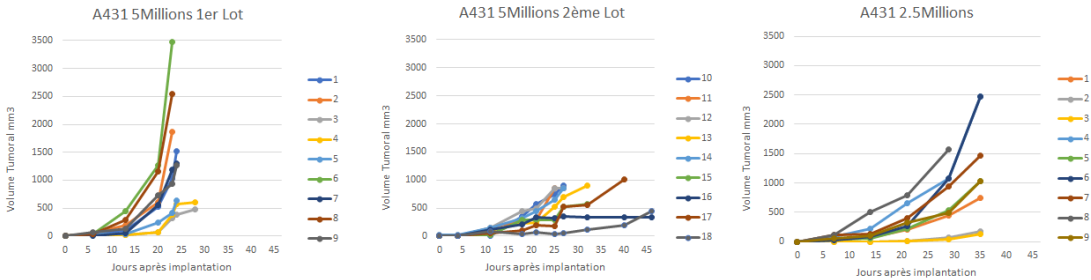


FIG. B.13 – Croissance des tumeurs A431, en fonctions des conditions d’implantations

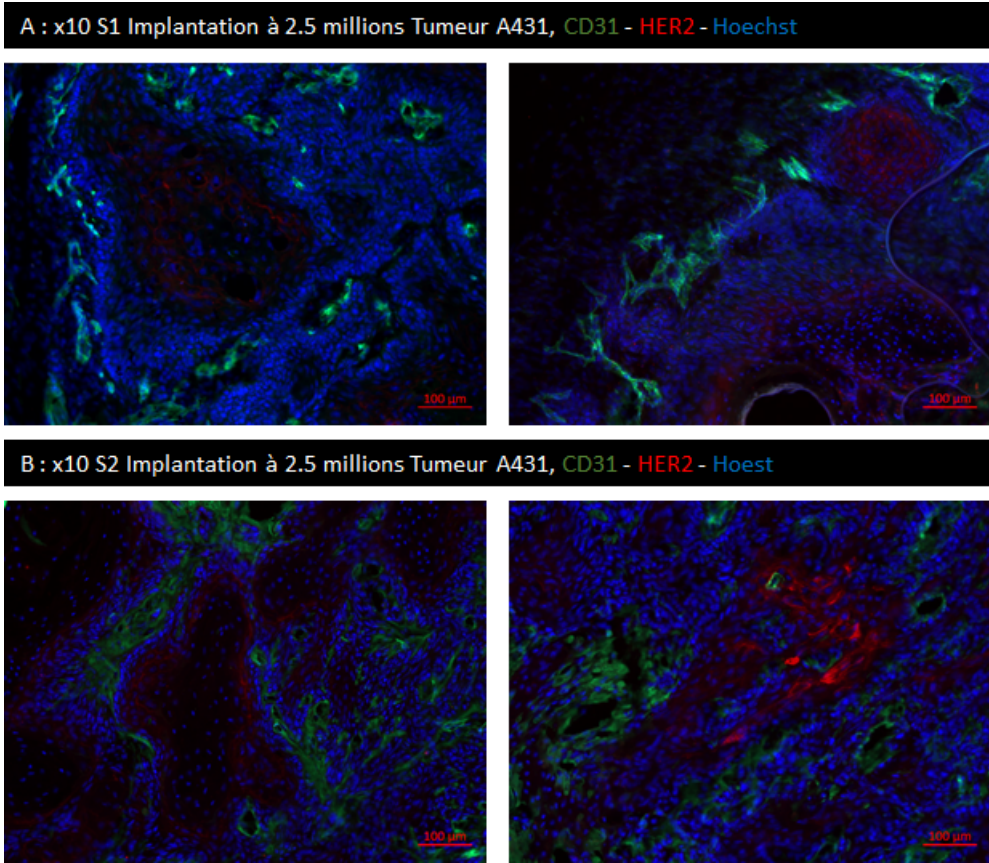


FIG. B.14 – Double immunomarquage CD31/HER2 sur des coupes de tumeur A431 (implantation avec 2,5 millions)

B.11 Orano : Résultats IRM

Ces résultats sont présentés au Paragraphe 3.24. Les paramètres d'imagerie d'IRM utilisés pour les études sur les souris saines sont décrits à la Figure B.15. Cette figure illustre également la biodistribution des magnétosomes dans le foie et la rate.

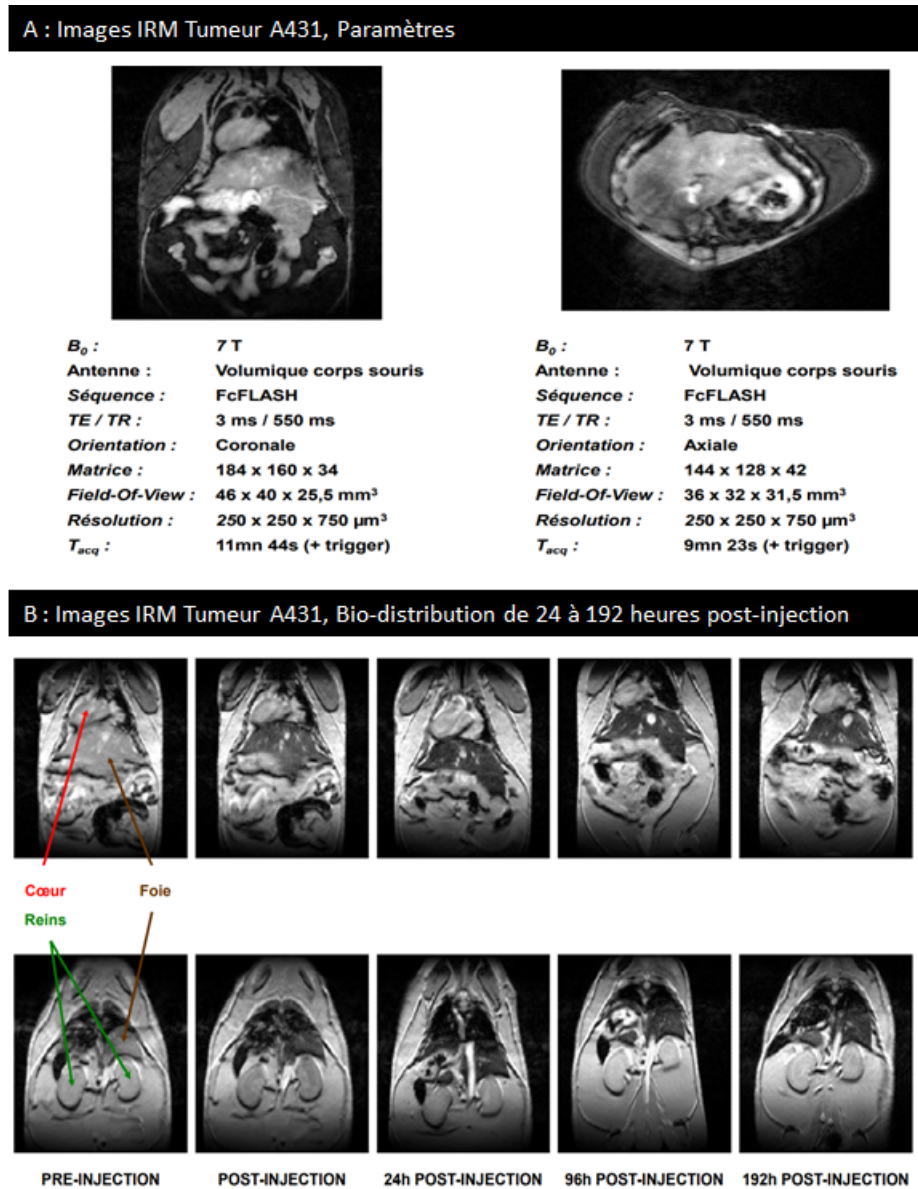


FIG. B.15 – Biodistribution des NPs dans les animaux sains

Ces résultats sont présentés au Paragraphe 3.24. La Figure B.16 illustre l'hétérogénéité interne des tumeurs A431. La Figure B.17 résume le traitement apporté à chaque animal, ainsi que le volume tumoral mesuré.

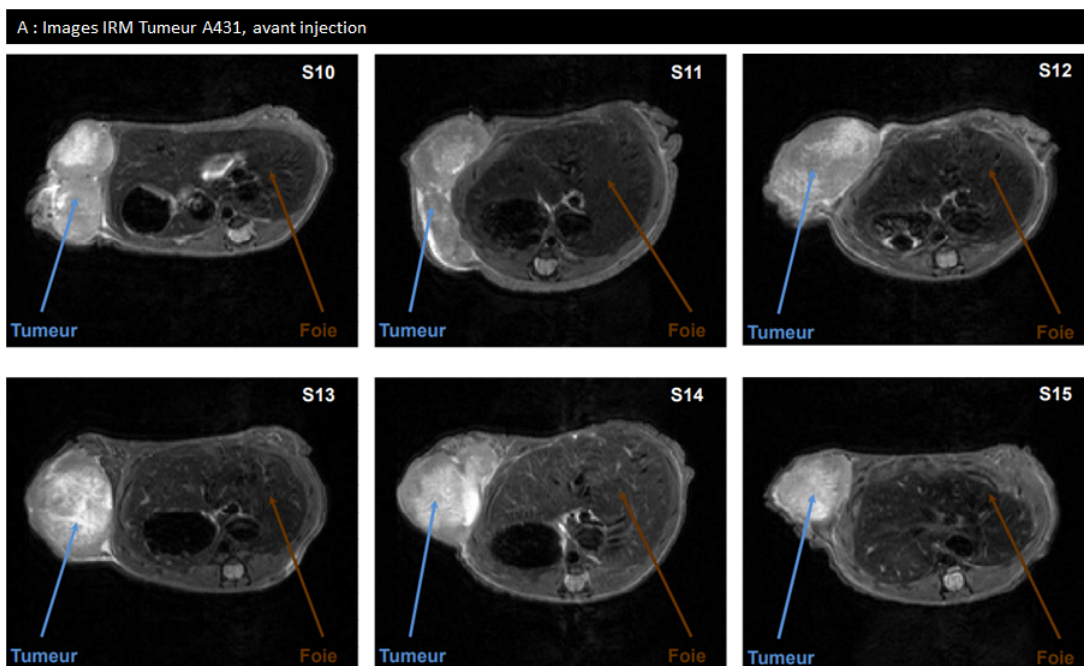


FIG. B.16 – Imagerie IRM des tumeurs A431 avant injection des magnétosomes

Produits injectés : AMB1WT, aliquots à 4,8 mg/mL de Fer
 AMB1conj, aliquots à 4,8 mg/mL de Fer
 AMB1conjPb, aliquots à 4,8 mg/mL de Fer

	Poids (g)	Date d'injection	Produit injecté	Dose ($\mu\text{mol.kg}^{-1}$)	Taille tumeur (mm^3)
Souris S10	30	25/05/2022	AMB1conj	143	908
Souris S11	32	23/05/2022	AMB1WT	215	847
Souris S12	32	23/05/2022	AMB1conj	134	847
Souris S13	32	31/05/2022	AMB1conjPb	161	908
Souris S14	33	25/05/2022	AMB1WT	182	847
Souris S15	33	31/05/2022	AMB1conjPb	130	567

Acquisitions IRM : pré-injection, post-injection (~ 10 min)


FIG. B.17 – Traitements des souris porteuses de tumeurs A431 (S10 à S15)

Annexes Projets 3D


- C.1 Poster WMIC 2010
- C.2 Méthode de la goutte inversée : MGI
- C.3 Fixation
- C.4 Cellules hCMEC/D3 sur matrice extracellulaire
- C.5 Modèles bi-cellulaires
 - C.5.1 Caractérisation des lignées
 - C.5.2 Milieux de culture cellulaire
 - C.5.3 Densité d'ensemencement
- C.6 Sphéroïdes bi-cellulaires colorés avec les colorants Vybrant™
- C.7 Sphéroïdes bi-cellulaires fluorescents : milieu A versus milieu B
- C.8 Mise en contact des magnétosomes avec les sphéroïdes
 - C.8.1 Mefisto : Sphéroïdes en Matrigel™
 - Orano/Mefisto : Microsphéroïdes sous agitation
 - 3D : Sphéroïdes sous agitation en support Cell-Repellent
- C.9 Transparency : Protocoles de coloration à la Thioflavine S
- C.10 Transparency : Protocoles GClear 1 à 6
- C.11 Transparency : Préparation GClear17d3
- C.12 Transparency : Perfusion de DIL
- C.13 Transparency : Coloration à la Thioflavine associée à des immunomarquages
- C.14 Transparency : Quadruple immunomarquage des neurones

C.1 Poster WMIC 2010

Ce poster est présenté au Paragraphe 1.5.1



Novel 3D cell culture medium for characterization of contrast agent in the MRI environment



F. Geoffroy¹, J. Flament¹, G. Jestin², B. Djemai¹, B. Marty¹, C. Giraudeau¹, S. Mériaux¹, J. Valette¹, F. Lethimonnier¹, G. Bloch¹, D. Le Bihan¹, F. Boumezeur¹

¹NeuroSpin, I2BM, Commissariat à l'Energie Atomique, Gif-sur-Yvette, France
²Guerbet, Research Division, BP 57400, 95943 Roissy-Charles de Gaulle Cedex, France

1. Introduction

In vivo MR studies are frequently performed to characterize contrast agent (CA) properties in model biological surroundings. In order to improve the stability & simplicity of such studies, we developed large phantoms of still growing cells using Becton Dickinson Matrigel Basement Membranes as a matrix. Two different 3D cell cultures are presented as illustrations for this novel biological medium for CA characterization compatible with the MRI environment.

2. Subjects and Methods

3D network of growing cells. U87-MG cells culture was performed as usual. To create 3D networks, cells were collected and re-suspended ($2 \cdot 10^5$ cells/mL) in DMEM/10%FBS+Matrigel (25%), and kept 3 days in culture before MR imaging (Fig. 1).

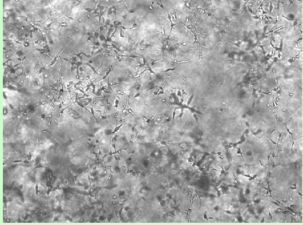
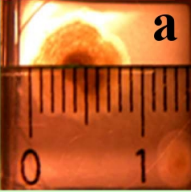
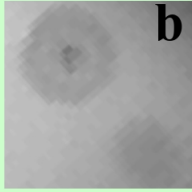


Fig. 1. 3D network of U87 cells (x scaling factor). Cells were cultivated within Matrigel® (25%) to form a 3D network.

Multicellular Tumor Spheroids (MTS). U87-MG cells were used as well. The hanging droplet method was used to obtain spheroids. Matrigel solution was prepared (25% in DMEM/10%FBS) in a 24 wells plate and spheroids were carefully positioned on the surface of the Matrigel, followed by the addition of 1mL of DMEM/10% FBS. MTS were transferred one by one in a new plate filled with a 25% Matrigel solution, and a 15% Matrigel is added on the MTS (Fig.2).



a



b

Fig. 2. Photography (a) and MR image (b) of Multicellular Tumor Spheroids (MTS)

Phantom preparation. 5µL of LipoCEST was added at the core of 3D cell culture using a Hamilton syringe (Fig.3a).

MR Acquisitions. Zspectra (Fig.3 b) were acquired on a 7T Bruker Pharmascan scanner with stabilized temperature ($T \sim 37^\circ\text{C}$) using MSME sequence (TE/TR = 54/5000ms) preceded by a CW saturation pulse ($B_{1sat} \sim 7\mu\text{T}$, range = [-15;15]ppm). The asymmetric Magnetization Transfer Ratio (aMTR, Fig.3 c) was calculated as $(I_{sat} - I_{ref}) / I_{ref} \cdot 100$.

3. Results

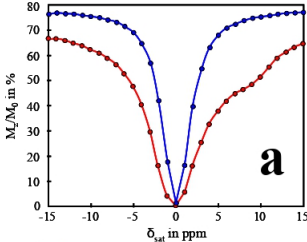
After 3 hours of MRI measurement, the % of living cells in the 3D network of growing cells was very good at 93%, whereas it was closer to 65% for MTS. Both endogenous MT effect and LipoCEST effect are visible (Fig.3 b) respectively blue curve at 2ppm and red curve at 9ppm).

4. Discussion and conclusion

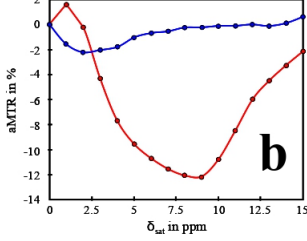
We propose a novel method to characterize CA properties *in vivo* in model biological surroundings. It allows for long MR experiments with a good survival rate of the cells without a complex setup. This method could be particularly interesting to explore biological interactions between functionalized contrast agents and targeted cells.

Acknowledgments

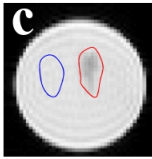
This project has been funded by the French/German project Isalt/Imaging.



a




b



○ U87 cells
○ Matrigel

○ LipoCEST
○ U87 cells
○ Matrigel

Fig. 3. (a) Symmetric and (b) asymmetric Z-spectra acquired from a 3D network of U87 cells in Matrigel with (in red) and without LipoCEST (in blue) in their immediate vicinity; ROIs are detailed in the MR image (c).






FIG. C.1 – Poster WMIC 2010

page 238

C.2 Méthode de la goutte inversée : MGI

Cette méthode est présentée au Paragraphe 4.2.1.

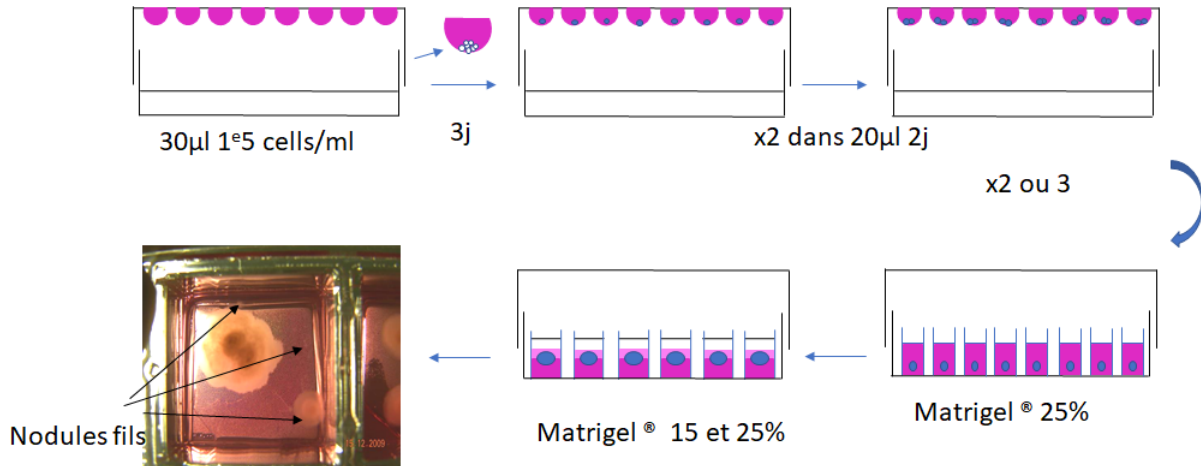


FIG. C.2 – Schéma présentant la préparation de sphéroïdes par la méthode dite des gouttes inversées

Protocole de congélation des sphéroïdes : Prélèvement des sphéroïdes dans le gel à l'aide d'une spatule et rinçage en DPBS 5 minutes, puis déplacement dans une boîte contenant du SVNN. Préparation d'une solution de SVNN à 10% de DMSO sur glace. Préparation des aliquots avec 1 mL de cette solution, puis transfert de 2 à 5 sphéroïdes par aliquots (en fonction de la taille) et congélation à -80°C (isopentane) avant d'être transféré en azote liquide.

Protocole de décongélation des sphéroïdes : Préparation de puits de plaque 96 avec une couche de Matrigel™ 25%, incubation 30 minutes à 37°C . Préparation d'une boîte (5 cm de diamètre) par aliquot avec 2 mL de SVNN, décongélation rapide des aliquots et prélèvement des sphéroïdes encore congelés à la spatule. Décongélation complète dans le SVNN 5 minutes puis dépôt d'un sphéroïde par puits sur le gel, recouvert de milieu. Après 2 ou 3 jours, les sphéroïdes peuvent être transférés dans un puits plus grand en double couche de Matrigel™ 25% - 15%.

Toutes les observations en microscopie ont été réalisées avec un microscope Axio Observer Z1 équipé du logiciel Zen Blue Edition (Zeiss).

C.3 Fixation

Ces résultats sont présentés au Paragraphe 4.2.4.

La Figure C.3 illustre les différentes méthodes de fixation testées sur les sphéroïdes de cellules U87MG et SKBR3.

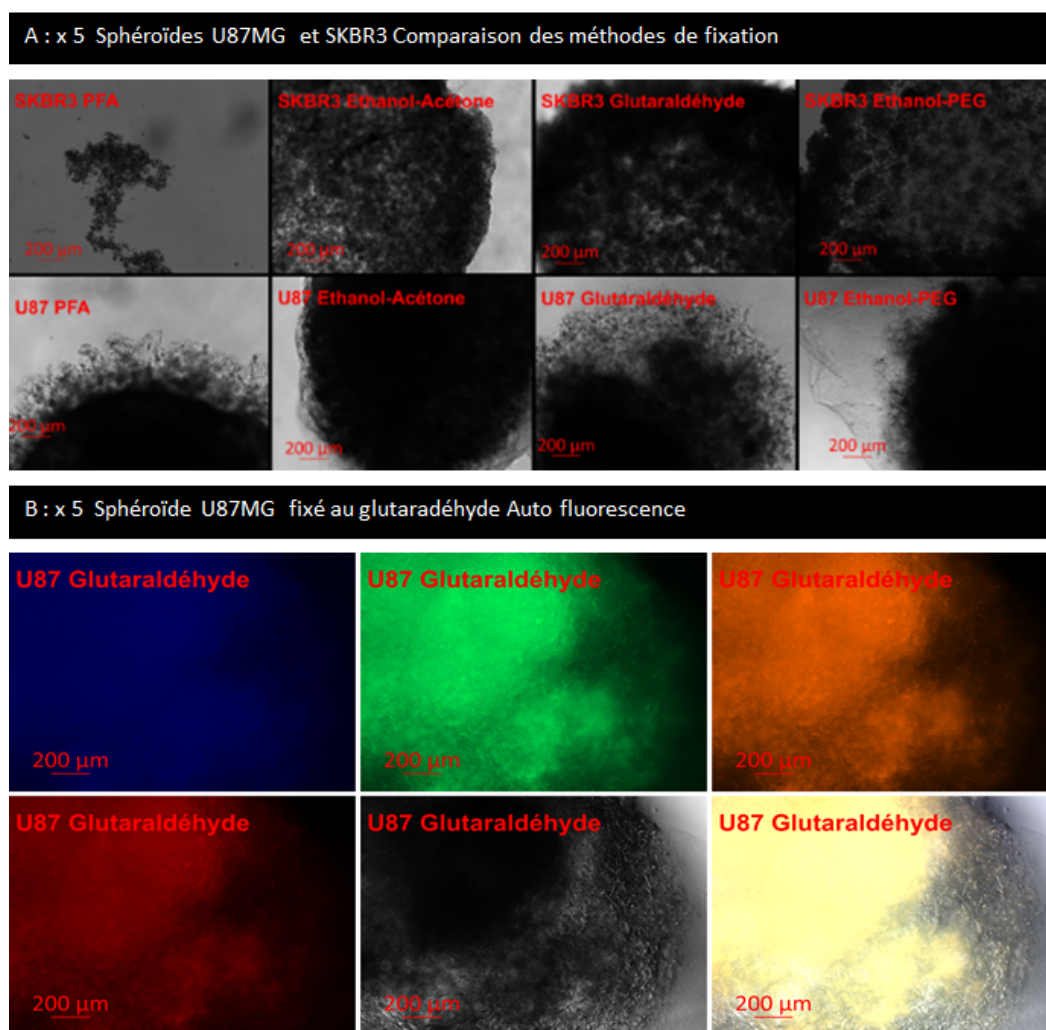


FIG. C.3 – Test de différentes méthodes de fixation de sphéroïdes de cellules U87MG et SKBR3

La Figure C.4 illustre le résultat de l'immunomarquage avec un anticorps ciblant HER2 versus l'anticorps secondaire seul sur un sphéroïde de cellules SKBR3 fixé au glutaraldéhyde. Le bruit de fond important avec le secondaire seul diminue l'intérêt de ce fixateur.

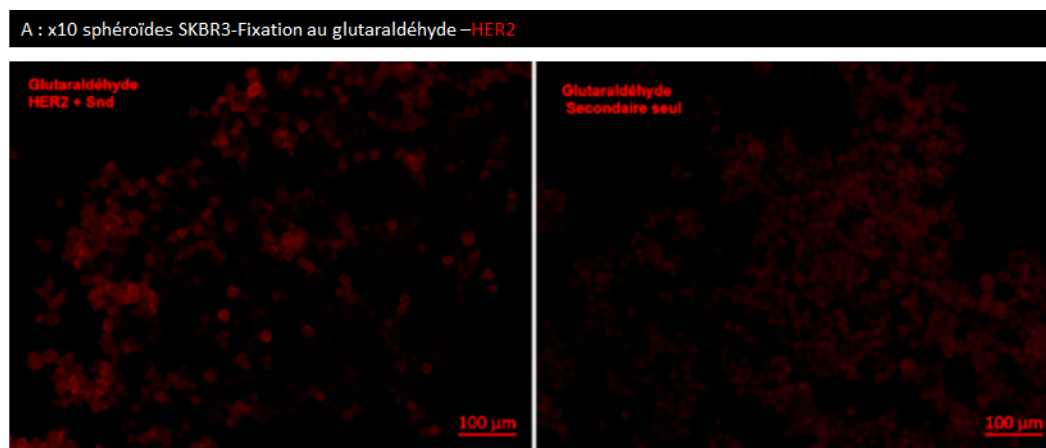


FIG. C.4 – Sphéroïdes de cellules SKBR3 fixés au glutaraldéhyde et immunomarquage avec un anticorps anti-HER2

La Figure C.5 illustre le résultat de l'immunomarquage avec un anticorps HER2 sur un sphéroïde de cellules SKBR3 fixé à l'acétone/éthanol : le signal est intense mais le sphéroïde se délite durant l'immunomarquage.

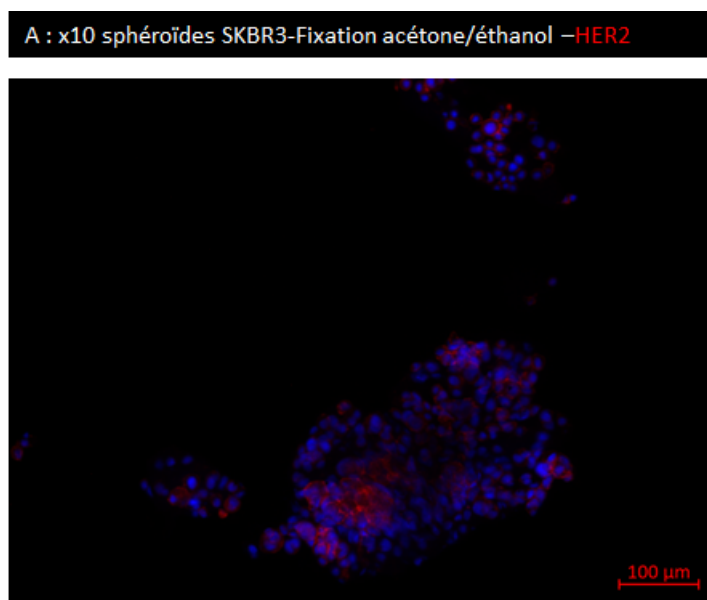


FIG. C.5 – Sphéroïdes de cellules SKBR3 fixés à l'acétone/éthanol, et immunomarquage avec un anticorps anti-HER2

C.4 Cellules hCMEC/D3 sur matrice extracellulaire

Cette étude est présentée au Paragraphe 4.3.1.

La Figure C.6 illustre la croissance des cellules hCMEC/D3 cultivées sur Matrigel™100% durant 3 jours.

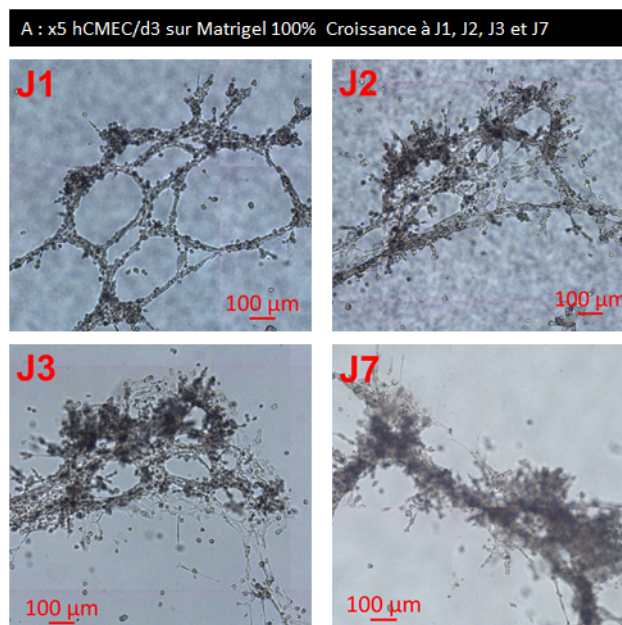


FIG. C.6 – Formation de capillaires par les cellules hCMEC/D3 cultivées sur Matrigel™100%

La Figure C.7 illustre la croissance des cellules hCMEC/D3 cultivées sur Matrigel™ à différentes concentrations, sur une durée de 3 et 7 jours.

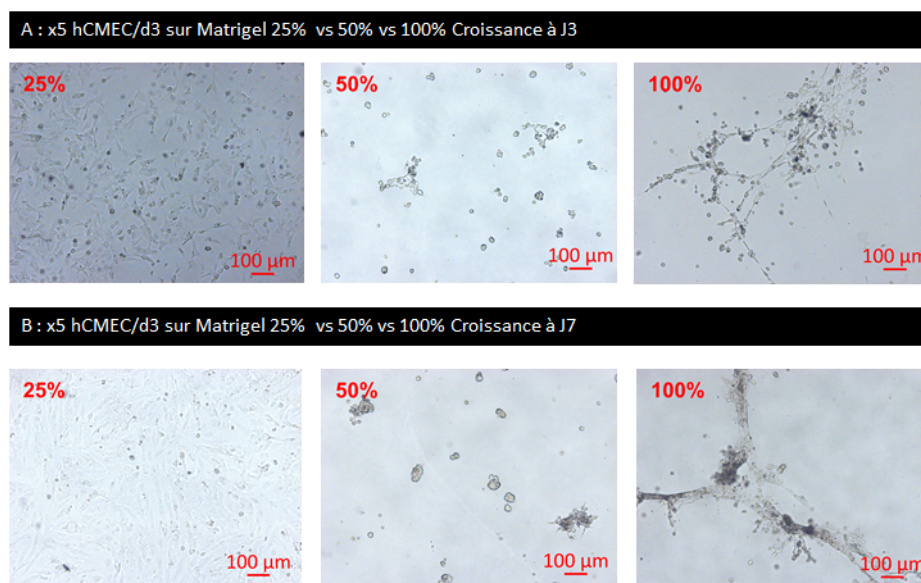


FIG. C.7 – Croissance des cellules hCMEC/D3 cultivées sur Matrigel™ 25, 50 ou 100%

C.5 Modèles bi-cellulaires

Cette étude est présentée au Paragraphe 4.3.

C.5.1 Caractérisation des lignées

Les anticorps utilisés sont référencés en Annexe D.4, et les protocoles utilisés sont référencés en Annexe A.6.2.

La Figure C.8 illustre une partie des immunomarquages réalisés sur des cellules U87MG et hCMEC/D3 fixées après 3 jours de culture cellulaire, inutilisables pour différencier les cellules entre-elles.

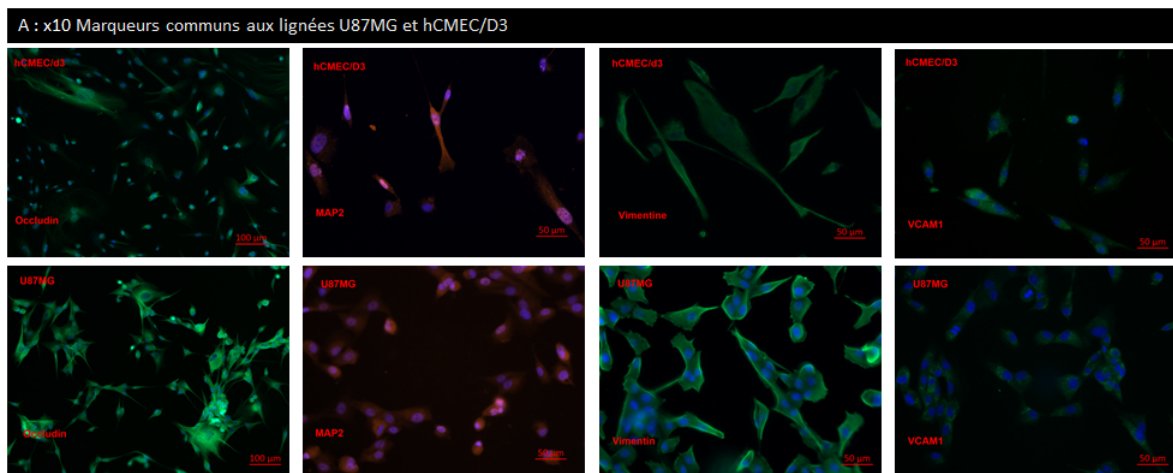


FIG. C.8 – Marqueurs communs des cellules U87MG et hCMEC/D3

C.5.2 Milieux de culture cellulaire

La Figure C.9 montre les numérations réalisées sur les cellules cultivées dans différents milieux de culture, en flacons de culture de 25cm², pendant 3 jours. Les numérations ont été réalisées à partir des suspensions de cellules après trypsination, diluées au 1/2 dans de l'éosine. Le comptage a été effectué manuellement en cellule de Thoma.

Test milieux de culture									
milieu U87MG									
milieu EGM2									
milieu A : 3/4 EGM2+1/4 U87MG									
milieu B : milieu A + 0.1% ac.Hyaluronique + 10mM Hépès									
milieu C : milieu EBM2 3/3 + milieu U87 1/4 + FgF2 20ng/ml + 10mM Hépès									
Cellulesensemencées du vendredi au lundi ou du lundi au jeudi 3e4 cell/ml pour U87MG et 5e4 cell/ml pour Hcmec/D3									
		U87			moyenne	Hcmec/d3			moyenne
milieu Normal	0.605	0.57	0.425	0.53	0.422	0.7	0.64	0.59	
A	0.545	0.48	0.385	0.47	0.335	0.225	0.335	0.30	
B	0.25	0.405	0.29	0.32	0.205	0.14	0.14	0.16	
C	0.485	0.27	0.24	0.33	0.15	0.14	0.2	0.16	

FIG. C.9 – Numération des cellules hCMEC/D3 et U87MG en fonction du milieu de culture

La Figure C.10 montre la croissance des cellules hCMECD/D3 et des U87MG cultivées en milieu C, pendant 10 jours.

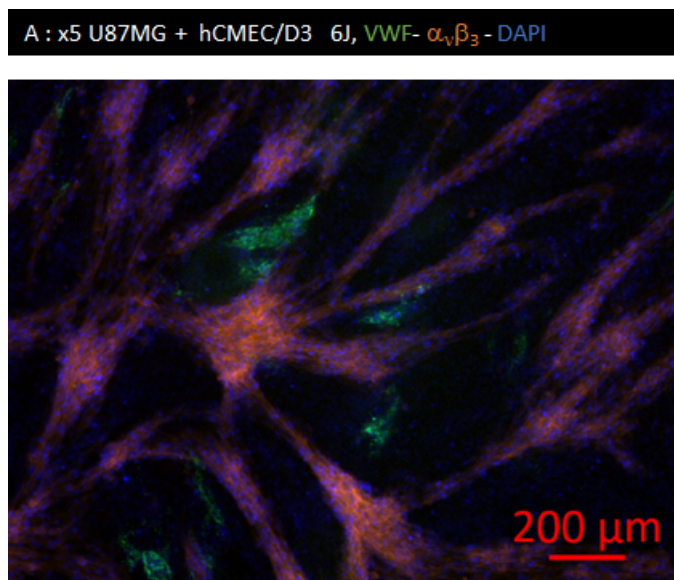


FIG. C.10 – Croissance des cellules hCMEC/D3 et U87MG cultivées en milieu C

C.5.3 Densité d'ensemencement

La Figure C.11 montre que la croissance des cellules U87MG est plus rapide que celle des cellules hCMEC/D3, les U87MG étant largement majoritaires après 9 jours de culture au ratio de 1 : 1.

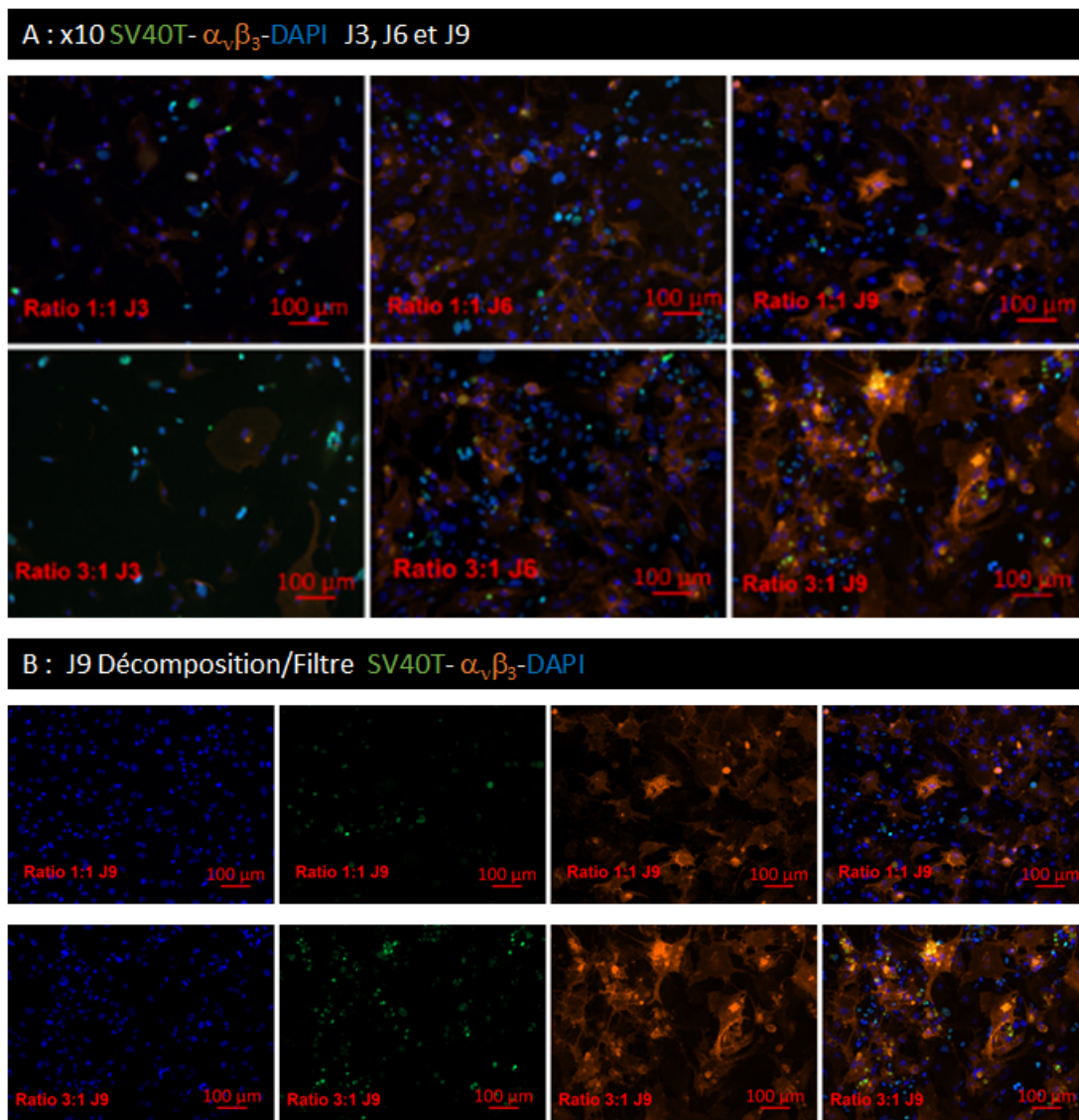


FIG. C.11 – Densité d'ensemencement des cellules U87MG et hCMEC/D3, cinétique de croissance à 3, 6 et 9 jours

C.6 Sphéroïdes bi-cellulaires colorés avec les colorants Vybrant™

Cette étude est présentée au Paragraphe 4.4.

La Figure C.12 montre des sphéroïdes préparés à partir de lignées colorées avec le colorant Vybrant™, en utilisant la méthode MGI, sur Matrigel™.

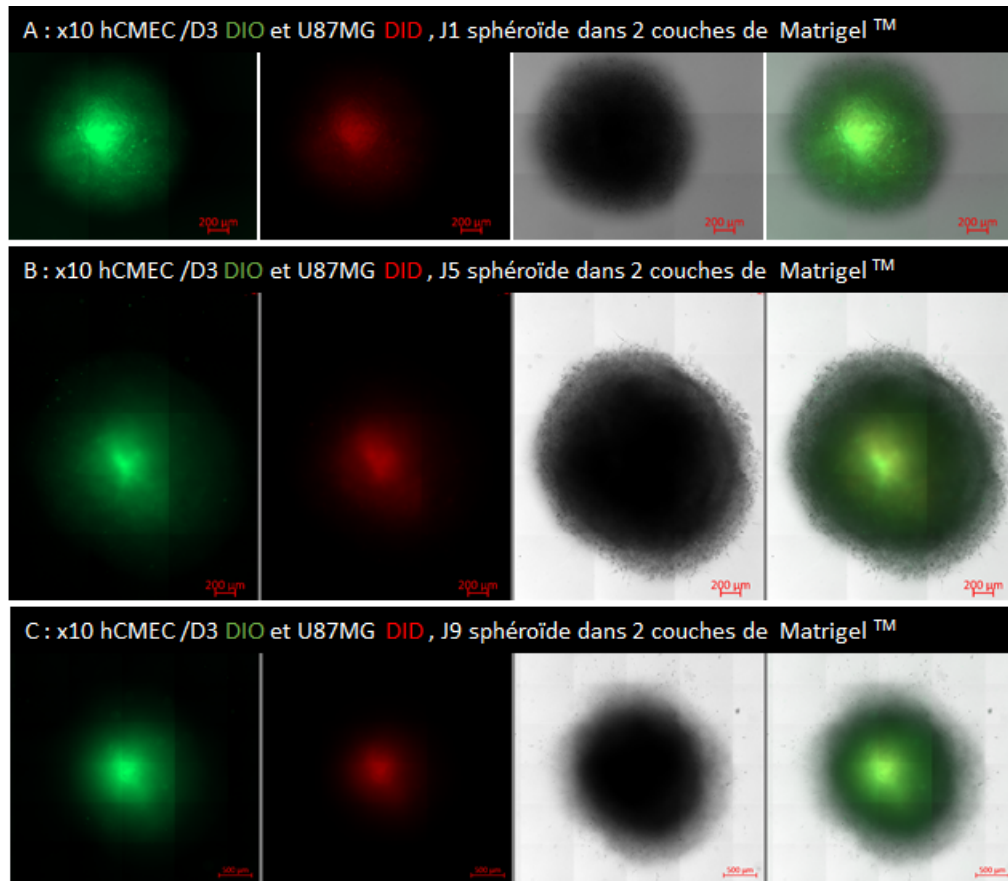


FIG. C.12 – Sphéroïdes de cellules U87MG-DID et hCMEC/D3-DIO en Matrigel™ 15 et 25%

C.7 Sphéroïdes bi-cellulaires fluorescents : milieu A versus milieu B

Cette étude est présentée au Paragraphe 4.5.2.

La Figure C.13 montre des sphéroïdes préparés à partir de lignées OGM U87MG-E2 Crimson et hCMEC/D3-pZgreen, préparé en matériel Cell-Repellent, sous agitation 3 jours puis congelés (Image A). Après décongélation, les sphéroïdes ont été cultivés en Matrigel™ en milieu A ou B, pendant 5 jours (Image B). Les cellules U87MG-E2 Crimson sont très rapidement majoritaires à la couronne.

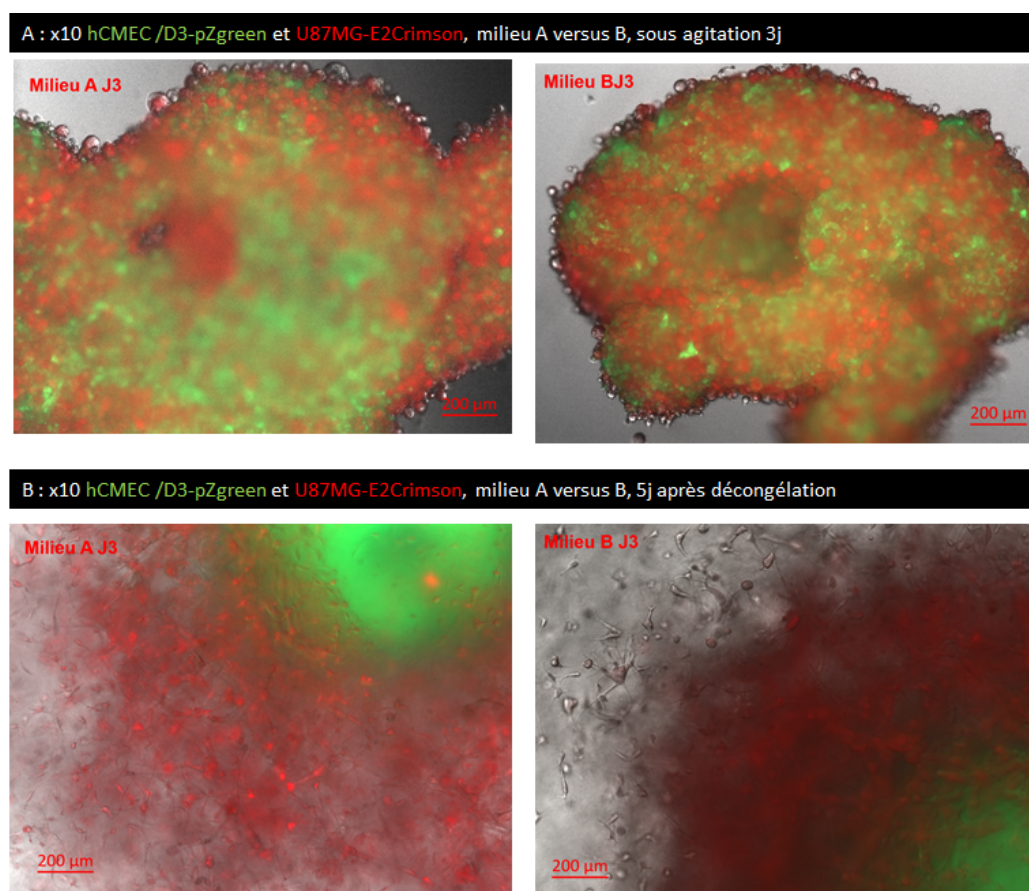


FIG. C.13 – Sphéroïdes de cellules U87MG-E2Crimson et hCMEC/D3-pZgreen préparés sous agitation pendant 3 jours (A), congelés puis décongelés et cultivés en Matrigel™ pendant 3 jours (B)

C.8 Mise en contact des magnétosomes avec les sphéroïdes

Plusieurs cas de figure sont décrits au Chapitre Culture cellulaire 3D (Paragraphe 4.2), ainsi qu'au Chapitre Orano (Paragraphe 3.3.2).

C.8.1 Mefisto : Sphéroïdes en Matrigel™

Les sphéroïdes de cellules U87MG préparés en MGI sont gardés en croissance en plaque 48 puits, sur une couche de Matrigel™. Un premier essai a consisté à incorporer les fluorophores Venus et VenusRGD dans le gel pour voir si le sphéroïde est capable de les absorber. L'imagerie à travers le gel ne donnant pas une bonne résolution, une partie des sphéroïdes a été mis entre lame et lamelle, pour observation au microscope. L' image A de la Figure C.14 montre que l'incorporation après 2 jours est faible, avec des particules qui sont plus engluées dans le gel que rentrées dans les cellules. L'image B montre qu'après 4 jours, l'incorporation dans les cellules est plus nette, mais malheureusement peu reproductible d'un sphéroïde à l'autre.

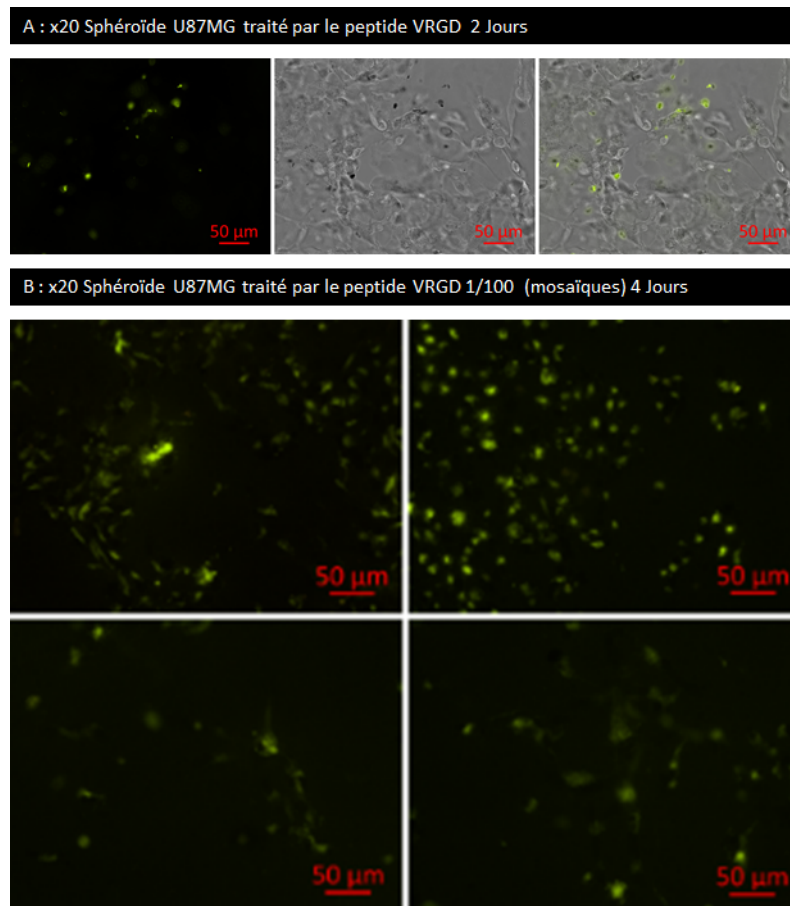


FIG. C.14 – Sphéroïdes monocellulaires U87MG, 2 et 4 jours incubation avec VenusRGD, 0,66 μ g/mL

Orano/Mefisto : Microsphéroïdes sous agitation

Des microsphéroïdes de différents types cellulaires ont été réalisés sous agitation en flacons de culture non adhérents standards ou en matériel Cell-Repellent, puis traités sous agitation avec des magnétosomes AMB1, conjugués ou non, pendant 3 jours éventuellement répétés plusieurs fois. La suspension de sphéroïdes est prélevée, centrifugée puis reprise dans le milieu de culture contenant les magnétosomes à la concentration souhaitée (100, 250, 500 ou 1000 $\mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$), avant d'être de nouveau mise en incubation dans le même type de flacons de culture sous agitation. Après 3 jours d'incubation avec les magnétosomes, les suspensions de sphéroïdes sont de nouveau centrifugées, le culot est repris en milieu de culture et des boîtes à fond de verre sontensemencées, pour 24 heures. Après ce laps de temps, la plupart des sphéroïdes ont adhéré et une fixation au PFA 4% est réalisée.

3D : Sphéroïdes sous agitation en support Cell-Repellent

Les sphéroïdes créés en plaques ou boîtes Cell-Repellent sont suffisamment gros pour pouvoir être prélevés un par un, à la spatule. Chacun d'entre eux est mis en contact avec les magnétosomes dilués dans les milieux de cultures testés, en changeant le sphéroïde de boîte de culture. Les particules en excès peuvent former des agrégats collants au support et il est nécessaire d'utiliser un puits/une boîte neuve à chaque changement de bain si l'on souhaite faire des traitements multiples. Les sphéroïdes sont replacés sous agitation durant 3 jours avant rinçage et fixation, ou bien traités plusieurs fois tous les 3/4 jours.

C.9 Transparency : Protocoles de coloration à la Thioflavine S

Ces protocoles sont présentés au Paragraphe 5.4.

Protocole utilisé sur des coupes de 20 μm :

- 15 min : PBS
- 5 min KMnO_4 0,5%
- 5 min $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 1% + 1% acide oxalique
- 8 min Thioflavine S 0,02%
- Rinçage éthanol 80% x 2
- Rinçage eau x 2

Protocole utilisé sur un hémisphère :

- Décongélation en PBS, puis 2 bains en Tp Borate 0,1M, à +4°C
- 24h Triton 4% en Tp Borate 0,1M, sous agitation, TA
- 3 x10 min en eau, grand volume, sous agitation, TA
- 10 min KMnO_4 0,5% x 12 en changeant de bain, sous agitation, TA
- 1 heure en eau sous agitation, TA
- 10 min KMnO_4 0,5% x 8 en changeant de bain, sous agitation, TA
- 30 min $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 1 + acide oxalique 1% x3 en changeant de bain, sous agitation, TA
- 24h Thioflavine S 0,02% sous agitation, TA
- Rinçage éthanol 80% 10 min x 3, sous agitation, TA
- Rinçage eau 10 min x3, sous agitation, TA
- Transparisation

C.10 Transparency : Protocoles GClear 1 à 6

Ces protocoles sont présentés au Paragraphe 5.3.2.

SOLUTIONS DE CLEARING								
	INGREDIENTS					indice de réfraction	observation	
Cubic 1	25% tetrakis ethylenediamine	25% urée	15% triton			1.4281	cortex clair en 2-3j mais bq plus long pour mat blanche (>3semaines)	
Cubic 2	50% sucrose	25% urée	0,1% triton	10% nitriloethanol		1.4539		
Cubic 2b	50% sucrose	25% urée		10% nitriloethanol		1.4517		
SeeDB 1	fructose 20%	0,5% thioglycérol					ne transparise pas	
SeeDB 2	fructose 40%	0,5% thioglycérol					ne transparise pas	
SeeDB 3	fructose 60%	0,5% thioglycérol					ne transparise pas	
SeeDB 4	fructose 80%	0,5% thioglycérol					ne transparise pas	
SeeDB 5	fructose 100%	0,5% thioglycérol				1.4701	ne transparise pas	
Gclear	glucose 25%	urée 7M	25% glycérol	0,02% azide de sodium		1.4599	long >2 mois	et gonfle beaucoup
Gclear 2	sucrose 25%	urée 7M	25% glycérol	0,02% azide de sodium		1.4609	plus rapide	tres joli ap 3 mois
Gclear 3	fructose 25%	urée 7M	25% glycérol	0,02% azide de sodium		1.4567	entre Gclear et Gclear 2 gonfle moins	
Gclear 4	sucrose 25%	urée 7M	25% Tetrakis	0,02% azide de sodium		1.4623	précipite à TA utilisable à 37°C	ap 3 sem très clair et assez stable au niveau gonflement résultat intéressant ++
Gclear 4b	sucrose 25%	urée 7M	15% Tetrakis	0,02% azide de sodium		1.4496		résultat intéressant +++
Gclear 5	sucrose 25%	urée 7M	12,5% glycérol	0,02% azide de sodium	10% nitriloethanol	1.4571		résultat intéressant ++
Gclear 6b	fructose 25%	urée 7M	20% Tetrakis	0,02% azide de sodium		1.4536		résultat intéressant +++

FIG. C.15 – Solutions de Transparisation GClear 1 à 6

La Figure C.16 illustre l'oxydation qui apparaît avec certaines solutions de transparence, l'échantillon devenant progressivement noir en quelques jours.

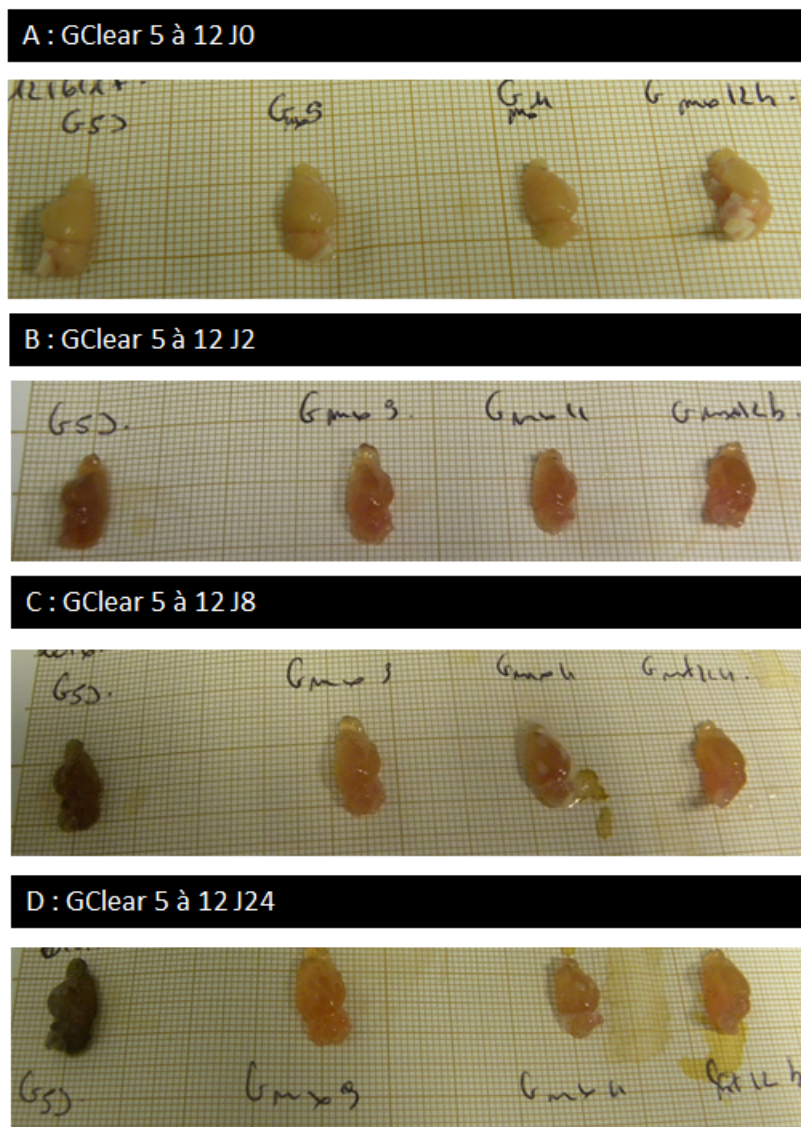


FIG. C.16 – Cerveaux transparisés avec les solutions GClear 5 à 12

La Figure C.17 montre la transparence par la solution GClear sur coupes de 250 μm et test de réversion.

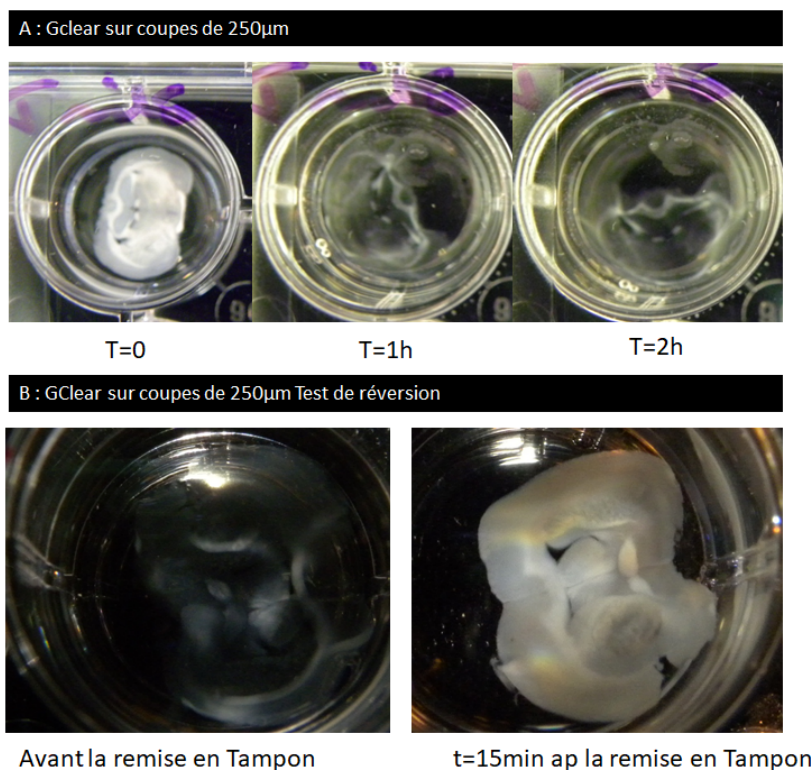


FIG. C.17 – Solutions de transparensation GClear et test de réversion

C.11 Transparency : Préparation GClear17d3

Ce protocole est présenté au Paragraphe 5.3.2.

La préparation de la solution se fait en plusieurs étapes. Certains ingrédients sont préparés en solutions stock x 50 en tampon borate 0,1M, pour une préparation plus rapide de la solution finale :

- Azide de sodium 0,02%
- Acide oxalique 0,025%
- Citrate trisodique 0,1%
- DABCO 0,1%

L'ordre d'incorporation des ingrédients a une incidence sur la dissolution finale : je commence par mettre le sorbitol au fond de la fiole jaugée, puis l'urée et le Nicodenz, en finissant par le sucre. Le sucre se dissolvant facilement contrairement aux autres réactifs, il permet de remplir la fiole avec la solution composée des réactifs liquides mélangés ensemble.

Le glycérol est pesé dans un bécher dans lequel j'ajoute les solutions concentrées (x 50) et un peu de tampon borate 0,1 M. La solution est mélangée à la pipette de 10 mL, afin d'incorporer le glycérol aux autres éléments. Puis ce mélange est ajouté aux poudres dans la fiole jaugée, le bécher est rincé 2 fois en tampon borate, lui aussi ajouté dans la fiole jaugée. Le niveau est ajusté à environ 1 cm en dessous du trait de jauge.

Puis la solution est mise à chauffer à 100°C sous agitation, jusqu'à dissolution complète de l'urée et du Nicodenz. Le volume de la solution chauffée va augmenter (effet de l'urée), le volume final doit être ajusté une fois la solution complètement refroidie.

C.12 Transparency : Perfusion de DIL

Ce protocole est présenté au Paragraphe 5.5. Lors du projet CIACM, une étude de la visualisation de l'arbre vasculaire a été réalisée à partir du colorant DIL, diverses solutions de ce colorant ayant été testées. La méthode la plus intéressante a consisté à perfuser le colorant DIL (solution mère en éthanol 5 mM, diluée au 1/50) après la perfusion de NaCl 0,9% et avant la perfusion de PFA 4%.

La Figure C.18 montre la vascularisation sur des coupes épaisses (250 μm), révélée par une perfusion de DIL.

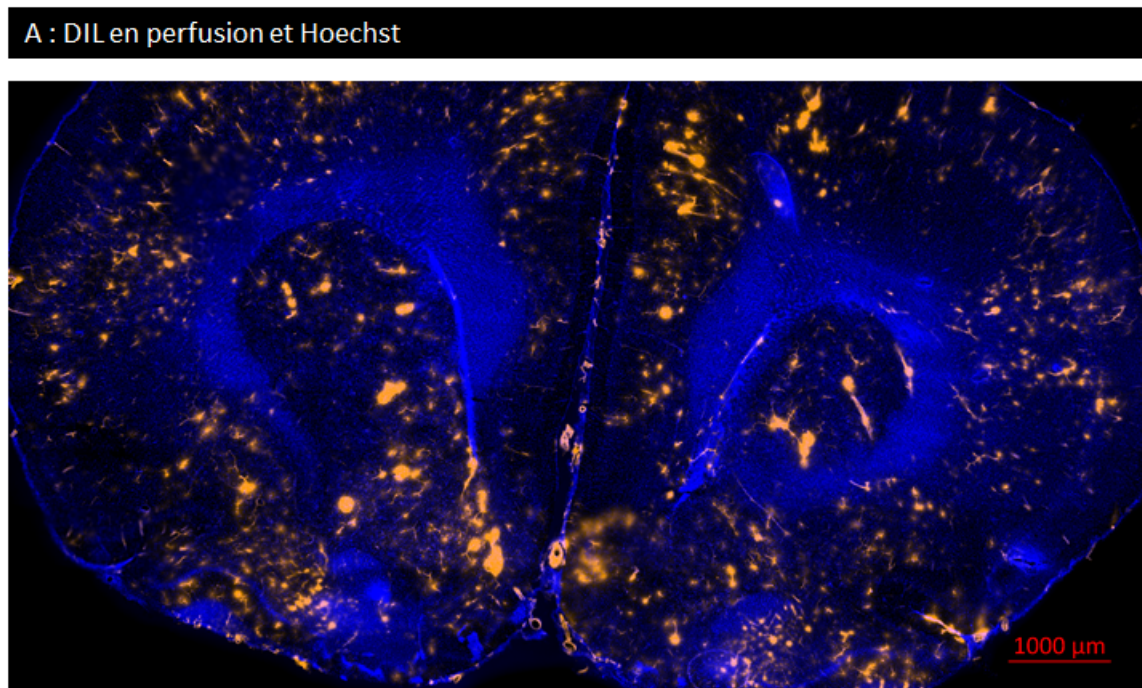


FIG. C.18 – Projet CIACM : perfusion de DIL pour visualiser la vascularisation d'un cerveau de souris

C.13 Transparency : Coloration à la Thioflavine associée à des immunomarquages

Ce protocole est présenté au Paragraphe 5.3.2. La Figure C.13 montre la coloration des plaques amyloïdes par la Thioflavine conjointement avec la révélation par immunomarquages des astrocytes et de la microglies, sur des coupes de cerveaux de souris APP/PS1.

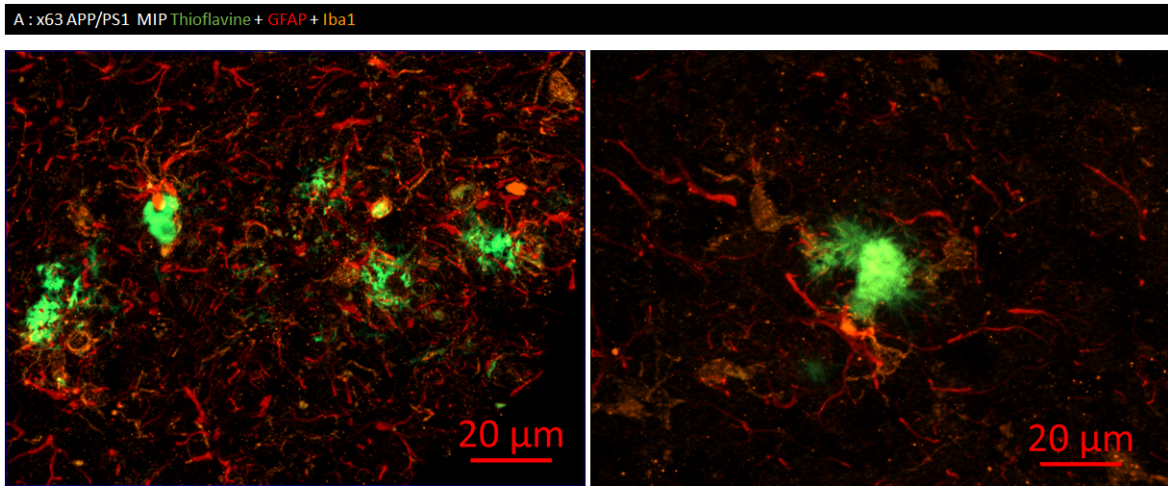


FIG. C.19 – Coloration par laThioflavine et immunomarquages des cellules gliales sur des coupes de cerveaux de souris APP/PS1

C.14 Transparency : Quadruple immunomarquage des neurones

Ce protocole est présenté au Paragraphe 5.1. La Figure C.20 montre la distribution des neurones inhibiteurs (Calrétinine, Calbindin, Parvalbumine) au milieu des neurones exprimant NeuN chez le macaque (Image A), chez la Souris (Image B) et chez le Rat (Image C).

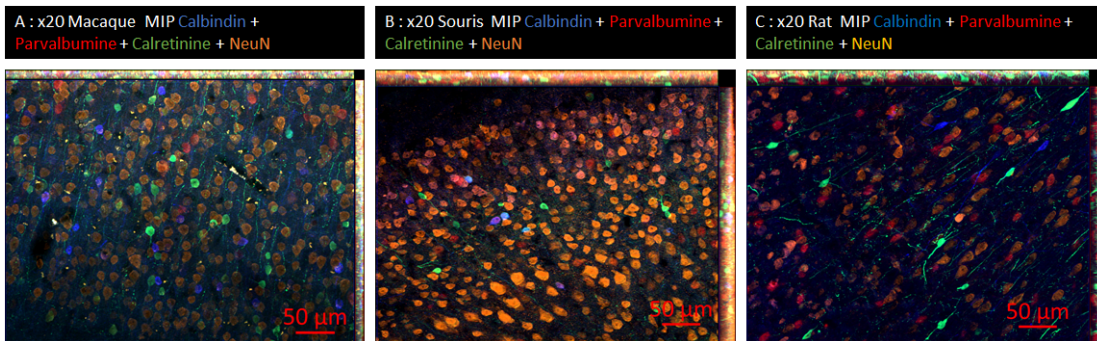


FIG. C.20 – Quadruple immunomarquage des neurones inhibiteurs, sur des coupes de cerveaux de 3 espèces animales : Macaque (A), Souris (B), Rat (C)

Annexe **D**

Annexe Références

- D.1 Références des réactifs chimiques utilisés
- D.2 Références des cellules utilisées
- D.3 Références des réactifs utilisés pour la culture cellulaire
- D.4 Références des anticorps utilisés
- D.5 Animaux utilisés

D.1 Références des réactifs chimiques utilisés

Ces listes se rapportent à l'ensemble des études réalisées.

Produits chimiques hors culture cellulaire			
Produits chimiques	Fournisseur	Référence	Projets
Kit marquage fer	Sigma	HT-20	Mefisto, Orano, 3D
Kit marquage fer	Merck	1.12084.0001	Orano, 3D
Paraformaldéhyde	Sigma	158127	3D, Transparency
Acétone	Sigma	534064	3D, Transparency
PEG	Sigma	309028	3D
Ethanol	Carlo Erba	528131	3D, Transparency
Glutaraldéhyde	Sigma	G6257	3D
β estradiol	Sigma		3D
Vybrand™	ThermoFischer	V22889	3D

FIG. D.1 – Références des produits chimiques

Produits chimiques utilisés pour le projet Transparency uniquement		
Produits chimiques	Fournisseur	Référence
Silicone Solaris	Kaupo	
Silicone Thinner	Kaupo	
Phytigel™	Sigma	P8169
DIL	Sigma	42364
DIO	Sigma	D4292
ANSA	Sigma	10417
Erythrosine B	Sigma	198269
Rhodamine B	Sigma	R6626
Thioflavine S	Sigma	T1892
Tomato Lectine	Eurobio	DL-1178
CF640	Sigma	SCJ4600040
SDS	Sigma	L3771
Fructose	Sigma	F3510
Sucrose	Sigma	S0389
Glucose	Sigma	G8270
Sorbitol	Sigma	S6021
Urée	Sigma	U5378
Glycérol	Sigma	G5516
Gélatine de peau de porc	Sigma	G1890
N-propyl gallate	Sigma	P3130
p-phenylenediamine	Sigma	7963
DABCO	Sigma	D27802
Acide Oxalique	Sigma	241172
Nicodenz™	Proteogenix	AXS-1002424
Azide de sodium	Sigma	438456
Citrate trisodique	Sigma	W302600
Méthyl-β-cyclodextrine	Sigma	779873
γ-cyclodextrine	Sigma	W779547
3-(1-Pyridinio)-1-propanesulfonate	Sigma	82804
sodium lauryl sarcosinate	Sigma	L9150
Plantapon® SUS	BTC	
Triton™ X-100	Sigma	X100
Permanganate de potassium	Sigma	223468
Métabisulfite de potassium	Sigma	1614396
Méthanol	Sigma	32213-M
Agar Low Melt	Roth	6351.5
Poloxamère 407	Sigma	16758
NNNN-Tetrakis (2-hydroxypropyl) ethylenediamine	Sigma	122262
Latex beads, amine-modified polystyrene, fluorescent blue	Sigma	L0280
Latex beads, amine-modified polystyrene, fluorescent yellow-green	Sigma	L1030
Polystyrène beads fluorescent green	ThermoFischer	GB100

FIG. D.2 – Références des produits chimiques pour le projet Transparency

D.2 Références des cellules utilisées

Cette liste se rapporte à l'ensemble des études réalisées quel que soit le projet.

Cellules	Fournisseur	Référence	N°CODECOH
U87MG	ATCC	HTB-14	DC-2019-3725
hCMEC/d3	Don de l'UFR de Tours		
A431	Don de Frédéric Ducongé, MIRCEN		DC-2020-4244
SKBR3			
MCF7			
MDA-MB-231			
MCF12A	ATCC	CRL-10782	DC-2021-4571

FIG. D.3 – Références des lignées cellulaires

D.3 Références des réactifs utilisés pour la culture cellulaire

Cette liste se rapporte à l'ensemble des études réalisées quel que soit le projet.

Réactifs de culture cellulaire					
Milieux de culture	Fournisseur	Référence	Fabriquant	lignées	Projets
DMEM low glucose avec rouge de phénol	Ozyme	12-707F	Lonza	A431, U87-MG	Culture 3D, Mefisto, Orano
DMEM low glucose sans rouge de phénol	Sigma Aldrich	D5921	Sigma Aldrich	A431, U87-MG	Culture 3D, Mefisto, Orano
DMEM/F12 (1:1)	Ozyme	BE04-687F/UI	Lonza	MDA-MB-231, MC-F12a	Orano
EBM2	Lonza	CC-3156	Lonza	hCMEC/d3	Culture 3D
EMEM	Sigma Aldrich	M2279	Sigma Aldrich	MC-F7	Orano
MacCoy's avec rouge de phénol	Ozyme	BE12-688F	Lonza	SKBR3	Orano
MacCoy's sans rouge de phénol	Fisher Scientific	SH30270.01	Cytiva	SKBR3	Orano
Additifs des milieux de culture	Fournisseur	Référence		lignées	Projets
Acides Aminés Non Essentiels (NEAA)	Fisher Scientific	11140-050	Gibco	A431, MC-F7	Orano
EGF	Sigma Aldrich	SRP3027	Sigma Aldrich	MC-F12a	Orano
gentamicine	Ozyme	17-518Z		U87-MG	Culture 3D, Mefisto, Orano
Glucose 10% Solution	Sigma Aldrich	G8644	Sigma Aldrich	A431	Orano
Hydrocortisone	Sigma Aldrich	H0888	Sigma Aldrich	MC-F12a	Orano
Insuline bovine	Fisher Scientific	12585014	Gibco	MC-F12a	Orano
b-estradiol	Fisher Scientific	219456501	MPBiomedicals		
EGM2 SINGLE Quots	Lonza	CC-4147	Lonza	hCMEC/d3	Culture 3D
L-Glutamine	Ozyme	BE17-605E	Lonza	A431, MDA-MB-231, MC-F7, MC-F12a, U87-MG	Culture 3D, Mefisto, Orano
Pénicilline/Streptomycine	Ozyme	DE17-602E	Lonza	Toutes	Culture 3D, Mefisto, Orano
pyruvate	Thermo-Fischer	11360-070	Gibco	A431, MDA-MB-231, U87-MG	Culture 3D, Mefisto, Orano
Sérum de cheval	PAA	B15-023		MC-F12a	Orano
Sérum de veau fœtal	Eurobio	CVFSVF00-01	Eurobio	A431, MDA-MB-231, MC-F7, SKBR3	Orano
Sérum de veau nouveau né	Eurobio	S0750-500	BIOWEST	U87-MG	Culture 3D, Mefisto, Orano
Toxine du cholera	Sigma Aldrich	C8052	Sigma Aldrich	MC-F12a	Orano
divers	Fournisseur	Référence		lignées	Projets
DPBS, sans Ca2+ ni Mg2+	Grosseron	LM-S20411500	Biosera	toutes	Culture 3D, Mefisto, Orano
collagène type I	Sigma Aldrich	C3867	Sigma Aldrich	hCMEC/d3	Culture 3D
Trypsine-versène	Ozyme	BE17-161E	Lonza	toutes	Culture 3D, Mefisto, Orano
Trypsin neutralizing solution	Lonza	CC-5002	Lonza	hCMEC/d3	Culture 3D
Eau stérile	Sigma Aldrich	W3500	Sigma Aldrich	toutes	Culture 3D, Mefisto, Orano
DMSO	Sigma Aldrich	D2650	Sigma Aldrich	toutes	Culture 3D, Mefisto, Orano
Additifs spécifiques à un projet	Fournisseur	Référence		lignées	Projets
Acide hyaluronique	Aromazone			U87-MG, hCMEC/d3	Culture 3D
caseine sodique	Sigma Aldrich	C8654	Sigma Aldrich	U87-MG	Mefisto
citrate trisodium	Sigma Aldrich	W302600	Aldrich	U87-MG	Mefisto
FgF2	Sigma Aldrich	SRP4037	Sigma Aldrich	U87-MG, hCMEC/d3	Culture 3D
HEPES Solution 1M	Thermo-Fischer	15630-056	Gibco	U87-MG, hCMEC/d3	Culture 3D, Mefisto
Matrigel sans rouge de phénol	Dutsher	356237	Corning	U87-MG, SKBR3, hCMEC/d3	Culture 3D, Mefisto, Orano
Réactifs de transfection	Fournisseur	Référence		lignées	Projets
jetOptimus	Ozyme	POL117-07	Polyplus	U87-MG, SKBR3, hCMEC/d3, MDA-MB-231	Culture 3D, Mefisto, Orano
plasmide pZsGreen	Ozyme	632448	Tanaka	SKBR3, hCMEC/d3, MDA-MB-231	Culture 3D, Mefisto, Orano
plasmide pE2 Crimson	Ozyme	632554	Tanaka	U87-MG	Culture 3D, Mefisto, Orano
G418		30-234-CI	Corning	U87-MG, SKBR3, hCMEC/d3, MDA-MB-231	Culture 3D, Mefisto, Orano

FIG. D.4 – Références des réactifs utilisés pour la culture cellulaire

Cette fiche technique de ThermoFisher présente les colorants Vybrant™, utilisés au Paragraphe 4.4 du Projet Culture 3D.



Vybrant™ Cell-Labeling Solutions

Introduction

The highly lipophilic nature of the carbocyanine dyes DiI, CM-DiI, DiO and DiD has often posed an obstacle to uniform cellular labeling in aqueous culture media.¹ This technical difficulty has somewhat limited the use of these tracers in cell-cell fusion,^{2,3} cellular adhesion^{4,5} and migration⁶ applications for which their properties of low cytotoxicity and high resistance to intercellular transfer⁷ make them otherwise ideally suited. The structurally related PKH dyes have been developed and optimized for these applications.^{8,9} However, PKH dye labeling protocols require suspension of cells in an iso-osmotic mannitol loading medium.⁹ Molecular Probes' Vybrant™ DiI cell-labeling solution is a dye delivery solution that can be added directly to normal culture media to uniformly label suspended or attached culture cells. The complementary Vybrant DiO and DiD cell-labeling solutions allow cell populations to be marked in distinctive fluorescent colors for identification after mixing (Figure 1). Cells that have fused or formed stable clusters can be identified by double labeling (Figure 2).

Storage and Handling

Vybrant DiI, CM-DiI, DiO and DiD cell-labeling solutions are supplied in units of 1 mL. The solutions contain 1 mM DiI, DiO or DiD, and have been filtered through 0.2 µm polycarbonate filters. The DiI, CM-DiI and DiD solutions contain ethanol; the DiO solution contains dimethylformamide (DMF). Unused portions that are not required for immediate use should be stored tightly sealed and protected from light at room temperature (V-22885, V-22886, V-22887) or at -20°C (V-22888).

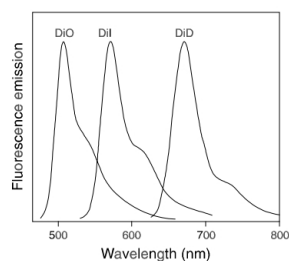


Figure 1. Normalized fluorescence emission spectra of DiO, DiI and DiD bound to phospholipid bilayer membranes.

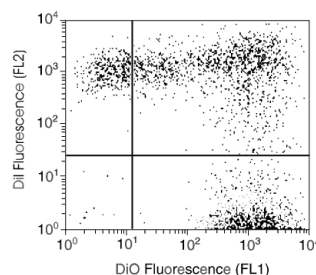


Figure 2. Polyethylene glycol-induced fusion of Jurkat cells detected by flow cytometry. Two populations of Jurkat cells were separately labeled, one with Vybrant DiI cell-labeling solution and the other with Vybrant DiO cell-labeling solution, following the protocols described in this product information sheet. Equal portions (1 mL) of the labeled cell suspensions were combined and treated with polyethylene glycol for 45 seconds to induce fusion. The mixed cell population was analyzed by flow cytometry (Becton-Dickinson FACS Vantage). Double-labeled fused cells appear in the upper right quadrant of this bivariate correlation plot.

Experimental Protocols

Labeling of Cells in Suspension

- 1.1 Suspend cells at a density of 1×10^6 /mL in any chosen serum-free culture medium (note A).
- 1.2 Add 5 µL of the cell-labeling solution supplied per mL of cell suspension. Mix well by gentle pipetting.
- 1.3 Incubate for 1–20 minutes at 37°C. The optimal incubation time will vary depending on cell type. Typical incubation times required to produce uniform staining are shown in Table 1 (note B). For cell types other than those listed, start by incubating for 20 minutes and subsequently optimize as necessary to obtain uniform labeling.
- 1.4 Centrifuge the labeled suspension tubes at 1500 rpm for 5 minutes, preferably at 37°C.
- 1.5 Remove the supernatant and gently resuspend the cells in warm (37°C) medium.
- 1.6 Repeat the wash procedure (1.4 and 1.5) two more times.

1.7 Allow 10 minutes recovery time before proceeding with fluorescence measurements.

Notes

[A] Cell suspension densities $>1 \times 10^7$ /mL or $<1 \times 10^5$ /mL require much longer incubation times for uniform staining to be obtained.

[B] Uniform staining was not obtainable in our tests on certain cell types (e.g. mouse monocyte macrophages and MDCK cells).

Labeling of Adherent Cells

2.1 Culture adherent cells on sterile glass coverslips as either confluent or subconfluent monolayers.

2.2 Remove coverslips from growth medium and gently drain off excess medium by touching the edge of the coverslip with blotting paper. Place coverslip in a humidity chamber.

2.3 Prepare staining medium by adding 5 μ L of the supplied dye labeling solution to 1 mL of normal growth medium.

2.4 Pipet 100 μ L of the staining medium onto the corner of a coverslip and gently agitate until all cells are covered.

2.5 Incubate the coverslip at 37°C. The optimal incubation time will vary depending on the cell type. Incubation times for selected cell types that have been tested in our laboratories are shown in Table 1 (note B). For cell types other than those listed,

Table 1. Optimal incubation times for cell staining with Vybrant DiI cell-labeling solution.

Cell line	Optimal incubation time (minutes) *
Jurkat (human T-cell leukemia)	2 minutes
HeLa (human cervical carcinoma)	8 minutes
P3X (mouse myeloma)	15 minutes
3T3 (mouse fibroblast)	15 minutes

* Cell suspensions (1×10^6 /mL in DMEM or RPMI) were incubated at 37°C with Vybrant DiI cell-labeling solution (1:200 dilution). Optimal staining was qualified by flow cytometry.

References

1. J Cell Biol 103, 171 (1986);
2. J Cell Biol 135, 63 (1996);
3. Cytometry 21, 160 (1995);
4. J Biol Chem 273, 33354 (1998);
5. J Cell Biol 136, 1109 (1997);
6. Anticancer Res 18, 4181 (1998);
7. J Immunol Methods 156, 179 (1992);
8. Methods Cell Biol 33, 469 (1990).

Product List

Current prices may be obtained from our Web site or from our Customer Service Department.

Cat #	Product Name	Unit Size
V-22888	Vybrant™ CM-Dil cell-labeling solution	1 mL
V-22885	Vybrant™ DiI cell-labeling solution	1 mL
V-22886	Vybrant™ DiO cell-labeling solution	1 mL
V-22887	Vybrant™ DiD cell-labeling solution	1 mL
V-22889	Vybrant™ Multicolor Cell-Labeling Kit *DiO, DiI, DiD solutions, 1 mL each	1 kit

Table 2. Spectral characteristics of DiI, DiO and DiD.

Tracer (Catalog #)	Abs * (nm)	Em * (nm)	Optical Filters †	
			Omega	Chroma
DiI (V-22885)	549	565	XF32	31002
DiO (V-22886)	484	501	XF23	31001
DiD (V-22887)	644	665	XF47	31023
CM-DiI (V-22888)	553	570	XF32	31002

* Absorption and fluorescence Emission maxima determined in methanol. Values for membrane-bound tracers are similar. † Catalog numbers of bandpass filter sets recommended for fluorescence imaging. Omega® filters are supplied by Omega Optical, Inc. (www.omegafilters.com). Chroma filters are supplied by Chroma Technology Corp. (www.chroma.com).

start by incubating for 20 minutes and subsequently optimize as necessary to obtain uniform labeling.

2.6 Drain off the staining medium and wash the coverslips three times. For each wash cycle, cover the cells with fresh, warmed growth medium, incubate for 10 minutes and then drain off the medium.

Detection Configurations

Microscopy

Filter sets for detection of DiI, DiO and DiD are selected based on their spectral characteristics, as summarized in Table 2. Multiband filter sets are available for simultaneous detection of multiple tracers as follows:

- DiI and DiO = Omega XF52, Chroma 51004
- DiI and DiD = Omega XF92, Chroma 51007
- DiI, DiO and DiD = Omega XF93, Chroma 61005

Omega® filters are supplied by Omega Optical, Inc. (www.omegafilters.com). Chroma filters are supplied by Chroma Technology Corp. (www.chroma.com).

Flow Cytometry

Cells labeled with DiI, DiO and DiD can be analyzed using the conventional FL2, FL1 and FL3 flow cytometer detection channels, respectively.

D.4 Références des anticorps utilisés

Cette liste se rapporte à l'ensemble des études réalisées quel que soit le projet.

Anticorps Primaires						
Cible	Hôte	Espèce réactive	Conjugaison	Fournisseur	Référence	Projets
$\alpha v\beta 3$	Souris	Humain	PE	Millipore	MAB1976H	Mefisto, Culture 3D
$\alpha v\beta 3$	Souris	Humain	Alexa488	Millipore	MAB1976X	Culture 3D
AMB1	Lapin	Bactérie AMB1	non couplé	CEA	-	Mefisto, Orano, Culture et Histo 3D
BCRP	Rat	Humain, Souris	non couplé	AbCam	ab24115	Mefisto
Calbindin	Lapin	Macaque	non couplé	Swant	CB38	Histo 3D
Calretinin	Chèvre	Macaque	non couplé	Swant	CG1	Histo 3D
Caspase3 activée	Lapin	Humain, Souris, Rat ...	non couplé	AbCam	ab13847	Mefisto
CD31	Rat	Souris	non couplé	BioRad	MCA2388	Mefisto
CD31	Rat	Humain, Souris	A488	Biotechne	NB600-1475	Culture 3D
CD68	Rat	Souris	non couplé	BioRad	MCA1957	Mefisto
CD133	Souris	Souris	A488	Clinisciences	CCS001-AF488	Mefisto
Claudin V	Souris	Souris	non couplé	Thermo-Fischer	35-2500	Culture 3D
GFAP	Poulet	Humain, Souris, Rat ...	non couplé	AbCam	ab4674	Mefisto, Histo 3D
GFP	Poulet	-	non couplé	AbCam	ab13970	Mefisto
HER2	Lapin	humain	non couplé	Cell Signaling	92020	Orano
HER2		humain	non couplé	R&D	MAB9589	Orano
Iba1	Chèvre	Humain, Souris, Rat ...	non couplé	AbCam	ab107159	Mefisto, Histo 3D
IDH1	Rat	souris	non couplé	AbCam	ab256557	Mefisto
Ki67	Lapin	Humain, Souris, Rat ...	non couplé	AbCam	ab16667	Culture 3D
MAP-2	Poulet	Humain, Souris, Rat ...	non couplé	AbCam	ab5392	Histo 3D
Myéline	Rat	Humain, Souris, Rat ...	non couplé	AbCam	ab734992406	Histo 3D
Nestin	Poulet	souris (humain*)	non couplé	AbCam	ab134017	Mefisto
Nestin	Souris	humain	A488			Mefisto
NF	Poulet	Humain, Souris, Rat	non couplé	AbCam	ab4680	Histo 3D
Occludin	Lapin	humain	non couplé	AbCam	ab31721	Culture 3D
Parvalbumine	Guinée Pig	Macaque	non couplé	Swant	GP72	Histo 3D
RIP3	Lapin	Humain, Souris, Rat	non couplé	AbCam	ab62344	Mefisto
S1004a	Chèvre	Humain	non couplé	Thermo-Fischer	PA518601	Mefisto
Sox2	Lapin	Humain, Souris, Rat	non couplé	AbCam	ab97959	Mefisto
Sox2	Chèvre	Humain	non couplé	AbCam	ab110145	Mefisto
SV40T	Souris	-	non couplé	AbCam	ab16879	Culture 3D
Trastuzumab	Lapin	-	non couplé	R&D	MAB95471	Orano
Trastuzumab	Souris	-	non couplé	R&D	MAB9547	Orano
Tubuline	Lapin	Rat, humain, souris	non couplé	AbCam	ab18207	Histo 3D
Vimentine	Lapin	Rat, humain, souris	non couplé	AbCam	ab92547	Mefisto, Culture 3D
Vimentine		Humain	non couplé			Mefisto, Culture 3D
Von Willebrand Factor	Lapin	Humain, Rat	non couplé	AbCam	ab6994	Culture 3D

* anticorps non garanti pour cette espèce mais présence d'une réaction croisée même faible

FIG. D.7 – Références des Anticorps Primaires

Anticorps Secondaires				
Cible	Hôte	Conjugaison	Fournisseur	Référence
Lapin	Âne	Alexa350	ThermoFischer	A10039
Lapin	Âne	Alexa488	AbCam	ab150065
Lapin	Âne	Alexa594	AbCam	ab150064
Lapin	Âne	Alexa647	AbCam	ab150067
Chèvre	Âne	Alexa488	AbCam	ab150137
Chèvre	Âne	Alexa594	AbCam	ab150136
Chèvre	Âne	Alexa647	AbCam	ab150135
Souris	Âne	Alexa488	AbCam	ab150109
Souris	Âne	Alexa594	AbCam	ab150112
Souris	Âne	Alexa647	AbCam	ab150111
Rat	Âne	Alexa488	AbCam	ab150153
Rat	Âne	Alexa594	AbCam	ab150156
Rat	Âne	Alexa647	AbCam	ab150151
Poulet	Âne	Cy3	Millipore	AP194C
Poulet	Âne	Alexa488	Jackson	703-545-155
Guinea Pig	Âne	Alexa488	Jackson	706-545-148
Guinea Pig	Âne	Alexa647	Jackson	706-605-148

FIG. D.8 – Références des Anticorps Secondaires

D.5 Animaux utilisés

- Souris NMRI nude mâles de l'éleveur Janvier (projet Mefisto).
- Souris NMRI nude femelles de l'éleveur Janvier (projet Orano).
- Souris C57Bl6 mâles et femelles de l'élevage de NeuroSpin (Souris APP/PS1 +/+ et -/-) (projet Transparency).
- Rats Fischer mâles et femelles de l'élevage de NeuroSpin (Projet Transparency).
- Souris toutes souches, mâles et femelles, de récupération d'autres projets (projet Transparency).

Liste des abréviations, des sigles et des symboles

ABC ATP-binding cassette

AMB-1 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1

AMB1-TzTCMC Magnétosomes AMB-1 fonctionnalisés avec l'anticorps Trastuzumab et le TCMC

AMB1-V Magnétosomes AMB-1 fonctionnalisés uniquement avec Venus

AMB1-VRGD Magnétosomes AMB-1 fonctionnalisés avec Venus et RGD

AMB1-WT Magnétosomes AMB-1 non fonctionnalisés, dits Wild Type

ANR Agence Nationale de la Recherche

ANSA 8-Anilino-1-naphthalenesulfonic acid

BABB Benzyl Alcohol Benzyl Benzoate

BAOBAB Building large instruments for neuroimaging : from population imaging to ultra-high magnetic fields

BCRP Breast Cancer Resistance Protein

BHE Barrière Hémato-Encéphalique

BIAM Institut de Biosciences et Biotechnologies d'Aix-Marseille

BOLD Blood Oxygenation Level Dependent

BSA Bovine Serum Albumin

CB Calbindin

CEA Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives

CEST Chemical Exchange Saturation Transfert

CIEL Cerebral Imaging and Engineering Laboratory

CNAM Centre National des Arts et Métiers

CR Calretinine

CRO Contract Research Organization
CSC Cancer Stem Cell
DABCO 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane
DIL 1, 1'-dioctadecyl-3, 3, 3', 3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate
DIPG Diffuse Intrinsic Pontine Glioma
DMEM Dulbecco's Modified Elementary Medium
DRF Direction de la Recherche Fondamentale
DUT Diplôme Universitaire de Technologie
EMT Epithelial-Mesenchymal Transition
EPR Enhanced Permeability and Retention Effect
ER Estrogen Receptor
GBM Glioblastome Multiforme
GFAP Glial Fibrillary Acidic Protein
GFP Green Fluorescent Protein
GIN-IMN Groupe d'Imagerie Neurofonctionnelle
HER2 Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HER2 Human Epidermal Growth Factor Receptor-2
hTERT human Telomerase Reverse Transcriptase protein
Iba1 Ionized calcium-binding adaptor molecule 1
ICC Immunocytochimie
ICP Inductively Coupled Plasma
IDH1 Isocitrate DésHydrogénase 1
Institut Joliot Institut des Sciences du Vivant Frédéric Joliot
IRM Imagerie par Résonance Magnétique
LBI Laboratoire de Biologie Intégrée
MEM Laboratoire de microbiologie Environnementale et Moléculaire
MGI Méthode dite des gouttes inversées
MIDAS Molecular Imaging and Delivery of Active Substances
MIND Models and Inference for Neuroimaging Data
MIP Maximum Intensity Projection
MRP1 Multidrug Resistance 1
MSME Multi-slice Multi-echo

MTB Magnetotactic Bacteria
MV-1 *Magnetovibrio blakemorei* MV-1
NADP nicotinamide adémine dinucléotide phosphate
NPs Nano Particules
NSC Neural Stem Cell
PE Phycoérytrine
PgP P-glycoProtein
PR Progesteron Receptor
PV Parvalbumine
RGD Peptide composé de trois acides aminés : Arginine, Glycine et Acide aspartique
RMN Résonance Magnétique Nucléaire
SDS Sodium DodecylSulfate
SH Sérum de Cheval
SIM Structured Illumination Microscopy
Sox2 (Sex determining region Y)-box2
SPION SuperParamagnetic Iron Oxyde Nanoparticle
SV40T Simian Vacuolating Virus 40 TAg
SVF Sérum de veau foetal
SVNN Sérum de veau nouveau né
T Tesla, unité de mesure de l'intensité d'un champ magnétique
TAMs Tumor Associated Macrophages
TCMC 2-(4-isothiocyanatobenzyl)-1,4,7,10-tetraaza-1,4,7,10-tetra-(2-carbamoylmethyl)cyclododecane
TE Temps d'écho
THF Tetrahydrofurane
TNBC Triple Negative Breast Cancer
TNS Trypsin Neutrilizing Solution
TR Temps de répétition
U87MG U87MG pour Uppsala 87 Malignant Glioma
UII Urotensine II
UNATI Unité d'Analyse et Traitement de l'Information
UNIACT Unité de NeuroImagerie Appllicative Clinique et Translationnelle
UNICOG Unité de Neurosciences Cognitives

UNIRS Unité d'Imagerie par Résonance Magnétique à très haut champ et de Spectroscopie

VAE Validation des Acquis de l'Expérience

VEGF Vascular Endothelial Grow Factor

WGA Wheat Germ Agglutinin

Bibliographie

- [Agarwal *et al.*, 2011] AGARWAL, S., HARTZ, A. M., ELMQUIST, W. F. et BAUER, B. (2011). Breast Cancer Resistance Protein and P-glycoprotein in Brain Cancer : Two Gatekeepers Team Up. *Current Pharmaceutical Design*, 17(26):2793–2802. [Cité page 61.](#)
- [Ahir *et al.*, 2020] AHIR, B. K., ENGELHARD, H. H. et LAKKA, S. S. (2020). Tumor Development and Angiogenesis in Adult Brain Tumor : Glioblastoma. *Molecular Neurobiology*, 57(5):2461–2478. [Cité page 11.](#)
- [Akbari-Karadeh *et al.*, 2020] AKBARI-KARADEH, S., AGHAMIRI, S. M. R., TAJER-MOHAMMAD-GHAZVINI, P. et GHORBANZADEH-MASHKANI, S. (2020). Radiolabeling of Biogenic Magnetic Nanoparticles with Rhenium-188 as a Novel Agent for Targeted Radiotherapy. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 190(2):540–550. [Cité page 80.](#)
- [Al Faruque *et al.*, 2020] AL FARUQUE, H., CHOI, E.-S., LEE, H.-R., KIM, J.-H., PARK, S. et KIM, E. (2020). Targeted removal of leukemia cells from the circulating system by whole-body magnetic hyperthermia in mice. *Nanoscale*, 12(4):2773–2786. [Cité page 17.](#)
- [Alphandéry *et al.*, 2013] ALPHANDÉRY, E., CHEBBI, I., GUYOT, F. et DURAND-DUBIEF, M. (2013). Use of bacterial magnetosomes in the magnetic hyperthermia treatment of tumours : a review. *International Journal of Hyperthermia : The Official Journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group*, 29(8):801–809. [Cité page 17.](#)
- [Al-Zeheimi et Adham, 2020] AL-ZEHEIMI, N. et ADHAM, S. A. (2020). Modeling Neoadjuvant chemotherapy resistance in vitro increased NRP-1 and HER2 expression and converted MCF7 breast cancer subtype. *British Journal of Pharmacology*, 177(9):2024–2041. [Cité page 79.](#)
- [Amin et Paşca, 2018] AMIN, N. D. et PAŞCA, S. P. (2018). Building Models of Brain Disorders with Three-Dimensional Organoids. *Neuron*, 100(2):389–405. [Cité page 123.](#)
- [Andrieux et Couvreur, 2009] ANDRIEUX, K. et COUVREUR, P. (2009). Polyalkylcyanoacrylate nanoparticles for delivery of drugs across the blood–brain barrier. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 1(5):463–474. [_eprint : https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/wnan.5.](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/wnan.5) [Cité page 41.](#)
- [Annovazzi *et al.*, 2011] ANNOVAZZI, L., MELLAI, M., CALDERA, V., VALENTE, G. et SCHIFFER, D. (2011). SOX2 Expression and Amplification in Gliomas and Glioma Cell Lines. *Cancer Genomics & Proteomics*, 8(3):139–147. Publisher : International Institute of Anticancer Research. [Cité page 60.](#)

- [Ariel, 2017] ARIEL, P. (2017). A beginner's guide to tissue clearing. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 84:35–39. [Cité page 172.](#)
- [Azzarelli, 2020] AZZARELLI, R. (2020). Organoid Models of Glioblastoma to Study Brain Tumor Stem Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8:220. [Cité page 123.](#)
- [Bai *et al.*, 2021] BAI, X., LIN, X., SONG, J., CHANG, J.-h., HAN, L.-l. et FAN, C. (2021). Incidence of central nervous system metastases in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer treated with trastuzumab : A meta-analysis. *Clinics*, 76:e2653. [Cité page 79.](#)
- [Bakir *et al.*, 2020] BAKIR, B., CHIARELLA, A. M., PITARRESI, J. R. et RUSTGI, A. K. (2020). EMT, MET, plasticity and tumor metastasis. *Trends in cell biology*, 30(10):764–776. [Cité page 62.](#)
- [Barrière *et al.*, 2019] BARRIÈRE, D. A., MAGALHÃES, R., NOVAIS, A., MARQUES, P., SELINGUE, E., GEFFROY, F., MARQUES, F., CERQUEIRA, J., SOUSA, J. C., BOUMEZBEUR, F., BOTTLAENDER, M., JAY, T. M., CACHIA, A., SOUSA, N. et MÉRIAUX, S. (2019). The SIGMA rat brain templates and atlases for multimodal MRI data analysis and visualization. *Nature Communications*, 10(1):5699. [Cité page 5.](#)
- [Bazylnski *et al.*, 1994] BAZYLINSKI, D. A., GARRATT-REED, A. J. et FRANKEL, R. B. (1994). Electron microscopic studies of magnetosomes in magnetotactic bacteria. *Microscopy Research and Technique*, 27(5):389–401. [Cité page 16.](#)
- [Becker *et al.*, 2012] BECKER, K., JÄHRLING, N., SAGHAFI, S., WEILER, R. et DODT, H.-U. (2012). Chemical Clearing and Dehydration of GFP Expressing Mouse Brains. *PLoS ONE*, 7(3):e33916. [2 citations pages 172 and 173.](#)
- [Bellini, 1963] BELLINI, D. S. (1963). SU DI UN PARTICOLARE COMPORTAMENTO DI BATTERI D'ACQUA DOLCE. page 5. [Cité page 15.](#)
- [Benoit *et al.*, 2009] BENOIT, M. R., MAYER, D., BARAK, Y., CHEN, I. Y., HU, W., CHENG, Z., WANG, S. X., SPIELMAN, D. M., GAMBHIR, S. S. et MATIN, A. (2009). Visualizing Implanted Tumors in Mice with Magnetic Resonance Imaging Using Magnetotactic Bacteria. *Clinical Cancer Research*, 15(16):5170–5177. Publisher : American Association for Cancer Research Section : Imaging, Diagnosis, Prognosis. [Cité page 18.](#)
- [Beuzeboc *et al.*, 1999] BEUZEBOC, P., SCHOLL, S., GARAU, X. S., VINCENT-SALOMON, A., CREMOUX, P. D., COUTURIER, J., PALANGIÉ, T. et POUILLART, P. (1999). [Herceptin, a monoclonal humanized antibody anti-HER2 : a major therapeutic progress in breast cancers overexpressing this oncogene?]. *Bulletin Du Cancer*, 86(6):544–549. [Cité page 79.](#)
- [Bhadriraju et Chen, 2002] BHADRIRAJU, K. et CHEN, C. S. (2002). Engineering cellular microenvironments to improve cell-based drug testing. *Drug Discovery Today*, 7(11):612–620. [Cité page 122.](#)
- [Bissell et Hines, 2011] BISSELL, M. J. et HINES, W. C. (2011). Why don't we get more cancer ? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nature Medicine*, 17(3):320–329. Number : 3 Publisher : Nature Publishing Group. [Cité page 122.](#)
- [Blakemore, 1982] BLAKEMORE, R. P. (1982). Magnetotactic Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 36(1):217–238. Publisher : Annual Reviews. [Cité page 16.](#)

- [Blakemore *et al.*, 1979] BLAKEMORE, R. P., MARATEA, D. et WOLFE, R. S. (1979). Isolation and pure culture of a freshwater magnetic spirillum in chemically defined medium. *Journal of Bacteriology*, 140(2):720–729. [2 citations pages 15 and 17.](#)
- [Boku, 2014] BOKU, N. (2014). HER2-positive gastric cancer. *Gastric Cancer*, 17(1):1. Publisher : Springer. [Cité page 78.](#)
- [Boucher, 2016] BOUCHER, M. (2016). *Magnetosomes used as biogenic MRI contrast agent for molecular imaging of glioblastoma model - TEL - Thèses en ligne*. Thèse de doctorat, {Universit{\`e} Paris Saclay (COMUE)}}. [2 citations pages 40 and 43.](#)
- [Boucher *et al.*, 2015a] BOUCHER, M., GEFFROY, F., GINET, N., PREVERAL, S., BELLANGER, L., ADRYANCZYK-PERRIER, G., PÉAN, M., LEFÈVRE, C. T., GARCIA, D., PIGNOL, D. et MÉRIAUX, S. (2015a). Genetically functionalized magnetosomes used as {MRI} probe for molecular imaging of {U}87 tumor. Grenoble, France. [Cité page 6.](#)
- [Boucher *et al.*, 2017a] BOUCHER, M., GEFFROY, F., PREVERAL, S., BELLANGER, L., SELINGUE, E., ADRYANCZYK-PERRIER, G., PÉAN, M., LEFÈVRE, C. T., PIGNOL, D., GINET, N. et MÉRIAUX, S. (2017a). Genetically tailored magnetosomes used as {MRI} probe for molecular imaging of brain tumor. Athens Greece. [Cité page 6.](#)
- [Boucher *et al.*, 2017b] BOUCHER, M., GEFFROY, F., PRÉVÉRAL, S., BELLANGER, L., SELINGUE, E., ADRYANCZYK-PERRIER, G., PÉAN, M., LEFÈVRE, C. T., PIGNOL, D., GINET, N. et MÉRIAUX, S. (2017b). Genetically tailored magnetosomes used as MRI probe for molecular imaging of brain tumor. *Biomaterials*, 121:167–178. [5 citations pages 6, 19, 40, 41, and 45.](#)
- [Boucher *et al.*, 2016a] BOUCHER, M., GEFFROY, F., SELINGUE, E., GINET, N., PREVERAL, S., ADRYANCZYK-PERRIER, G., PÉAN, M., LEFÈVRE, C. T., GARCIA, D., PIGNOL, D. et MÉRIAUX, S. (2016a). Multi-injection of {RGD} functionalized magnetosomes to improve in vivo iron uptake by {U87} brain tumor. New York, USA. [Cité page 6.](#)
- [Boucher *et al.*, 2016b] BOUCHER, M., GEFFROY, F., SELINGUE, E., GINET, N., PREVERAL, S., BELLANGER, L., ADRYANCZYK-PERRIER, G., PÉAN, M., LEFÈVRE, C. T., GARCIA, D., PIGNOL, D. et MÉRIAUX, S. (2016b). Genetically functionalized magnetosomes used as {MRI} contrast agent for in vivo molecular imaging of brain tumor in U87 mice. Carry-le-Rouet, France. [Cité page 6.](#)
- [Boucher *et al.*, 2014] BOUCHER, M., GINET, N., GEFFROY, F., PREVERAL, S., ADRYANCZYK-PERRIER, PÉAN, M., LEFÈVRE, C. T., GARCIA, D., PIGNOL, D. et MÉRIAUX, S. (2014). Genetically functionalized {RGD}-magnetosome as {MRI} contrast agent : in vitro proof of binding. Seoul, South Korea. [2 citations pages 6 and 19.](#)
- [Boucher *et al.*, 2015b] BOUCHER, M., GINET, N., GEFFROY, F., PREVERAL, S., ADRYANCZYK-PERRIER, G., PÉAN, M., LEFÈVRE, C. T., GARCIA, D., PIGNOL, D. et MÉRIAUX, S. (2015b). Genetically functionalized magnetosomes as {MRI} contrast agent suitable for molecular imaging. Toronto, Canada. [Cité page 6.](#)
- [Bourne *et al.*, 2010] BOURNE, T. D., ELIAS, W. J., LOPES, M. B. S. et MANDELL, J. W. (2010). WT1 Is Not a Reliable Marker to Distinguish Reactive from Neoplastic Astrocyte Populations in the Central Nervous System. *Brain Pathology*, 20(6):1090–1095. [Cité page 12.](#)

- [Bradlaw, 1986] BRADLAW, J. A. (1986). Evaluation of drug and chemical toxicity with cell culture systems. *Fundamental and Applied Toxicology : Official Journal of the Society of Toxicology*, 6(4):598–606. [Cité page 122.](#)
- [Bralten *et al.*, 2011] BRALTEN, L. B. C., KLOOSTERHOF, N. K., BALVERS, R., SACCHETTI, A., LAPRE, L., LAMFERS, M., LEENSTRA, S., de JONGE, H., KROS, J. M., JANSSEN, E. E. W., STRUYS, E. A., JAKOBS, C., SALOMONS, G. S., DIKS, S. H., PEPPELENBOSCH, M., KREMER, A., HOOGENRAAD, C. C., SMITT, P. A. E. S. et FRENCH, P. J. (2011). IDH1 R132H decreases proliferation of glioma cell lines in vitro and in vivo. *Annals of Neurology*, 69(3):455–463. [Cité page 65.](#)
- [Brennan *et al.*, 2013] BRENNAN, C. W., VERHAAK, R. G. W., MCKENNA, A., CAMPOS, B., NOUSHMEHR, H., SALAMA, S. R., ZHENG, S., CHAKRAVARTY, D., SANBORN, J. Z., BERMAN, S. H., BEROUKHIM, R., BERNARD, B., WU, C.-J., GENOVESE, G., SHMULEVICH, I., BARNHOLTZ-SLOAN, J., ZOU, L., VEGESNA, R., SHUKLA, S. A., CIRIELLO, G., YUNG, W. K., ZHANG, W., SOUGNEZ, C., MIKKELSEN, T., ALDAPE, K., BIGNER, D. D., VAN MEIR, E. G., PRADOS, M., SLOAN, A., BLACK, K. L., ESCHBACHER, J., FINOCCHIARO, G., FRIEDMAN, W., ANDREWS, D. W., GUHA, A., IACocca, M., O'NEILL, B. P., FOLTZ, G., MYERS, J., WEISENBERGER, D. J., PENNY, R., KUCHERLAPATI, R., PEROU, C. M., HAYES, D. N., GIBBS, R., MARRA, M., MILLS, G. B., LANDER, E., SPELLMAN, P., WILSON, R., SANDER, C., WEINSTEIN, J., MEYERSON, M., GABRIEL, S., LAIRD, P. W., HAUSSLER, D., GETZ, G., CHIN, L. et TCGA RESEARCH NETWORK (2013). The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell*, 155(2):462–477. [Cité page 11.](#)
- [Brigger *et al.*, 2012] BRIGGER, I., DUBERNET, C. et COUVREUR, P. (2012). Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64:24–36. [Cité page 41.](#)
- [Brodeur *et al.*, 2021] BRODEUR, M. N., SIMEONE, K., LECLERC-DESLAUNIERS, K., FLEURY, H., CARMONA, E., PROVENCHER, D. M. et MES-MASSON, A.-M. (2021). Carboplatin response in preclinical models for ovarian cancer : comparison of 2D monolayers, spheroids, ex vivo tumors and in vivo models. *Scientific Reports*, 11:18183. [Cité page 122.](#)
- [Brooks *et al.*, 1994] BROOKS, P. C., MONTGOMERY, A. M., ROSENFELD, M., REISFELD, R. A., HU, T., KLIER, G. et CHERESH, D. A. (1994). Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell*, 79(7):1157–1164. [Cité page 11.](#)
- [Buccarelli *et al.*, 2022] BUCCARELLI, M., CASTELLANI, G. et RICCI-VITIANI, L. (2022). Glioblastoma-Specific Strategies of Vascularization : Implications in Anti-Angiogenic Therapy Resistance. *Journal of Personalized Medicine*, 12(10):1625. [Cité page 11.](#)
- [Byler *et al.*, 2014] BYLER, S., GOLDFAR, S., HEERBOTH, S., LEARY, M., HOUSMAN, G., MOULTON, K. et SARKAR, S. (2014). Genetic and Epigenetic Aspects of Breast Cancer Progression and Therapy. *Anticancer Research*, 34(3):1071–1077. Publisher : International Institute of Anticancer Research Section : Reviews. [Cité page 78.](#)
- [Cabana *et al.*, 1997] CABANA, A., AIT-KADI, A. et JUHÁSZ, J. (1997). Study of the Gelation Process of Polyethylene Oxide-Polypropylene Oxide-Polyethylene Oxide Copolymer (Ploxamer 407) Aqueous Solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 190(2):307–312. [Cité page 194.](#)

- [Cabane, 2003] CABANE, B. (2003). Formulation des dispersions. *In* L'INGÉNIEUR, T. d., éditeur : *Techniques de l'ingénieur*, pages J-2-185-1. Techniques de l'ingénieur. *Cité page 22.*
- [Cai *et al.*, 2017] CAI, Z., YOOK, S., LU, Y., BERGSTROM, D., WINNIK, M. A., PIGNOL, J.-P. et REILLY, R. M. (2017). Local Radiation Treatment of HER2-Positive Breast Cancer Using Trastuzumab-Modified Gold Nanoparticles Labeled with ¹⁷⁷Lu. *Pharmaceutical Research*, 34(3):579-590. *Cité page 80.*
- [Cameron *et al.*, 2017] CAMERON, D., PICCART-GEHBART, M. J., GELBER, R. D., PROCTER, M., GOLDBIRSCHE, A., de AZAMBUJA, E., CASTRO, G., UNTCH, M., SMITH, I., GIANNI, L., BASELGA, J., AL-SAKAFF, N., LAUER, S., MCFADDEN, E., LEYLAND-JONES, B., BELL, R., DOWSETT, M. et JACKISCH, C. (2017). 11 years' follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive early breast cancer : final analysis of the HERceptin Adjuvant (HERA) trial. *Lancet (London, England)*, 389(10075):1195-1205. *Cité page 79.*
- [Candas-Green *et al.*, 2020] CANDAS-GREEN, D., XIE, B., HUANG, J., FAN, M., WANG, A., MENAA, C., ZHANG, Y., ZHANG, L., JING, D., AZGHADI, S., ZHOU, W., LIU, L., JIANG, N., LI, T., GAO, T., SWEENEY, C., SHEN, R., LIN, T.-y., PAN, C.-x., OZPISKIN, O. M., WOLOSCHAK, G., GRDINA, D. J., VAUGHAN, A. T., WANG, J. M., XIA, S., MONJAZEB, A. M., MURPHY, W. J., SUN, L.-Q., CHEN, H.-W., LAM, K. S., WEICHELBAUM, R. R. et LI, J. J. (2020). Dual blockade of CD47 and HER2 eliminates radioresistant breast cancer cells. *Nature Communications*, 11(1):4591. *Cité page 78.*
- [Carmeliet, 2003] CARMELIET, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *NATURE MEDICINE*, 9(6). *Cité page 11.*
- [Carney *et al.*, 2021] CARNEY, C. P., PANDEY, N., KAPUR, A., WOODWORTH, G. F., WINKLES, J. A. et KIM, A. J. (2021). Harnessing nanomedicine for enhanced immunotherapy for breast cancer brain metastases. *Drug Delivery and Translational Research*, 11(6):2344-2370. *Cité page 79.*
- [Carrel et Ebeling, 1923] CARREL, A. et EBELING, A. H. (1923). ACTION OF SERUM ON FIBROBLASTS IN VITRO. *The Journal of Experimental Medicine*, 37(6):759-765. *Cité page 122.*
- [Caswell et Norman, 2006] CASWELL, P. T. et NORMAN, J. C. (2006). Integrin Trafficking and the Control of Cell Migration. *Traffic*, 7(1):14-21. *Cité page 22.*
- [Chang *et al.*, 2017] CHANG, E. H., ARGYELAN, M., AGGARWAL, M., CHANDON, T.-S. S., KARLSGODT, K. H., MORI, S. et MALHOTRA, A. K. (2017). Diffusion tensor imaging measures of white matter compared to myelin basic protein immunofluorescence in tissue cleared intact brains. *Data in Brief*, 10:438-443. *Cité page 173.*
- [Chavez *et al.*, 2010] CHAVEZ, K. J., GARIMELLA, S. V. et LIPKOWITZ, S. (2010). Triple Negative Breast Cancer Cell Lines : One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Breast disease*, 32(1-2):35-48. *Cité page 80.*
- [Chen *et al.*, 2016] CHEN, C., WANG, P. et LI, L. (2016). Applications of Bacterial Magnetic Nanoparticles in Nanobiotechnology. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 16(3): 2164-2171. *Cité page 17.*

- [Chen et Hambarzumyan, 2018] CHEN, Z. et HAMBARDZUMYAN, D. (2018). Immune Microenvironment in Glioblastoma Subtypes. *Frontiers in Immunology*, 9:1004. [2 citations pages 11 and 52.](#)
- [Cheray et al., 2017] CHERAY, M., BÉGAUD, G., DELUCHE, E., NIVET, A., BATTU, S., LALLOUÉ, F., VERDIER, M. et BESSETTE, B. (2017). Cancer Stem-Like Cells in Glioblastoma. In DE VLEESCHOUWER, S., éditeur : *Glioblastoma*. Codon Publications, Brisbane (AU). [Cité page 12.](#)
- [Chi et al., 2018] CHI, J., WU, Z., CHOI, C. H. J., NGUYEN, L., TEGEGNE, S., ACKERMAN, S. E., CRANE, A., MARCHILDON, F., TESSIER-LAVIGNE, M. et COHEN, P. (2018). Three-Dimensional Adipose Tissue Imaging Reveals Regional Variation in Beige Fat Biogenesis and PRDM16-Dependent Sympathetic Neurite Density. *Cell Metabolism*, 27(1):226–236.e3. [Cité page 199.](#)
- [Chitcholtan et al., 2012] CHITCHOLTAN, K., SYKES, P. H. et EVANS, J. J. (2012). The resistance of intracellular mediators to doxorubicin and cisplatin are distinct in 3D and 2D endometrial cancer. *Journal of Translational Medicine*, 10:38. [Cité page 122.](#)
- [Choi et al., 2014] CHOI, S. Y. C., LIN, D., GOUT, P. W., COLLINS, C. C., XU, Y. et WANG, Y. (2014). Lessons from patient-derived xenografts for better in vitro modeling of human cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 79-80:222–237. [Cité page 122.](#)
- [Chow et al., 2017] CHOW, K.-H., PARK, H. J., GEORGE, J., YAMAMOTO, K., GALLUP, A. D., GRABER, J. H., CHEN, Y., JIANG, W., STEINDLER, D. A., NEILSON, E. G., KIM, B. Y. S. et YUN, K. (2017). S100A4 Is a Biomarker and Regulator of Glioma Stem Cells That Is Critical for Mesenchymal Transition in Glioblastoma. *Cancer Research*, 77(19):5360–5373. Publisher : American Association for Cancer Research Section : Tumor and Stem Cell Biology. [2 citations pages 12 and 64.](#)
- [Chung et al., 2013] CHUNG, K., WALLACE, J., KIM, S.-Y., KALYANASUNDARAM, S., ANDALMAN, A. S., DAVIDSON, T. J., MIRZABEKOV, J. J., ZALOCUSKY, K. A., MATTIS, J., DENISIN, A. K., PAK, S., BERNSTEIN, H., RAMAKRISHNAN, C., GROSENICK, L., GRADINARU, V. et DEISSEROTH, K. (2013). Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature*, 497(7449):332–337. [3 citations pages 8, 172, and 174.](#)
- [Chung et al., 2019] CHUNG, Y. W., KIM, S., HONG, J. H., LEE, J. K., LEE, N. W., LEE, Y. S. et SONG, J. Y. (2019). Overexpression of HER2/HER3 and clinical feature of ovarian cancer. *Journal of Gynecologic Oncology*, 30(5):e75. [Cité page 78.](#)
- [Clavreul et al., 2019] CLAVREUL, A., POURBAGHI-MASOULEH, M., ROGER, E. et MENEI, P. (2019). Nanocarriers and nonviral methods for delivering antiangiogenic factors for glioblastoma therapy : the story so far. *International Journal of Nanomedicine*, 14:2497–2513. [Cité page 11.](#)
- [Codega et al., 2014] CODEGA, P., SILVA-VARGAS, V., PAUL, A., MALDONADO-SOTO, A., DELEO, A., PASTRANA, E. et DOETSCH, F. (2014). Prospective Identification and Purification of Quiescent Adult Neural Stem Cells from Their In Vivo Niche. *Neuron*, 82(3):545–559. [2 citations pages 12 and 60.](#)
- [Conti et al., 2017] CONTI, A., GERSTENMAYER, M., GEFFROY, F., TILLEMENT, O., LUX, F., MÉRIAUX, S. et LARRAT, B. (2017). Comparison of Single Spot and Volume Ul-

trasound Sonications for Efficient Nanoparticle Delivery to Glioblastoma Model in Rats. [Cité page 4.](#)

[Corrò *et al.*, 2020] CORRÒ, C., NOVELLASDEMUNT, L. et LI, V. S. W. (2020). A brief history of organoids. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 319(1):C151–C165. [Cité page 123.](#)

[Craver *et al.*, 2016] CRAVER, B. M., ACHARYA, M. M., ALLEN, B. D., BENKE, S. N., HULTGREN, N. W., BAULCH, J. E. et LIMOLI, C. L. (2016). 3D surface analysis of hippocampal microvasculature in the irradiated brain : Vascular Disruption in the Irradiated Brain. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 57(5):341–349. [Cité page 193.](#)

[Cui *et al.*, 2016] CUI, D., REN, J., SHI, J., FENG, L., WANG, K., ZENG, T., JIN, Y. et GAO, L. (2016). R132H mutation in IDH1 gene reduces proliferation, cell survival and invasion of human glioma by downregulating Wnt/ β -catenin signaling. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 73:72–81. [Cité page 65.](#)

[Curran *et al.*, 2006] CURRAN, E. M., JUDY, B. M., DURU, N. A., WANG, H.-Q., VERGARA, L. A., LUBAHN, D. B. et ESTES, D. M. (2006). Estrogenic Regulation of Host Immunity against an Estrogen Receptor–Negative Human Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, 12(19):5641–5647. [Cité page 166.](#)

[Curren Smith, 2015] CURREN SMITH, E. W. (2015). Macrophage Polarization and Its Role in Cancer. *Journal of Clinical & Cellular Immunology*, 06(04). [Cité page 52.](#)

[Dahlmann *et al.*, 2016] DAHLMANN, M., KOBELT, D., WALTHER, W., MUDDLURU, G. et STEIN, U. (2016). S100A4 in Cancer Metastasis : Wnt Signaling-Driven Interventions for Metastasis Restriction. *Cancers*, 8(6):59. [Cité page 64.](#)

[Dai *et al.*, 2017] DAI, X., CHENG, H., BAI, Z. et LI, J. (2017). Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *Journal of Cancer*, 8(16): 3131–3141. [Cité page 119.](#)

[De Francesco *et al.*, 2018] DE FRANCESCO, E. M., SOTGIA, F. et LISANTI, M. P. (2018). Cancer stem cells (CSCs) : metabolic strategies for their identification and eradication. *The Biochemical Journal*, 475(9):1611–1634. [Cité page 12.](#)

[Deken *et al.*, 2019] DEKEN, M. M., BOS, D. L., TUMMERS, W. S. F. J., MARCH, T. L., van de VELDE, C. J. H., RIJPKEMA, M. et VAHRMEIJER, A. L. (2019). Multimodal image-guided surgery of HER2-positive breast cancer using [¹¹¹In]In-DTPA-trastuzumab-IRDye800CW in an orthotopic breast tumor model. *EJNMMI Research*, 9(1):98. [2 citations pages 80 and 164.](#)

[Deng *et al.*, 2021] DENG, J., CHERNIKOVA, S. B., WANG, Y., RODRIGUEZ, M. L., ANDERSEN, S. J., UMEH-GARCIA, M. C., GODFREY, B. O., AHMADIAN, S. S., FISCHER, W.-N., KOLLER, K. J., JANDELEIT, B., RINGOLD, G. M. et GEPHART, M. H. (2021). A Novel Brain-Permeant Chemotherapeutic Agent for the Treatment of Brain Metastasis in Triple-Negative Breast Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 20(11):2110–2116. [Cité page 78.](#)

[Dent *et al.*, 1989] DENT, J. A., POLSON, A. G. et KLYMKOWSKY, M. W. (1989). A whole-mount immunocytochemical analysis of the expression of the intermediate filament protein vimentin in *Xenopus*. *Development (Cambridge, England)*, 105(1):61–74. [Cité page 172.](#)

- [Di Giovanna *et al.*, 2017] DI GIOVANNA, A. P., TIBO, A., SILVESTRI, L., MÜLLENBROICH, M. C., COSTANTINI, I., ALLEGRA MASCARO, A. L., SACCONI, L., FRASCONI, P. et PAVONE, F. S. (2017). Whole-Brain Vasculature Reconstruction at the Single Capillary Level. preprint, Neuroscience. *2 citations pages 173 and 194.*
- [Dieudonné *et al.*, 2019] DIEUDONNÉ, A., PIGNOL, D. et PRÉVÉRAL, S. (2019). Magnetosomes : biogenic iron nanoparticles produced by environmental bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(9):3637–3649. *Cité page 17.*
- [Dobrolecki *et al.*, 2016] DOBROLECKI, L. E., AIRHART, S. D., ALFEREZ, D. G., APARICIO, S., BEHBOD, F., BENTIRES-ALJ, M., BRISKEN, C., BULT, C. J., CAI, S., CLARKE, R. B., DOWST, H., ELLIS, M. J., GONZALEZ-SUAREZ, E., IGGO, R. D., KABOS, P., LI, S., LINDEMAN, G. J., MARANGONI, E., MCCOY, A., MERIC-BERNSTAM, F., PIWNICA-WORMS, H., POUPON, M.-F., REIS-FILHO, J., SARTORIUS, C. A., SCABIA, V., SFLOMOS, G., TU, Y., VAILLANT, F., VISVADER, J. E., WELM, A., WICHA, M. S. et LEWIS, M. T. (2016). Patient-derived xenograft (PDX) models in basic and translational breast cancer research. *Cancer and Metastasis Reviews*, 35(4):547–573. *Cité page 164.*
- [Doherty et McMahon, 2009] DOHERTY, G. J. et MCMAHON, H. T. (2009). Mechanisms of Endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, 78(1):857–902. _eprint : <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540>. *Cité page 85.*
- [D’Souza *et al.*, 1991] D’SOUZA, S. E., GINSBERG, M. H. et PLOW, E. F. (1991). Arginylglycyl-aspartic acid (RGD) : a cell adhesion motif. *Trends in Biochemical Sciences*, 16(7):246–250. *Cité page 13.*
- [Dwyer *et al.*, 2012] DWYER, J., HEBDA, J. K., LE GUELTE, A., GALAN-MOYA, E.-M., SMITH, S. S., AZZI, S., BIDERE, N. et GAVARD, J. (2012). Glioblastoma Cell-Secreted Interleukin-8 Induces Brain Endothelial Cell Permeability via CXCR2. *PLoS ONE*, 7(9):e45562. *Cité page 149.*
- [Dziawer *et al.*, 2019] DZIAWER, , MAJKOWSKA-PILIP, A., GAWEL, D., GODLEWSKA, M., PRUSZYŃSKI, M., JASTRZEBSKI, J., WAŚ, B. et BILEWICZ, A. (2019). Trastuzumab-Modified Gold Nanoparticles Labeled with ²¹¹At as a Prospective Tool for Local Treatment of HER2-Positive Breast Cancer. *Nanomaterials*, 9(4):632. *Cité page 80.*
- [D’Ambrosi *et al.*, 2021] D’AMBROSI, N., MILANI, M. et APOLLONI, S. (2021). S100A4 in the Physiology and Pathology of the Central and Peripheral Nervous System. *Cells*, 10(4):798. *Cité page 64.*
- [Edwards *et al.*, 2011] EDWARDS, L. A., WOOLARD, K., SON, M. J., LI, A., LEE, J., ENE, C., MANTEY, S. A., MARIC, D., SONG, H., BELOVA, G., JENSEN, R. T., ZHANG, W. et FINE, H. A. (2011). Effect of Brain- and Tumor-Derived Connective Tissue Growth Factor on Glioma Invasion. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 103(15):1162–1178. *Cité page 52.*
- [El Hallani *et al.*, 2010] EL HALLANI, S., BOISSELIER, B., PEGLION, F., ROUSSEAU, A., COLIN, C., IDBAIH, A., MARIE, Y., MOKHTARI, K., THOMAS, J. L., EICHMANN, A., DELATTRE, J. Y., MANIOTIS, A. J. et SANSON, M. (2010). A new alternative mechanism in glioblastoma vascularization : tubular vasculogenic mimicry. *Brain*, 133(4):973–982. *Cité page 11.*

- [Emery *et al.*, 2017] EMERY, I. F., GOPALAN, A., WOOD, S., CHOW, K.-h., BATTELLI, C., GEORGE, J., BLASZYK, H., FLORMAN, J. et YUN, K. (2017). Expression and function of ABCG2 and XIAP in glioblastomas. *Journal of neuro-oncology*, 133(1):47–57. [Cité page 61.](#)
- [Erdal *et al.*, 2018] ERDAL, E., DEMIRBILEK, M., YEH, Y., AKBAL, , RUFF, L., BOZKURT, D., CABUK, A., SENEL, Y., GUMUSKAYA, B., ALGIN, O., COLAK, S., ESENER, S. et DENKBAS, E. B. (2018). A Comparative Study of Receptor-Targeted Magnetosome and HSA-Coated Iron Oxide Nanoparticles as MRI Contrast-Enhancing Agent in Animal Cancer Model. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 185(1):91–113. [Cité page 80.](#)
- [Ertürk et Bradke, 2013] ERTÜRK, A. et BRADKE, F. (2013). High-resolution imaging of entire organs by 3-dimensional imaging of solvent cleared organs (3DISCO). *Experimental Neurology*, 242:57–64. [2 citations pages 172 and 173.](#)
- [Escartin *et al.*, 2019] ESCARTIN, C., GUILLEMAUD, O. et Carrillo-de SAUVAGE, M.-A. (2019). Questions and (some) answers on reactive astrocytes. *Glia*, 67(12):2221–2247. [Cité page 52.](#)
- [Escrivá-de Romaní *et al.*, 2018] ESCRIVÁ-de ROMANÍ, S., ARUMÍ, M., BELLET, M. et SAURA, C. (2018). HER2-positive breast cancer : Current and new therapeutic strategies. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, 39:80–88. [Cité page 79.](#)
- [Fakhari *et al.*, 2017] FAKHARI, A., CORCORAN, M. et SCHWARZ, A. (2017). Thermogelling properties of purified poloxamer 407. *Heliyon*, 3(8):e00390. [Cité page 194.](#)
- [Felfoul *et al.*, 2007] FELFOUL, O., MOHAMMADI, M. et MARTEL, S. (2007). Magnetic resonance imaging of Fe₃O₄ nanoparticles embedded in living magnetotactic bacteria for potential use as carriers for in vivo applications. *Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual International Conference*, 2007:1463–1466. [Cité page 17.](#)
- [Feng *et al.*, 2015] FENG, X., YAO, J., GAO, X., JING, Y., KANG, T., JIANG, D., JIANG, T., FENG, J., ZHU, Q., JIANG, X. et CHEN, J. (2015). Multi-targeting Peptide-Functionalized Nanoparticles Recognized Vasculogenic Mimicry, Tumor Neovasculature, and Glioma Cells for Enhanced Anti-glioma Therapy. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(50):27885–27899. [Cité page 11.](#)
- [Flament *et al.*, 2013] FLAMENT, J., GEFFROY, F., MEDINA, C., ROBIC, C., MAYER, J.-F., MÉRIAUX, S., VALETTE, J., ROBERT, P., PORT, M., LE BIHAN, D., LETHIMONNIER, F. et BOUMEZBEUR, F. (2013). In vivo CEST MR imaging of U87 mice brain tumor angiogenesis using targeted LipoCEST contrast agent at 7 T : CEST-MRI of U87 Mice Brain Tumor Using RGD-LipoCEST. *Magnetic Resonance in Medicine*, 69(1):179–187. [Cité page 4.](#)
- [Folkman *et al.*, 1971] FOLKMAN, J., MERLER, E., ABERNATHY, C. et WILLIAMS, G. (1971). ISOLATION OF A TUMOR FACTOR RESPONSIBLE FOR ANGIOGENESIS. *Journal of Experimental Medicine*, 133(2):275–288. [Cité page 11.](#)
- [Foty, 2011] FOTY, R. (2011). A Simple Hanging Drop Cell Culture Protocol for Generation of 3D Spheroids. *Journal of Visualized Experiments*, (51):2720. [Cité page 124.](#)

- [Fraguas-Sánchez *et al.*, 2022] FRAGUAS-SÁNCHEZ, A. I., LOZZA, I. et TORRES-SUÁREZ, A. I. (2022). Actively Targeted Nanomedicines in Breast Cancer : From Pre-Clinical Investigation to Clinic. *Cancers*, 14(5):1198. *Cité page 79.*
- [Frankel et Blakemore, 1988] FRANKEL, R. B. et BLAKEMORE, R. P. (1988). Magnetite and magnetotaxis in microorganisms. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 238:321–330. *Cité page 15.*
- [Frankel *et al.*, 1981] FRANKEL, R. B., BLAKEMORE, R. P., ARAUJO, F. F. T. D., ESQUIVEL, D. M. S. et DANON, J. (1981). Magnetotactic Bacteria at the Geomagnetic Equator. *Science*, 212(4500):1269–1270. Publisher : American Association for the Advancement of Science Section : Reports. *Cité page 15.*
- [Friedl et Jordan, 1994] FRIEDL, A. et JORDAN, V. (1994). Oestradiol stimulates growth of oestrogen receptor-negative MDA-MB-231 breast cancer cells in immunodeficient mice by reducing cell loss. *European Journal of Cancer*, 30(10):1559–1564. *Cité page 166.*
- [Friedlander *et al.*, 1996] FRIEDLANDER, D. R., ZAGZAG, D., SHIFF, B., COHEN, H., ALLEN, J. C., KELLY, P. J. et GRUMET, M. (1996). Migration of brain tumor cells on extracellular matrix proteins in vitro correlates with tumor type and grade and involves alphaV and beta1 integrins. *Cancer Research*, 56(8):1939–1947. *Cité page 122.*
- [Fu *et al.*, 2009] FU, Y.-Y., LIN, C.-W., ENIKOLOPOV, G., SIBLEY, E., CHIANG, A.-S. et TANG, S.-C. (2009). A microtome-free 3-dimensional confocal imaging method for visualization of mouse intestine with subcellular-level resolution. *Gastroenterology*, 137(2):453–465. *Cité page 172.*
- [Galarza *et al.*, 2020] GALARZA, S., KIM, H., ATAY, N., PEYTON, S. R. et MUNSON, J. M. (2020). 2D or 3D? How cell motility measurements are conserved across dimensions in vitro and translate in vivo. *Bioengineering & Translational Medicine*, 5(1):e10148. *Cité page 122.*
- [Gambarota *et al.*, 2008] GAMBAROTA, G., LEENDERS, W., MAASS, C., WESSELING, P., van der KOGEL, B., van TELLINGEN, O. et HEERSCHAP, A. (2008). Characterisation of tumour vasculature in mouse brain by USPIO contrast-enhanced MRI. *British Journal of Cancer*, 98(11):1784–1789. Bandiera_ abtest : a Cg_type : Nature Research Journals Number : 11 Primary_ atype : Research Publisher : Nature Publishing Group. *Cité page 41.*
- [Garcia-Alvarez *et al.*, 2021] GARCIA-ALVAREZ, A., PAPAKONSTANTINO, A. et OLIVEIRA, M. (2021). Brain Metastases in HER2-Positive Breast Cancer : Current and Novel Treatment Strategies. *Cancers*, 13(12):2927. *2 citations pages 78 and 167.*
- [Geffroy *et al.*, 2015] GEFFROY, F., BOUCHER, M., GINET, N., PREVERAL, S., ADRYANCZYK-PERRIER, G., PÉAN, M., LEFÈVRE, C. T., GARCIA, D., PIGNOL, D. et MÉRIAUX, S. (2015). In vitro characterization of AMB1 magnetosomes as biogenic functionalized contrast agents dedicated to molecular MRI. Honolulu, USA. *Cité page 6.*
- [Geffroy *et al.*, 2016] GEFFROY, F., BOUCHER, M., GINET, N., PREVERAL, S., BELLANGER, L., ADRYANCZYK-PERRIER, G., PÉAN, M., LEFÈVRE, C. T., GARCIA, D., PIGNOL, D. et MÉRIAUX, S. (2016). In vitro characterization of {RGD}-functionalized magnetosomes accumulation in U87 glioblastoma cells. Carry-le-Rouet, France. *Cité page 6.*

- [Geffroy *et al.*, 2010] GEFFROY, F., FLAMENT, J., GESTIN, G., DJEMAI, B., MARTY, B., GIRAUDEAU, C., MÉRIAUX, S., VALETTE, J., LETHIMONNIER, F., BLOCH, G., LE BIHAN, D. et BOUMEZBEUR, F. (2010). Novel 3D cell culture medium for characterization of contrast agent in the MRI environment. Kyoto, Japan. [Cité page 8.](#)
- [Geng *et al.*, 2015] GENG, L., WANG, Z., YANG, X., LI, D., LIAN, W., XIANG, Z., WANG, W., BU, X., LAI, W., HU, Z. et FANG, Q. (2015). Structure-based Design of Peptides with High Affinity and Specificity to HER2 Positive Tumors. *Theranostics*, 5(10):1154–1165. [Cité page 79.](#)
- [Genina *et al.*, 2010] GENINA, E. A., BASHKATOV, A. N. et TUCHIN, V. V. (2010). Tissue optical immersion clearing. *Expert Review of Medical Devices*, 7(6):825–842. [Cité page 172.](#)
- [Genuino *et al.*, 2019] GENUINO, A. J., CHAIKLEDKAEW, U., THE, D. O., REUNGWETWATANANA, T. et THAKKINSTIAN, A. (2019). Adjuvant trastuzumab regimen for HER2-positive early-stage breast cancer : a systematic review and meta-analysis. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 12(8):815–824. [Cité page 78.](#)
- [Gerigk *et al.*, 2021] GERIGK, M., BULSTRODE, H., SHI, H. H., TÖNISEN, F., CERUTTI, C., MORRISON, G., ROWITCH, D. et HUANG, Y. Y. S. (2021). On-chip perivascular niche supporting stemness of patient-derived glioma cells in a serum-free, flowable culture. *Lab on a Chip*, 21(12):2343–2358. [Cité page 123.](#)
- [Gerstenmayer *et al.*, 2017] GERSTENMAYER, M., SELINGUE, E., GEFFROY, F., MERIAUX, S. et LARRAT, B. (2017). Weekly ultrasound induced blood-brain barrier openings seem to restore memory in APP/PS1dE9 amyloid mice model. pages 1–1. [Cité page 5.](#)
- [Gerstenmayer *et al.*, 2018] GERSTENMAYER, M., SELINGUE, E., GEFFROY, F., MÉRIAUX, S. et LARRAT, B. (2018). Comparison of high resolution ex vivo multi gradient echo sequences at 7T and 11.7T for amyloid load quantification in an Alzheimer’s disease mouse model. (ISMRM 2018). [Cité page 5.](#)
- [Ginet *et al.*, 2014] GINET, N., MÉRIAUX, S., MARTY, B., LALATONNE, Y., PREVERAL, S., MOTTE, L., LEFÈVRE, C. T., GEFFROY, F., LETHIMONNIER, F., PÉAN, M., GARCIA, D., ADRYANCZYK-PERRIER, G. et PIGNOL, D. (2014). Towards molecular imaging with high-field MRI and biogenic contrast agents. Rio de Janeiro, Brazil. [Cité page 6.](#)
- [Ginet *et al.*, 2011] GINET, N., PARDOUX, R., ADRYANCZYK, G., GARCIA, D., BRUTESCO, C. et PIGNOL, D. (2011). Single-Step Production of a Recyclable Nanobiocatalyst for Organophosphate Pesticides Biodegradation Using Functionalized Bacterial Magnetosomes. *PLoS ONE*, 6(6):e21442. [3 citations pages 6, 17, and 207.](#)
- [Giraudeau *et al.*, 2013] GIRAUDEAU, C., GEFFROY, F., MÉRIAUX, S., BOUMEZBEUR, F., ROBERT, P., PORT, M., ROBIC, C., LE BIHAN, D., LETHIMONNIER, F. et VALETTE, J. (2013). 19F molecular MR imaging for detection of brain tumor angiogenesis : in vivo validation using targeted PFOB nanoparticles. *Angiogenesis*, 16(1):171–179. [Cité page 4.](#)
- [Gordon *et al.*, 1986] GORDON, M. N., OSTERBURG, H. H., MAY, P. C. et FINCH, C. E. (1986). Effective Oral Administration of 17 β -Estradiol to Female C57BL/6J Mice through the Drinking Water1. *Biology of Reproduction*, 35(5):1088–1095. [Cité page 166.](#)

- [Gottardis *et al.*, 1988] GOTTARDIS, M. M., ROBINSON, S. P. et JORDAN, V. (1988). Estradiol-stimulated growth of MCF-7 tumors implanted in athymic mice : A model to study the tumorigenic action of tamoxifen. *Journal of Steroid Biochemistry*, 30(1-6):311–314. [Cité page 166.](#)
- [Goutsouliak *et al.*, 2020] GOUTSOULIAK, K., VEERARAGHAVAN, J., SETHUNATH, V., DE ANGELIS, C., OSBORNE, C. K., RIMAWI, M. F. et SCHIFF, R. (2020). Towards personalized treatment for early stage HER2-positive breast cancer. *Nature reviews. Clinical oncology*, 17(4):233–250. [Cité page 79.](#)
- [Grinberg *et al.*, 2014] GRINBERG, F., FARRHER, E., CIOBANU, L., GEFFROY, F., LE BIHAN, D. et SHAH, N. J. (2014). Non-Gaussian Diffusion Imaging for Enhanced Contrast of Brain Tissue Affected by Ischemic Stroke. *PLoS ONE*, 9(2):e89225. [Cité page 5.](#)
- [Gritsenko *et al.*, 2017] GRITSENKO, P., LEENDERS, W. et FRIEDL, P. (2017). Recapitulating in vivo-like plasticity of glioma cell invasion along blood vessels and in astrocyte-rich stroma. *Histochemistry and Cell Biology*, 148(4):395–406. [Cité page 12.](#)
- [Guntern *et al.*, 1992] GUNTERN, R., BOURAS, C., HOF, P. R. et VALLET, P. G. (1992). An improved thioflavine S method for staining neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer’s disease. *Experientia*, 48(1):8–10. [Cité page 178.](#)
- [Hachim *et al.*, 2019] HACHIM, I. Y., LÓPEZ-OZUNA, V. M., HACHIM, M. Y., LEBRUN, J.-J. et ALI, S. (2019). Prolactin hormone exerts anti-tumorigenic effects in HER-2 overexpressing breast cancer cells through regulation of stemness. *Stem Cell Research*, 40:101538. [Cité page 164.](#)
- [Hafsi *et al.*, 2020] HAFSI, M., PREVERAL, S., HOOG, C., HÉRAULT, J., PERRIER, G. A., LEFÈVRE, C. T., MICHEL, H., PIGNOL, D., DOYEN, J., POURCHER, T., HUMBERT, O., THARIAT, J. et CAMBIEN, B. (2020). RGD-functionalized magnetosomes are efficient tumor radioenhancers for X-rays and protons. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 23:102084. [Cité page 17.](#)
- [Hama *et al.*, 2015] HAMA, H., HIOKI, H., NAMIKI, K., HOSHIDA, T., KUROKAWA, H., ISHIDATE, F., KANEKO, T., AKAGI, T., SAITO, T., SAIDO, T. et MIYAWAKI, A. (2015). ScaleS : an optical clearing palette for biological imaging. *Nature Neuroscience*, 18(10):1518–1529. [Cité page 175.](#)
- [Hama *et al.*, 2011] HAMA, H., KUROKAWA, H., KAWANO, H., ANDO, R., SHIMOGORI, T., NODA, H., FUKAMI, K., SAKAUE-SAWANO, A. et MIYAWAKI, A. (2011). Scale : a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nature Neuroscience*, 14(11):1481–1488. Bandiera_abtest : a Cg_type : Nature Research Journals Number : 11 Primary_atype : Research Publisher : Nature Publishing Group Subject_term : Fluorescence imaging;Neuro-vascular interactions Subject_term_id : fluorescence-imaging ;neuro-vascular-interactions. [2 citations pages 172 and 175.](#)
- [Hartung *et al.*, 2007] HARTUNG, A., LISY, M. R., HERRMANN, K.-H., HILGER, I., SCHÜLLER, D., LANG, C., BELLEMANN, M. E., KAISER, W. A. et REICHENBACH, J. R. (2007). Labeling of macrophages using bacterial magnetosomes and their characterization by magnetic resonance imaging. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 311(1):454–459. [Cité page 18.](#)

- [Harvie *et al.*, 2003] HARVIE, M., HOOPER, L. et HOWELL, A. (2003). Central obesity and breast cancer risk : a systematic review. *Obesity Reviews*, 4(3):157–173.
_eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1046/j.1467-789X.2003.00108.x>.
Cité page 78.
- [Hatherell *et al.*, 2011] HATHERELL, K., COURAUD, P.-O., ROMERO, I. A., WEKSLER, B. et PILKINGTON, G. J. (2011). Development of a three-dimensional, all-human in vitro model of the blood-brain barrier using mono-, co-, and tri-cultivation Transwell models. *Journal of Neuroscience Methods*, 199(2):223–229.
Cité page 130.
- [Hayden et Harbell, 2021] HAYDEN, P. J. et HARBELL, J. W. (2021). Special review series on 3D organotypic culture models : Introduction and historical perspective. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, 57(2):95–103.
Cité page 123.
- [Heider *et al.*, 2021] HEIDER, J., VOGEL, S., VOLKMER, H. et BREITMEYER, R. (2021). Human iPSC-Derived Glia as a Tool for Neuropsychiatric Research and Drug Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19):10254.
Cité page 123.
- [Hewer *et al.*, 2020] HEWER, E., PHOUR, J., GUTT-WILL, M., SCHUCHT, P., DETTMER, M. S. et VASSELLA, E. (2020). TERT Promoter Mutation Analysis to Distinguish Glioma From Gliosis. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 79(4):430–436.
Cité page 12.
- [Holliday et Speirs, 2011] HOLLIDAY, D. L. et SPEIRS, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research*, 13(4):215.
3 citations pages 80, 103, and 164.
- [Holmberg Olausson *et al.*, 2014] HOLMBERG OLAUSSON, K., MAIRE, C. L., HAIDAR, S., LING, J., LEARNER, E., NISTÉR, M. et LIGON, K. L. (2014). Prominin-1 (CD133) Defines Both Stem and Non-Stem Cell Populations in CNS Development and Gliomas. *PLoS ONE*, 9(9):e106694.
Cité page 60.
- [Hopkin, 2004] HOPKIN, M. (2004). Magnet-making bacteria could target tumours. *Nature*, pages news040906–11.
Cité page 17.
- [Houghton *et al.*, 2020] HOUGHTON, S. C., ELIASSEN, H., TAMIMI, R. M., WILLETT, W. C., ROSNER, B. A. et HANKINSON, S. E. (2020). Central Adiposity and Subsequent Risk of Breast Cancer by Menopause Status. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 113(7):900–908.
Cité page 78.
- [Howell *et al.*, 2014] HOWELL, A., ANDERSON, A. S., CLARKE, R. B., DUFFY, S. W., EVANS, D. G., GARCIA-CLOSAS, M., GESCHER, A. J., KEY, T. J., SAXTON, J. M. et HARVIE, M. N. (2014). Risk determination and prevention of breast cancer. *Breast Cancer Research : BCR*, 16:446.
Cité page 78.
- [Hu *et al.*, 2010] HU, L. L., ZHANG, F., WANG, Z., YOU, X. F., NIE, L., WANG, H. X., SONG, T. et YANG, W. H. (2010). Comparison of the 1µm NMR Relaxation Enhancement Produced by Bacterial Magnetosomes and Synthetic Iron Oxide Nanoparticles for Potential Use as MR Molecular Probes. *IEEE Transactions on Applied Superconductivity*, 20(3):822–825. Conference Name : IEEE Transactions on Applied Superconductivity.
Cité page 18.

- [Hu et Aunins, 1997] HU, W. S. et AUNINS, J. G. (1997). Large-scale mammalian cell culture. *Current Opinion in Biotechnology*, 8(2):148–153. [Cité page 122.](#)
- [Huang et al., 2020] HUANG, T., LUO, X., WU, B., PENG, P., DAI, Y., HU, G., QIU, H. et YUAN, X. (2020). Pyrotinib enhances the radiosensitivity of HER2-overexpressing gastric and breast cancer cells. *Oncology Reports*, 44(6):2634–2644. [Cité page 78.](#)
- [Huang et al., 2007] HUANG, Y., FERNANDEZ, S. V., GOODWIN, S., RUSSO, P. A., RUSSO, I. H., SUTTER, T. R. et RUSSO, J. (2007). Epithelial to Mesenchymal Transition in Human Breast Epithelial Cells Transformed by 17 β -Estradiol. *Cancer Research*, 67(23):11147–11157. [Cité page 166.](#)
- [Huang et al., 2018] HUANG, Y., TONG, L., YI, L., ZHANG, C., HAI, L., LI, T., YU, S., WANG, W., TAO, Z., MA, H., LIU, P., XIE, Y. et YANG, X. (2018). Three-dimensional hydrogel is suitable for targeted investigation of amoeboid migration of glioma cells. *Molecular Medicine Reports*, 17(1):250–256. [Cité page 172.](#)
- [Iima et al., 2014] IIMA, M., REYNAUD, O., TSURUGIZAWA, T., CIOBANU, L., LI, J.-R., GEFFROY, F., DJEMAI, B., UMEHANA, M. et LE BIHAN, D. (2014). Characterization of Glioma Microcirculation and Tissue Features Using Intravoxel Incoherent Motion Magnetic Resonance Imaging in a Rat Brain Model :. *Investigative Radiology*, 49(7):485–490. [Cité page 4.](#)
- [Iorns et al., 2012] IORNS, E., DREWS-ELGER, K., WARD, T. M., DEAN, S., CLARKE, J., BERRY, D., ASHRY, D. E. et LIPPMAN, M. (2012). A New Mouse Model for the Study of Human Breast Cancer Metastasis. *PLoS ONE*, 7(10):e47995. [Cité page 164.](#)
- [Jabalera et al., 2020] JABALERA, Y., OLTOLINA, F., PEIGNEUX, A., SOLA-LEYVA, A., CARRASCO-JIMÉNEZ, M. P., PRAT, M., JIMENEZ-LOPEZ, C. et IGLESIAS, G. R. (2020). Nanoformulation Design Including MamC-Mediated Biomimetic Nanoparticles Allows the Simultaneous Application of Targeted Drug Delivery and Magnetic Hyperthermia. *Polymers*, 12(8):1832. [Cité page 80.](#)
- [Jackisch et al., 2021] JACKISCH, C., CORTAZAR, P., GEYER, C. E., GIANNI, L., GLIGOROV, J., MACHACKOVA, Z., PEREZ, E. A., SCHNEEWEISS, A., TOLANEY, S. M., UNTCH, M., WARDLEY, A. et PICCART, M. (2021). Risk-based decision-making in the treatment of HER2-positive early breast cancer : Recommendations based on the current state of knowledge. *Cancer Treatment Reviews*, 99:102229. [Cité page 79.](#)
- [Jacob et al., 2020] JACOB, F., SALINAS, R. D., ZHANG, D. Y., NGUYEN, P. T., SCHNOLL, J. G., WONG, S. Z. H., THOKALA, R., SHEIKH, S., SAXENA, D., PROKOP, S., LIU, D.-a., QIAN, X., PETROV, D., LUCAS, T., CHEN, H. I., DORSEY, J. F., CHRISTIAN, K. M., BINDER, Z. A., NASRALLAH, M., BREM, S., O’ROURKE, D. M., MING, G.-l. et SONG, H. (2020). A Patient-Derived Glioblastoma Organoid Model and Biobank Recapitulates Inter- and Intra-tumoral Heterogeneity. *Cell*, 180(1):188–204.e22. [Cité page 123.](#)
- [Jaeger et al., 2015] JAEGER, P. A., McELFRESH, C., WONG, L. R. et IDEKER, T. (2015). Beyond Agar : Gel Substrates with Improved Optical Clarity and Drug Efficiency and Reduced Autofluorescence for Microbial Growth Experiments. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(16):5639–5649. [Cité page 160.](#)

- [Jain *et al.*, 2007] JAIN, R. K., di TOMASO, E., DUDA, D. G., LOEFFLER, J. S., SORENSEN, A. G. et BATCHELOR, T. T. (2007). Angiogenesis in brain tumours. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(8):610–622. [Cité page 11.](#)
- [Jelescu *et al.*, 2014] JELESCU, I. O., CIOBANU, L., GEFFROY, F., MARQUET, P. et LE BIHAN, D. (2014). Effects of hypotonic stress and ouabain on the apparent diffusion coefficient of water at cellular and tissue levels in *Aplysia*. *NMR in Biomedicine*, 27(3):280–290. [2 citations pages 4 and 181.](#)
- [Jensen et Teng, 2020] JENSEN, C. et TENG, Y. (2020). Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7:33. [Cité page 122.](#)
- [Jensen et Berg, 2016] JENSEN, K. H. R. et BERG, R. W. (2016). CLARITY-compatible lipophilic dyes for electrode marking and neuronal tracing. *Scientific Reports*, 6:32674. [Cité page 177.](#)
- [Jing *et al.*, 2018] JING, D., ZHANG, S., LUO, W., GAO, X., MEN, Y., MA, C., LIU, X., YI, Y., BUGDE, A., ZHOU, B. O., ZHAO, Z., YUAN, Q., FENG, J. Q., GAO, L., GE, W.-P. et ZHAO, H. (2018). Tissue clearing of both hard and soft tissue organs with the PEGASOS method. *Cell Research*, 28(8):803–818. [Cité page 199.](#)
- [Jones *et al.*, 2017] JONES, M. E., SCHOEMAKER, M. J., WRIGHT, L. B., ASHWORTH, A. et SWERDLOW, A. J. (2017). Smoking and risk of breast cancer in the Generations Study cohort. *Breast Cancer Research : BCR*, 19:118. [Cité page 78.](#)
- [Jordan *et al.*, 1989] JORDAN, V., GOTTARDIS, M., ROBINSON, S. et FRIEDL, A. (1989). Immune-deficient animals to study “hormone-dependent” breast and endometrial cancer. *Journal of Steroid Biochemistry*, 34(1-6):169–176. [Cité page 166.](#)
- [Kapałczyńska *et al.*, 2018] KAPAŁCZYŃSKA, M., KOLENDA, T., PRZYBYŁA, W., ZAJĄCZKOWSKA, M., TERESIAK, A., FILAS, V., IBBS, M., BLIŹNIAK, R., ŁUCZEWSKI, et LAMPERSKA, K. (2018). 2D and 3D cell cultures – a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of Medical Science : AMS*, 14(4):910–919. [Cité page 122.](#)
- [Karahaliloğlu *et al.*, 2022] KARAHALILOĞLU, Z., KILICAY, E. et HAZER, B. (2022). Herceptin-conjugated magnetic polystyrene-Agsbox nanoparticles as a theranostic agent for breast cancer. *Journal of Biomaterials Applications*, 36(9):1599–1616. Publisher : SAGE Publications Ltd STM. [Cité page 80.](#)
- [Kazemi *et al.*, 2020] KAZEMI, A., BARATI-BOLDAJI, R., SOLTANI, S., MOHAMMADIPOOR, N., ESMAEILINEZHAD, Z., CLARK, C. C. T., BABAJAFARI, S. et AKBARZADEH, M. (2020). Intake of Various Food Groups and Risk of Breast Cancer : A Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis of Prospective Studies. *Advances in Nutrition*, 12(3):809–849. [Cité page 78.](#)
- [Kaçar *et al.*, 2010] KAÇAR, Y. A., BIÇEN, B., VAROL, I., MENDI, Y. Y., SERÇE, S. et CETINER, S. (2010). Gelling agents and culture vessels affect in vitro multiplication of banana plantlets. *Genetics and molecular research : GMR*, 9(1):416–424. [Cité page 160.](#)
- [Ke *et al.*, 2013] KE, M.-T., FUJIMOTO, S. et IMAI, T. (2013). SeeDB : a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nature Neuroscience*, 16(8):1154–1161. [3 citations pages 172, 173, and 175.](#)

- [Kelm *et al.*, 2003] KELM, J. M., TIMMINS, N. E., BROWN, C. J., FUSSENEGGER, M. et NIELSEN, L. K. (2003). Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnology and Bioengineering*, 83(2):173–180. [Cité page 124.](#)
- [Kempson, 2022] KEMPSON, I. (2022). Nanoparticle-Based Radiosensitization. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9):4936. [Cité page 79.](#)
- [Khurshed *et al.*, 2017] KHURSHED, M., MOLENAAR, R. J., LENTING, K., LEENDERS, W. P. et van NOORDEN, C. J. (2017). *In silico* gene expression analysis reveals glycolysis and acetate anaplerosis in *IDH1* wild-type glioma and lactate and glutamate anaplerosis in *IDH1* -mutated glioma. *Oncotarget*, 8(30):49165–49177. [Cité page 65.](#)
- [Kim *et al.*, 2013] KIM, M.-H., YAMAYOSHI, I., MATHEW, S., LIN, H., NAYFACH, J. et SIMON, S. I. (2013). Magnetic nanoparticle targeted hyperthermia of cutaneous Staphylococcus aureus infection. *Annals of Biomedical Engineering*, 41(3):598–609. [Cité page 17.](#)
- [Kim *et al.*, 2020] KIM, S., CHOUNG, S., SUN, R. X., UNG, N., HASHEMI, N., FONG, E. J., LAU, R., SPILLER, E., GASHO, J., FOO, J. et MUMENTHALER, S. M. (2020). Comparison of Cell and Organoid-Level Analysis of Patient-Derived 3D Organoids to Evaluate Tumor Cell Growth Dynamics and Drug Response. *SLAS discovery : advancing life sciences R & D*, 25(7):744–754. [Cité page 123.](#)
- [Kleinman *et al.*, 1982] KLEINMAN, H. K., MCGARVEY, M. L., LIOTTA, L. A., ROBEY, P. G., TRYGGVASON, K. et MARTIN, G. R. (1982). Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry*, 21(24):6188–6193. [Cité page 122.](#)
- [Kola et Landis, 2004] KOLA, I. et LANDIS, J. (2004). Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(8):711–716. Number : 8 Publisher : Nature Publishing Group. [Cité page 122.](#)
- [Kosmidis *et al.*, 2021] KOSMIDIS, S., NEGREAN, A., DRANOVSKY, A., LOSONCZY, A. et KANDEL, E. R. (2021). Fast 3D Clear : A Fast, Aqueous, Reversible Three-Day Tissue Clearing Method for Adult and Embryonic Mouse Brain and Whole Body. preprint, Cell Biology. [Cité page 199.](#)
- [Krause, 1987] KRAUSE, F. (1987). Rosensweig, R. E., Ferrohydrodynamics. Cambridge etc., Cambridge University Press 1985. XI, 344 S., £ 45.00 B/C/ H/c. \$ 69.50. ISBN 0 521 25 624 0 (Cambridge Monographs on Mechanics and Applied Mathematics). *ZAMM - Journal of Applied Mathematics and Mechanics / Zeitschrift für Angewandte Mathematik und Mechanik*, 67(6):279–279. [Cité page 22.](#)
- [Kuhara *et al.*, 2009] KUHARA, M., YOSHINO, T., SHIOKAWA, M., OKABE, T., MIZOGUCHI, S., YABUHARA, A., TAKEYAMA, H. et MATSUNAGA, T. (2009). Magnetic separation of human podocalyxin-like protein 1 (hPCLP1)-positive cells from peripheral blood and umbilical cord blood using anti-hPCLP1 monoclonal antibody and protein A expressed on bacterial magnetic particles. *Cell Structure and Function*, 34(1):23–30. [Cité page 17.](#)
- [Lai *et al.*, 2018] LAI, H. M., LIU, A. K. L., NG, H. H. M., GOLDFINGER, M. H., CHAU, T. W., DEFELICE, J., TILLEY, B. S., WONG, W. M., WU, W. et GENTLEMAN, S. M. (2018). Next generation histology methods for three-dimensional imaging of fresh and archival human brain tissues. *Nature Communications*, 9:1066. [Cité page 199.](#)

- [Lakka et Rao, 2008] LAKKA, S. S. et RAO, J. S. (2008). Antiangiogenic therapy in brain tumors. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 8(10):1457–1473. [Cité page 11.](#)
- [Le et al., 2003] LE, D. M., BESSON, A., FOGG, D. K., CHOI, K.-S., WAISMAN, D. M., GOODYER, C. G., REWCASTLE, B. et YONG, V. W. (2003). Exploitation of Astrocytes by Glioma Cells to Facilitate Invasiveness : A Mechanism Involving Matrix Metalloproteinase-2 and the Urokinase-Type Plasminogen Activator–Plasmin Cascade. *The Journal of Neuroscience*, 23(10):4034–4043. [Cité page 52.](#)
- [Le Fèvre et al., 2017] LE FÈVRE, R., DURAND-DUBIEF, M., CHEBBI, I., MANDAWALA, C., LAGROIX, F., VALET, J.-P., IDBAIH, A., ADAM, C., DELATTRE, J.-Y., SCHMITT, C., MAAKE, C., GUYOT, F. et ALPHANDÉRY, E. (2017). Enhanced antitumor efficacy of biocompatible magnetosomes for the magnetic hyperthermia treatment of glioblastoma. *Theranostics*, 7(18):4618–4631. [Cité page 17.](#)
- [Le Joncour et al., 2021] LE JONCOUR, V., GUICHET, P.-O., DEMBÉLÉ, K.-P., MUTEL, A., CAMPISI, D., PERZO, N., DESRUES, L., MODZELEWSKI, R., COURAUD, P.-O., HONNORAT, J., FERRACCI, F.-X., MARGUET, F., LAQUERRIÈRE, A., VERA, P., BOHN, P., LANGLOIS, O., MORIN, F., GANDOLFO, P. et CASTEL, H. (2021). Targeting the Urotensin II/UT G Protein-Coupled Receptor to Counteract Angiogenesis and Mesenchymal Hypoxia/Necrosis in Glioblastoma. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9:652544. [2 citations pages 11 and 149.](#)
- [Lebedev et al., 2018] LEBEDEV, V., ARKAEV, M., DREMOVA, M., POZDNIAKOV, I. et SHESTIBRATOV, K. (2018). Effects of Growth Regulators and Gelling Agents on Ex Vitro Rooting of Raspberry. *Plants (Basel, Switzerland)*, 8(1):3. [Cité page 160.](#)
- [Lee et al., 2015] LEE, S., AHN, J.-H., CHOI, H., SEO, J. M., CHO, D. et KOO, K. (2015). Natural magnetic nanoparticle containing droplet for smart drug delivery and heat treatment. *Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual International Conference*, 2015:3541–3544. [Cité page 17.](#)
- [Lefèvre et Bazylinski, 2013] LEFÈVRE, C. T. et BAZYLINSKI, D. A. (2013). Ecology, diversity, and evolution of magnetotactic bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 77(3):497–526. [Cité page 16.](#)
- [Levin-Allerhand et al., 2003] LEVIN-ALLERHAND, J. A., SOKOL, K. et SMITH, J. D. (2003). Safe and Effective Method for Chronic 17-Estradiol Administration to Mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 42(6):33–35. [Cité page 166.](#)
- [Li et al., 2010] LI, F., VIJAYASANKARAN, N., SHEN, A. Y., KISS, R. et AMANULLAH, A. (2010). Cell culture processes for monoclonal antibody production. *mAbs*, 2(5):466–477. [Cité page 122.](#)
- [Li et al., 2021] LI, N., QIU, S., FANG, Y., WU, J. et LI, Q. (2021). Comparison of Linear vs. Cyclic RGD Pentapeptide Interactions with Integrin $\alpha\beta3$ by Molecular Dynamics Simulations. *Biology*, 10(7):688. [Cité page 75.](#)
- [Li et al., 2008] LI, Y., SONG, Y., ZHAO, L., GAIDOSH, G., LATIES, A. M. et WEN, R. (2008). Direct labeling and visualization of blood vessels with lipophilic carbocyanine dye DiI. *Nature Protocols*, 3(11):1703–1708. [2 citations pages 173 and 193.](#)

- [Liebmann *et al.*, 2016] LIEBMANN, T., RENIER, N., BETTAYEB, K., GREENGARD, P., TESSIER-LAVIGNE, M. et FLAJOLET, M. (2016). Three-Dimensional Study of Alzheimer's Disease Hallmarks Using the iDISCO Clearing Method. *Cell Reports*, 16(4):1138–1152. [2 citations pages 172 and 173.](#)
- [Lin *et al.*, 2016] LIN, L., WANG, G., MING, J., MENG, X., HAN, B., SUN, B., CAI, J. et JIANG, C. (2016). Analysis of expression and prognostic significance of vimentin and the response to temozolomide in glioma patients. *Tumor Biology*, 37(11):15333–15339. [Cité page 63.](#)
- [Lins de Barros *et al.*, 1990] Lins de BARROS, H. G., ESQUIVEL, D. M. et FARINA, M. (1990). Magnetotaxis. *Science Progress*, 74(295 Pt 3):347–359. [Cité page 15.](#)
- [Litton *et al.*, 2019] LITTON, J. K., BURSTEIN, H. J. et TURNER, N. C. (2019). Molecular Testing in Breast Cancer. *American Society of Clinical Oncology Educational Book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting*, 39:e1–e7. [Cité page 78.](#)
- [Liu *et al.*, 2016] LIU, A. K. L., HURRY, M. E. D., NG, O. W., DEFELICE, J., LAI, H. M., PEARCE, R. K. B., WONG, G. T., CHANG, R. C. et GENTLEMAN, S. M. (2016). Bringing CLARITY to the human brain : visualization of Lewy pathology in three dimensions. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 42(6):573–587. [Cité page 172.](#)
- [Liu *et al.*, 2013a] LIU, K.-C., LIN, B.-S., ZHAO, M., YANG, X.-y., CHEN, M., GAO, A.-d., QUE, J.-w. et LAN, X.-P. (2013a). The multiple roles for Sox2 in stem cell maintenance and tumorigenesis. *Cellular signalling*, 25(5):10.1016/j.cellsig.2013.02.013. [Cité page 60.](#)
- [Liu *et al.*, 2009] LIU, Q., NGUYEN, D. H., DONG, Q., SHITAKU, P., CHUNG, K., LIU, O. Y., TSO, J. L., LIU, J. Y., KONKANKIT, V., CLOUGHESY, T. F., MISCHEL, P. S., LANE, T. F., LIAU, L. M., NELSON, S. F. et TSO, C.-L. (2009). Molecular properties of CD133+ glioblastoma stem cells derived from treatment-refractory recurrent brain tumors. *Journal of Neuro-Oncology*, 94(1):1–19. [Cité page 12.](#)
- [Liu et Chen, 2018] LIU, Y. et CHEN, Y.-G. (2018). 2D- and 3D-Based Intestinal Stem Cell Cultures for Personalized Medicine. *Cells*, 7(12):225. [Cité page 123.](#)
- [Liu *et al.*, 2019] LIU, Y., LIU, T., LEI, T., ZHANG, D., DU, S., GIRANI, L., QI, D., LIN, C., TONG, R. et WANG, Y. (2019). RIP1/RIP3-regulated necroptosis as a target for multifaceted disease therapy (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 44(3):771–786. [Cité page 51.](#)
- [Liu *et al.*, 2013b] LIU, Y.-A., PAN, S.-T., HOU, Y.-C., SHEN, M.-Y., PENG, S.-J., TANG, S.-C. et CHUNG, Y.-C. (2013b). 3-D Visualization and Quantitation of Microvessels in Transparent Human Colorectal Carcinoma. *PLoS ONE*, 8(11):e81857. [Cité page 173.](#)
- [Lloyd-Lewis *et al.*, 2016] LLOYD-LEWIS, B., DAVIS, F. M., HARRIS, O. B., HITCHCOCK, J. R., LOURENCO, F. C., PASCHE, M. et WATSON, C. J. (2016). Imaging the mammary gland and mammary tumours in 3D : optical tissue clearing and immunofluorescence methods. *Breast Cancer Research*, 18(1):127. [2 citations pages 8 and 172.](#)
- [Longin *et al.*, 1993] LONGIN, A., SOUCHIER, C., FFRENCH, M. et BRYON, P. A. (1993). Comparison of anti-fading agents used in fluorescence microscopy : image analysis and laser confocal microscopy study. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 41(12):1833–1840. [Cité page 183.](#)

- [Lorger *et al.*, 2009] LORGER, M., KRUEGER, J. S., O'NEAL, M., STAFLIN, K. et FELDING-HABERMANN, B. (2009). Activation of tumor cell integrin $\alpha_3\beta_1$ controls angiogenesis and metastatic growth in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(26): 10666–10671. [Cité page 11.](#)
- [Lu *et al.*, 2003] LU, J., FAN, J., XU, R., ROY, S., ALI, N. et GAO, Y. (2003). Synthesis of alkyl sulfonate/alcohol-protected γ -Fe₂O₃ nanocrystals with narrow size distributions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 258(2):427–431. [Cité page 22.](#)
- [Lu et Martel, 2006] LU, Z. et MARTEL, S. (2006). Preliminary Investigation of Bio-carriers Using Magnetotactic Bacteria. In *2006 International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, pages 3415–3418. ISSN : 1557-170X. [Cité page 17.](#)
- [Lubetzki *et al.*, 1993] LUBETZKI, C., DEMERENS, C., ANGLADE, P., VILLARROYA, H., FRANKFURTER, A., LEE, V. M. et ZALC, B. (1993). Even in culture, oligodendrocytes myelinate solely axons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(14):6820–6824. [Cité page 122.](#)
- [Lugo-Hernandez *et al.*, 2017] LUGO-HERNANDEZ, E., SQUIRE, A., HAGEMANN, N., BRENZEL, A., SARDARI, M., SCHLECHTER, J., SANCHEZ-MENDOZA, E. H., GUNZER, M., FAISSNER, A. et HERMANN, D. M. (2017). 3D visualization and quantification of microvessels in the whole ischemic mouse brain using solvent-based clearing and light sheet microscopy. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 37(10):3355–3367. [2 citations pages 173 and 194.](#)
- [Luo *et al.*, 2019] LUO, H., ROSSI, E., SAUBAMEA, B., CHASSEIGNEAUX, S., COCHOIS, V., CHOUBLIER, N., SMIRNOVA, M., GLACIAL, F., PERRIÈRE, N., BOURDOULOUS, S., SMADJA, D. M., MENET, M.-C., COURAUD, P.-O., CISTERMINO, S. et DECLÈVES, X. (2019). Cannabidiol Increases Proliferation, Migration, Tubulogenesis, and Integrity of Human Brain Endothelial Cells through TRPV2 Activation. *Molecular Pharmaceutics*, 16(3):1312–1326. [Cité page 149.](#)
- [Ma *et al.*, 2018] MA, L., ZHANG, B., ZHOU, C., LI, Y., LI, B., YU, M., LUO, Y., GAO, L., ZHANG, D., XUE, Q., QIU, Q., LIN, B., ZOU, J. et YANG, H. (2018). The comparison genomics analysis with glioblastoma multiforme (GBM) cells under 3D and 2D cell culture conditions. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 172:665–673. [Cité page 122.](#)
- [Ma *et al.*, 2016] MA, S., HENSON, E., CHEN, Y. et GIBSON, S. (2016). Ferroptosis is induced following siramesine and lapatinib treatment of breast cancer cells. *Cell death & disease*, 7:e2307. [Cité page 85.](#)
- [MacCumber *et al.*, 1990] MACCUMBER, M. W., ROSS, C. A. et SNYDER, S. H. (1990). Endothelin in brain : receptors, mitogenesis, and biosynthesis in glial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(6):2359–2363. [Cité page 122.](#)
- [Mai *et al.*, 2017] MAI, T. T., HAMAĬ, A., HIENZSCH, A., CAÑEQUE, T., MÜLLER, S., WICINSKI, J., CABAUD, O., LEROY, C., DAVID, A., ACEVEDO, V., RYO, A., GINESTIER, C., BIRNBAUM, D., CHARAFE-JAUFFRET, E., CODOGNO, P., MEHRPOUR, M. et RODRIGUEZ, R. (2017). Salinomycin kills cancer stem cells by sequestering iron in lysosomes. *Nature Chemistry*, 9(10):1025–1033. [Cité page 12.](#)

- [Mandarini *et al.*, 2020] MANDARINI, E., TOLLAPI, E., ZANCHI, M., DEPAU, L., PINI, A., BRUNETTI, J., BRACCI, L. et FALCIANI, C. (2020). Endocytosis and Trafficking of Heparan Sulfate Proteoglycans in Triple-Negative Breast Cancer Cells Unraveled with a Polycationic Peptide. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21):8282. [Cité page 85.](#)
- [Mannucci *et al.*, 2014] MANNUCCI, S., GHIN, L., CONTI, G., TAMBALO, S., LASCIALFARI, A., ORLANDO, T., BENATI, D., BERNARDI, P., BETTERLE, N., BASSI, R., MARZOLA, P. et SBARBATI, A. (2014). Magnetic Nanoparticles from *Magnetospirillum gryphiswaldense* Increase the Efficacy of Thermo-therapy in a Model of Colon Carcinoma. *PLoS ONE*, 9(10):e108959. [Cité page 17.](#)
- [Mao et Unadkat, 2014] MAO, Q. et UNADKAT, J. D. (2014). Role of the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in Drug Transport—an Update. *The AAPS Journal*, 17(1):65–82. [Cité page 61.](#)
- [Maqbool *et al.*, 2022] MAQBOOL, M., BEKELE, F. et FEKADU, G. (2022). Treatment Strategies Against Triple-Negative Breast Cancer : An Updated Review. *Breast Cancer (Dove Medical Press)*, 14:15–24. [Cité page 167.](#)
- [Martel *et al.*, 2009] MARTEL, S., FELFOUL, O., MATHIEU, J.-B., CHANU, A., TAMAZ, S., MOHAMMADI, M., MANKIEWICZ, M. et TABATABAEI, N. (2009). MRI-based Medical Nanorobotic Platform for the Control of Magnetic Nanoparticles and Flagellated Bacteria for Target Interventions in Human Capillaries. *The International Journal of Robotics Research*, 28(9):1169–1182. [2 citations pages 17 and 75.](#)
- [Martinez et Gordon, 2014] MARTINEZ, F. O. et GORDON, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation : time for reassessment. *F1000Prime Reports*, 6. [Cité page 52.](#)
- [Marty *et al.*, 2011] MARTY, B., GEFFROY, F., DJEMAI, B., THEZE, B., PERRIN, A., ROBIC, C., PORT, M., ROBERT, P., BIHAN, D. L., LETHIMONNIER, F. et MÉRIAUX, S. (2011). Quantitative molecular MR imaging of U87 brain tumor angiogenesis using a novel RGD Gd-based emulsion. *Proc. 4th WMIC*, page 1. [Cité page 4.](#)
- [Massart, 1981] MASSART, R. (1981). Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Transactions on Magnetics*, 17(2):1247–1248. Conference Name : IEEE Transactions on Magnetics. [Cité page 22.](#)
- [Matsunaga et Arakaki, 2007] MATSUNAGA, T. et ARAKAKI, A. (2007). Molecular Bioengineering of Bacterial Magnetic Particles for Biotechnological Applications. In SCHÜLER, D., éditeur : *Magnetoreception and Magnetosomes in Bacteria*, Microbiology Monographs, pages 227–254. Springer, Berlin, Heidelberg. [Cité page 17.](#)
- [Matsunaga et Kamiya, 1987] MATSUNAGA, T. et KAMIYA, S. (1987). Use of magnetic particles isolated from magnetotactic bacteria for enzyme immobilization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 26(4). [Cité page 17.](#)
- [Mattern *et al.*, 2005] MATTERN, R.-H., READ, S. B., PIERSCHBACHER, M. D., SZE, C.-I., ELICEIRI, B. P. et KRUSE, C. A. (2005). Glioma cell integrin expression and their interactions with integrin antagonists. *Cancer therapy*, 3A:325–340. [Cité page 11.](#)
- [McCarthy *et al.*, 2021] MCCARTHY, A. M., FRIEBEL-KLINGNER, T., EHSAN, S., HE, W., WELCH, M., CHEN, J., KONTOS, D., DOMCHEK, S. M., CONANT, E. F., SEMINE, A.,

- HUGHES, K., BARDIA, A., LEHMAN, C. et ARMSTRONG, K. (2021). Relationship of established risk factors with breast cancer subtypes. *Cancer Medicine*, 10(18):6456–6467. [Cité page 78.](#)
- [Meredith *et al.*, 2014] MEREDITH, R. F., TORGUE, J., AZURE, M. T., SHEN, S., SADDEKNI, S., BANAGA, E., CARLISE, R., BUNCH, P., YODER, D. et ALVAREZ, R. (2014). Pharmacokinetics and Imaging of ^{212}Pb -TCMC-Trastuzumab After Intraperitoneal Administration in Ovarian Cancer Patients. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 29(1):12–17. [Cité page 80.](#)
- [Miller et Rothstein, 2016] MILLER, S. J. et ROTHSTEIN, J. D. (2016). Astroglia in Thick Tissue with Super Resolution and Cellular Reconstruction. *PLOS ONE*, 11(8):e0160391. [Cité page 173.](#)
- [Mitchell *et al.*, 2020] MITCHELL, K., TROIKE, K., SILVER, D. J. et LATHIA, J. D. (2020). The evolution of the cancer stem cell state in glioblastoma : emerging insights into the next generation of functional interactions. *Neuro-Oncology*, 23(2):199–213. [Cité page 60.](#)
- [Moasser, 2007] MOASSER, M. M. (2007). The oncogene HER2; Its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*, 26(45):6469–6487. [Cité page 78.](#)
- [Moccia *et al.*, 2019] MOCCIA, F., NEGRI, S., SHEKHA, M., FARIS, P. et GUERRA, G. (2019). Endothelial Ca^{2+} Signaling, Angiogenesis and Vasculogenesis : Just What It Takes to Make a Blood Vessel. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(16):3962. Number : 16 Publisher : Multidisciplinary Digital Publishing Institute. [Cité page 149.](#)
- [Moosmayer *et al.*, 2021] MOOSMAYER, D., HILPMANN, A., HOFFMANN, J., SCHNIRCH, L., ZIMMERMANN, K., BADOCK, V., FURST, L., EATON, J. K., VISWANATHAN, V. S., SCHREIBER, S. L., GRADL, S. et HILLIG, R. C. (2021). Crystal structures of the selenoprotein glutathione peroxidase 4 in its apo form and in complex with the covalently bound inhibitor ML162. *Acta Crystallographica. Section D, Structural Biology*, 77(Pt 2):237–248. [Cité page 75.](#)
- [Moulson *et al.*, 2021] MOULSON, A. J., SQUAIR, J. W., FRANKLIN, R. J. M., TETZLAFF, W. et ASSINCK, P. (2021). Diversity of Reactive Astrogliosis in CNS Pathology : Heterogeneity or Plasticity? *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15:703810. [Cité page 52.](#)
- [Moy *et al.*, 2013] MOY, A. J., WIERSMA, M. P. et CHOI, B. (2013). Optical Histology : A Method to Visualize Microvasculature in Thick Tissue Sections of Mouse Brain. *PLoS ONE*, 8(1):e53753. [Cité page 173.](#)
- [Muir *et al.*, 2020] MUIR, M., GOPAKUMAR, S., TRAYLOR, J., LEE, S. et RAO, G. (2020). Glioblastoma multiforme : novel therapeutic targets. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 24(7):605–614. [Cité page 13.](#)
- [Musah-Eroje et Watson, 2019] MUSAH-EROJE, A. et WATSON, S. (2019). A novel 3D in vitro model of glioblastoma reveals resistance to temozolomide which was potentiated by hypoxia. *Journal of Neuro-Oncology*, 142(2):231–240. [Cité page 123.](#)
- [Ménard *et al.*, 2000] MÉNARD, S., TAGLIABUE, E., CAMPIGLIO, M. et PUPA, S. M. (2000). Role of HER2 gene overexpression in breast carcinoma. *Journal of Cellular Physiology*, 182(2):150–162.

_eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/%28SICI%291097-4652%28200002%29182%3A2%3C150%3A%3AAID-JCP3%3E3.0.CO%3B2-E>.

Cité page 78.

- [Mériaux *et al.*, 2015] MÉRIAUX, S., BOUCHER, M., MARTY, B., LALATONNE, Y., PRÉVÉRAL, S., MOTTE, L., LEFÈVRE, C. T., GEFFROY, F., LETHIMONNIER, F., PÉAN, M., GARCIA, D., ADRYANCZYK-PERRIER, G., PIGNOL, D. et GINET, N. (2015). Magnetosomes, Biogenic Magnetic Nanomaterials for Brain Molecular Imaging with 17.2 T MRI Scanner. *Advanced Healthcare Materials*, 4(7):1076–1083. *2 citations pages 6 and 18.*
- [Müller *et al.*, 2020] MÜLLER, S., SINDIKUBWABO, F., CAÑEQUE, T., LAFON, A., VERSINI, A., LOMBARD, B., LOEW, D., WU, T.-D., GINESTIER, C., CHARAFE-JAUFFRET, E., DURAND, A., VALLOT, C., BAULANDE, S., SERVANT, N. et RODRIGUEZ, R. (2020). CD44 regulates epigenetic plasticity by mediating iron endocytosis. *Nature chemistry*, 12(10):929–938. *2 citations pages 12 and 85.*
- [Nairz *et al.*, 2017] NAIRZ, M., THEURL, I., SWIRSKI, F. K. et WEISS, G. (2017). “Pumping iron”—how macrophages handle iron at the systemic, microenvironmental, and cellular levels. *Pflugers Archiv*, 469(3):397–418. *Cité page 50.*
- [Nakamura *et al.*, 1993] NAKAMURA, N., BURGESS, J. G., YAGIUDA, K., KUDO, S., SAKAGUCHI, T. et MATSUNAGA, T. (1993). Detection and removal of *Escherichia coli* using fluorescein isothiocyanate conjugated monoclonal antibody immobilized on bacterial magnetic particles. *Analytical Chemistry*, 65(15):2036–2039. *Cité page 17.*
- [Natarajan *et al.*, 2012] NATARAJAN, K., XIE, Y., BAER, M. R. et ROSS, D. D. (2012). Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance. *Biochemical Pharmacology*, 83(8):1084–1103. *Cité page 61.*
- [Neckel *et al.*, 2016] NECKEL, P. H., MATTHEUS, U., HIRT, B., JUST, L. et MACK, A. F. (2016). Large-scale tissue clearing (PACT) : Technical evaluation and new perspectives in immunofluorescence, histology and ultrastructure. *Scientific Reports*, 6(1):34331. *Cité page 172.*
- [Nelson et Chen, 2002] NELSON, C. M. et CHEN, C. S. (2002). Cell-cell signaling by direct contact increases cell proliferation via a PI3K-dependent signal. *FEBS Letters*, 514(2-3):238–242. *Cité page 122.*
- [Nguemgo Kouam *et al.*, 2018] NGUEMGO KOUAM, P., REZNICZEK, G. A., KOCHANNECK, A., PRIESCH-GRZESZKOWIAK, B., HERO, T., ADAMIETZ, I. A. et BÜHLER, H. (2018). Robo1 and vimentin regulate radiation-induced motility of human glioblastoma cells. *PLoS ONE*, 13(6):e0198508. *2 citations pages 12 and 63.*
- [Nima *et al.*, 2019] NIMA, Z. A., WATANABE, F., JAMSHIDI-PARSIAN, A., SARIMOLLAOGLU, M., NEDOSEKIN, D. A., HAN, M., WATTS, J. A., BIRIS, A. S., ZHAROV, V. P. et GALANZHA, E. I. (2019). Bioinspired magnetic nanoparticles as multimodal photoacoustic, photothermal and photomechanical contrast agents. *Scientific Reports*, 9(1):887. *Cité page 17.*
- [Nowicki *et al.*, 2019] NOWICKI, M. O., HAYES, J. L., CHIOCCA, E. A. et LAWLER, S. E. (2019). Proteomic Analysis Implicates Vimentin in Glioblastoma Cell Migration. *Cancers*, 11(4):466. *Cité page 63.*

- [Odenbach, 2003] ODENBACH, S. (2003). Ferrofluids-magnetically controlled suspensions. *Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*, 1-3(217):171–178. [Cité page 22.](#)
- [Ohgaki et Kleihues, 2007] OHGAKI, H. et KLEIHUES, P. (2007). Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *The American Journal of Pathology*, 170(5):1445–1453. [Cité page 11.](#)
- [Okumura et al., 1989] OKUMURA, N., TAKIMOTO, K., OKADA, M. et NAKAGAWA, H. (1989). C6 glioma cells produce basic fibroblast growth factor that can stimulate their own proliferation. *Journal of Biochemistry*, 106(5):904–909. [Cité page 122.](#)
- [O’Neill et al., 1983] O’NEILL, M. A., SELVENDRAN, R. R. et MORRIS, V. J. (1983). Structure of the acidic extracellular gelling polysaccharide produced by *Pseudomonas elodea*. *Carbohydrate Research*, 124(1):123–133. [Cité page 160.](#)
- [Orlando et al., 2016] ORLANDO, T., MANNUCCI, S., FANTECHI, E., CONTI, G., TAMBALO, S., BUSATO, A., INNOCENTI, C., GHIN, L., BASSI, R., AROSIO, P., ORSINI, F., SANGREGORIO, C., CORTI, M., CASULA, M. F., MARZOLA, P., LASCIALFARI, A. et SBARBATI, A. (2016). Characterization of magnetic nanoparticles from *Magnetospirillum Gryphiswaldense* as potential theranostics tools. *Contrast Media & Molecular Imaging*, 11(2):139–145. [Cité page 17.](#)
- [Osborne et al., 2003] OSBORNE, C. K., BARDOU, V., HOPP, T. A., CHAMNESS, G. C., HILSENBECK, S. G., FUQUA, S. A. W., WONG, J., ALLRED, D. C., CLARK, G. M. et SCHIFF, R. (2003). Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 95(5):353–361. [Cité page 78.](#)
- [Osswald et al., 2015] OSSWALD, M., JUNG, E., SAHM, F., SOLECKI, G., VENKATARAMANI, V., BLAES, J., WEIL, S., HORSTMANN, H., WIESTLER, B., SYED, M., HUANG, L., RATLIFF, M., KARIMIAN JAZI, K., KURZ, F. T., SCHMENGER, T., LEMKE, D., GÖMMEL, M., PAULI, M., LIAO, Y., HÄRING, P., PUSCH, S., HERL, V., STEINHÄUSER, C., KRUNIC, D., JARAHIAN, M., MILETIC, H., BERGHOF, A. S., GRIESBECK, O., KALAMAKIS, G., GARASCHUK, O., PREUSSER, M., WEISS, S., LIU, H., HEILAND, S., PLATTEN, M., HUBER, P. E., KUNER, T., von DEIMLING, A., WICK, W. et WINKLER, F. (2015). Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network. *Nature*, 528(7580):93–98. [Cité page 11.](#)
- [Ota et al., 2003] OTA, H., TAKEYAMA, H., NAKAYAMA, H., KATOH, T. et MATSUNAGA, T. (2003). SNP detection in transforming growth factor-beta1 gene using bacterial magnetic particles. *Biosensors & Bioelectronics*, 18(5-6):683–687. [Cité page 17.](#)
- [Pafumi et al., 2015] PAFUMI, I., FAVIA, A., GAMBARA, G., PAPACCI, F., ZIPARO, E., PALOMBI, F. et FILIPPINI, A. (2015). Regulation of Angiogenic Functions by Angiopoietins through Calcium-Dependent Signaling Pathways. *BioMed Research International*, 2015:965271. [Cité page 149.](#)
- [Page et al., 2022] PAGE, D. B., BEAL, K., LINCH, S. N., SPINELLI, K. J., RODINE, M., HALPENNY, D., MODI, S., PATIL, S., YOUNG, R. J., KALEY, T., MERGHOU, T., REDMOND, D., WONG, P., BARKER, C. A., DIAB, A., NORTON, L. et MCARTHUR, H. L.

- (2022). Brain radiotherapy, tremelimumab-mediated CTLA-4-directed blockade +/ trastuzumab in patients with breast cancer brain metastases. *NPJ Breast Cancer*, 8:50. [2 citations pages 78 and 79.](#)
- [Palmer *et al.*, 1997] PALMER, T. D., TAKAHASHI, J. et GAGE, F. H. (1997). The Adult Rat Hippocampus Contains Primordial Neural Stem Cells. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 8(6):389–404. [Cité page 12.](#)
- [Pan *et al.*, 2016] PAN, C., CAI, R., QUACQUARELLI, F. P., GHASEMIGHARAGOZ, A., LOURBOPOULOS, A., MATRYBA, P., PLESNILA, N., DICHGANS, M., HELLAL, F. et ERTÜRK, A. (2016). Shrinkage-mediated imaging of entire organs and organisms using uDISCO. *Nature Methods*, 13(10):859–867. [3 citations pages 172, 173, and 177.](#)
- [Pankratova *et al.*, 2018] PANKRATOVA, S., KLINGELHOFER, J., DMYTRIYEVA, O., OWCZAREK, S., RENZIEHAUSEN, A., SYED, N., PORTER, A. E., DEXTER, D. T. et KIRYUSHKO, D. (2018). The S100A4 Protein Signals through the ErbB4 Receptor to Promote Neuronal Survival. *Theranostics*, 8(14):3977–3990. [Cité page 64.](#)
- [Papadakis *et al.*, 2016] PAPADAKIS, E., ROBSON, N., YEOMANS, A., BAILEY, S., LAVER-SIN, S., BEERS, S., SAYAN, A. E., ASHTON-KEY, M., SCHWAIGER, S., STUPPNER, H., TROPFMAIR, J., PACKHAM, G. et CUTRESS, R. (2016). A combination of trastuzumab and BAG-1 inhibition synergistically targets HER2 positive breast cancer cells. *Oncotarget*, 7(14):18851–18864. [Cité page 79.](#)
- [Parsons *et al.*, 2008] PARSONS, D. W., JONES, S., ZHANG, X., LIN, J. C.-H., LEARY, R. J., ANGENENDT, P., MANKOO, P., CARTER, H., SIU, I.-M., GALLIA, G. L., OLIVI, A., MCLENDON, R., RASHEED, B. A., KEIR, S., NIKOLSKAYA, T., NIKOLSKY, Y., BUSAM, D. A., TEKLEAB, H., DIAZ, L. A., HARTIGAN, J., SMITH, D. R., STRAUSBERG, R. L., MARRIE, S. K. N., SHINJO, S. M. O., YAN, H., RIGGINS, G. J., BIGNER, D. D., KARCHIN, R., PAPADOPOULOS, N., PARMIGIANI, G., VOGELSTEIN, B., VELCULESCU, V. E. et KINZLER, K. W. (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5897):1807–1812. [Cité page 11.](#)
- [Pasqualini *et al.*, 2020] PASQUALINI, C., KOZAKI, T., BRUSCHI, M., NGUYEN, T. H. H., MINARD-COLIN, V., CASTEL, D., GRILL, J. et GINHOUX, F. (2020). Modeling the Interaction between the Microenvironment and Tumor Cells in Brain Tumors. *Neuron*, 108(6):1025–1044. [Cité page 52.](#)
- [Pathak *et al.*, 2011] PATHAK, A. P., KIM, E., ZHANG, J. et JONES, M. V. (2011). Three-Dimensional Imaging of the Mouse Neurovasculature with Magnetic Resonance Microscopy. *PLoS ONE*, 6(7):e22643. [Cité page 195.](#)
- [Pavoni *et al.*, 2018a] PAVONI, S., JARRAY, R., NASSOR, F., GUYOT, A.-C., COTTIN, S., RONTARD, J., MIKOL, J., MABONDZO, A., DESLYS, J.-P. et YATES, F. (2018a). Small-molecule induction of A β -42 peptide production in human cerebral organoids to model Alzheimer’s disease associated phenotypes. *PLoS ONE*, 13(12):e0209150. [Cité page 122.](#)
- [Pavoni *et al.*, 2018b] PAVONI, S., JARRAY, R., NASSOR, F., GUYOT, A.-C., COTTIN, S., RONTARD, J., MIKOL, J., MABONDZO, A., DESLYS, J.-P. et YATES, F. (2018b). Small-molecule induction of A β -42 peptide production in human cerebral organoids to model Alzheimer’s disease associated phenotypes. *PLoS ONE*, 13(12):e0209150. [Cité page 169.](#)

- [Pearse *et al.*, 2009] PEARSE, G., FRITH, J., RANDALL, K. J. et KLINOWSKA, T. (2009). Urinary Retention and Cystitis Associated with Subcutaneous Estradiol Pellets in Female Nude Mice. *Toxicologic Pathology*, 37(2):227–234. Publisher : SAGE Publications Inc. [Cité page 166.](#)
- [Pickl et Ries, 2009] PICKL, M. et RIES, C. H. (2009). Comparison of 3D and 2D tumor models reveals enhanced HER2 activation in 3D associated with an increased response to trastuzumab. *Oncogene*, 28(3):461–468. [Cité page 122.](#)
- [Pinto *et al.*, 2021] PINTO, G., Saenz-de SANTA-MARIA, I., CHASTAGNER, P., PERTHAME, E., DELMAS, C., TOULAS, C., MOYAL-JONATHAN-COHEN, E., BROU, C. et ZURZOLO, C. (2021). Patient-derived glioblastoma stem cells transfer mitochondria through tunneling nanotubes in tumor organoids. *Biochemical Journal*, 478(1):21–39. [Cité page 169.](#)
- [Plan Sangnier *et al.*, 2018] PLAN SANGNIER, A., PREVERAL, S., CURCIO, A., K A SILVA, A., LEFÈVRE, C. T., PIGNOL, D., LALATONNE, Y. et WILHELM, C. (2018). Targeted thermal therapy with genetically engineered magnetite magnetosomes@RGD : Photothermia is far more efficient than magnetic hyperthermia. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 279:271–281. [Cité page 17.](#)
- [Plessier *et al.*, 2017] PLESSIER, A., LE DRET, L., VARLET, P., BECCARIA, K., LACOMBE, J., MÉRIAUX, S., GEFFROY, F., FIETTE, L., FLAMANT, P., CHRÉTIEN, F., BLAUWBLOMME, T., PUGET, S., GRILL, J., DEBILY, M.-A. et CASTEL, D. (2017). New *in vivo* avatars of diffuse intrinsic pontine gliomas (DIPG) from stereotactic biopsies performed at diagnosis. *Oncotarget*, 8(32):52543–52559. [Cité page 5.](#)
- [Preveral, 2019] PREVERAL, S. (2019). *Ingénierie et utilisation des magnétosomes pour des applications médicales*. These de doctorat, Aix-Marseille. [Cité page 72.](#)
- [Preveral *et al.*, 2014] PREVERAL, S., ADRYANCZYK-PERRIER, G., GEFFROY, F., PÉAN, M., BOUCHER, M., LEFÈVRE, C. T., GARCIA, D., MÉRIAUX, S., PIGNOL, D. et GINET, N. (2014). RGD-functionalized magnetosomes, a contrast agent with molecular affinity for diagnostic in Magnetic Resonance Imaging. Rio de Janeiro, Brazil. [Cité page 6.](#)
- [Qi *et al.*, 2016] QI, L., LV, X., ZHANG, T., JIA, P., YAN, R., LI, S., ZOU, R., XUE, Y. et DAI, L. (2016). Cytotoxicity and genotoxicity of bacterial magnetosomes against human retinal pigment epithelium cells. *Scientific Reports*, 6:26961. [Cité page 74.](#)
- [Qi *et al.*, 2019] QI, Y., YU, T., XU, J., WAN, P., MA, Y., ZHU, J., LI, Y., GONG, H., LUO, Q. et ZHU, D. (2019). FDISCO : Advanced solvent-based clearing method for imaging whole organs. *Science Advances*, 5(1):eaau8355. [Cité page 199.](#)
- [Rao *et al.*, 2018] RAO, S., RAJKUMAR, A., SUNDARAM, S., JOYCE, M. et DUVURU, P. (2018). Yet another utility for isocitrate dehydrogenase-1 : Can it serve as an immunomarker to assess tumor margins in gliomas ? *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 0(0):0. [2 citations pages 12 and 63.](#)
- [Rehfeld *et al.*, 2021] REHFELD, M., MATSCHKE, J., HAGEL, C., WILLENBORG, K., GLATZEL, M. et BERNREUTHER, C. (2021). Differential expression of stem cell markers in proliferating cells in glioma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 147(10):2969–2982. [Cité page 12.](#)

- [Renier *et al.*, 2014] RENIER, N., WU, Z., SIMON, D., YANG, J., ARIEL, P. et TESSIER-LAVIGNE, M. (2014). iDISCO : A Simple, Rapid Method to Immunolabel Large Tissue Samples for Volume Imaging. *Cell*, 159(4):896–910. [4 citations pages 8, 172, 173, and 177.](#)
- [Revathy *et al.*, 2017] REVATHY, T., JAYASRI, M. A. et SUTHINDHIRAN, K. (2017). Toxicity assessment of magnetosomes in different models. *3 Biotech*, 7(2):126. [Cité page 74.](#)
- [Reynaud *et al.*, 2013] REYNAUD, O., GEFFROY, F. et CIOBANU, L. (2013). Quantification of microvascular cerebral blood flux and late-stage tumor compartmentalization in 9L gliosarcoma using flow enhanced MRI. *NMR in Biomedicine*, 26(6):699–708. [Cité page 4.](#)
- [Reynolds et Weiss, 1992] REYNOLDS, B. A. et WEISS, S. (1992). Generation of Neurons and Astrocytes from Isolated Cells of the Adult Mammalian Central Nervous System. *Science*. Publisher : American Association for the Advancement of Science. [Cité page 12.](#)
- [Ricard *et al.*, 2016] RICARD, C., TCHOGHANDJIAN, A., LUCHE, H., GRENOT, P., FIGARELLA-BRANGER, D., ROUGON, G., MALISSEN, M. et DEBARBIEUX, F. (2016). Phenotypic dynamics of microglial and monocyte-derived cells in glioblastoma-bearing mice. *Scientific Reports*, 6(1):26381. [Cité page 52.](#)
- [Richard *et al.*, 2016] RICHARD, S., SARIC, A., BOUCHER, M., SLOMIANNY, C., GEFFROY, F., MÉRIAUX, S., LALATONNE, Y., PETIT, P. X. et MOTTE, L. (2016). Antioxidative Theranostic Iron Oxide Nanoparticles toward Brain Tumors Imaging and ROS Production. *ACS Chemical Biology*, 11(10):2812–2819. [Cité page 5.](#)
- [Richardson *et al.*, 2021] RICHARDSON, D. S., GUAN, W., MATSUMOTO, K., PAN, C., CHUNG, K., ERTÜRK, A., UEDA, H. R. et LICHTMAN, J. W. (2021). Tissue clearing. *Nature Reviews Methods Primers*, 1(1):84. [2 citations pages 177 and 199.](#)
- [Richardson et Lichtman, 2015] RICHARDSON, D. S. et LICHTMAN, J. W. (2015). Clarifying Tissue Clearing. *Cell*, 162(2):246–257. [Cité page 172.](#)
- [Rishi et Subramaniam, 2017] RISHI, G. et SUBRAMANIAM, V. N. (2017). The liver in regulation of iron homeostasis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 313(3):G157–G165. [Cité page 50.](#)
- [Rispoli *et al.*, 2014] RISPOLI, R., CONTI, C., CELLI, P., CAROLI, E. et CARLETTI, S. (2014). Neural Stem Cells and Glioblastoma. *The Neuroradiology Journal*, 27(2):169–174. [Cité page 12.](#)
- [Roberts *et al.*, 2004] ROBERTS, M. S., WOODS, A. J., DALE, T. C., van der SLUIJS, P. et NORMAN, J. C. (2004). Protein Kinase B/Akt Acts via Glycogen Synthase Kinase 3 To Regulate Recycling of $\alpha v\beta 3$ and $\alpha 5\beta 1$ Integrins. *Molecular and Cellular Biology*, 24(4):1505–1515. [Cité page 22.](#)
- [Robertson *et al.*, 2015] ROBERTSON, R. T., LEVINE, S. T., HAYNES, S. M., GUTIERREZ, P., BARATTA, J. L., TAN, Z. et LONGMUIR, K. J. (2015). Use of labeled tomato lectin for imaging vasculature structures. *Histochemistry and Cell Biology*, 143(2):225–234. [Cité page 193.](#)
- [Robins *et al.*, 2013] ROBINS, S., STEWART, I., MCNAY, D., TAYLOR, V., GIACHINO, C., GOETZ, M., NINKOVIC, J., BRIANCON, N., MARATOS-FLIER, E., FLIER, J., KOKOEVA, M. et PLACZEK, M. (2013). α -Tanycytes of the adult hypothalamic third ventricle include

- distinct populations of FGF-responsive neural progenitors. *Nature Communications*, 4(1):2049. [Cité page 12.](#)
- [Rodriguez *et al.*, 2022] RODRIGUEZ, R., SCHREIBER, S. L. et CONRAD, M. (2022). Persister cancer cells : Iron addiction and vulnerability to ferroptosis. *Molecular Cell*, 82(4):728–740. [2 citations pages 12 and 85.](#)
- [Rojczyk-Golebiewska *et al.*, 2014] ROJCZYK-GOLEBIEWSKA, E., PALASZ, A. et WIADERKIEWICZ, R. (2014). Hypothalamic Subependymal Niche : A Novel Site of the Adult Neurogenesis. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 34(5):631–642. [2 citations pages 12 and 57.](#)
- [Rong *et al.*, 2016] RONG, X., HUANG, B., QIU, S., LI, X., HE, L. et PENG, Y. (2016). Tumor-associated macrophages induce vasculogenic mimicry of glioblastoma multiforme through cyclooxygenase-2 activation. *Oncotarget*, 7(51):83976–83986. [Cité page 52.](#)
- [Rosenberg *et al.*, 2021] ROSENBERG, V., BAREKET-SAMISH, A., CHODICK, G. et SIEGELMANN-DANIELI, N. (2021). Hormone-Replacement Therapy and Its Association with Breast Cancer Subtypes : A Large Retrospective Cohort Study. *International Journal of Women's Health*, 13:1207–1216. [Cité page 78.](#)
- [Roussel et Dalion, 1988] ROUSSEL, F. et DALION, J. (1988). Lectins as markers of endothelial cells : comparative study between human and animal cells. *Laboratory Animals*, 22(2):135–140. [Cité page 193.](#)
- [Roux *et al.*, 2019] ROUX, G. L., JARRAY, R., GUYOT, A.-C., PAVONI, S., COSTA, N., THÉODORO, F., NASSOR, F., PRUVOST, A., TOURNIER, N., KIYAN, Y., LANGER, O., YATES, F., DESLYS, J. P. et MABONDZO, A. (2019). Proof-of-Concept Study of Drug Brain Permeability Between in Vivo Human Brain and an in Vitro iPSCs-Human Blood-Brain Barrier Model. *Scientific Reports*, 9:16310. [Cité page 122.](#)
- [Ruoslahti, 2017] RUOSLAHTI, E. (2017). Tumor penetrating peptides for improved drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 110-111:3–12. [Cité page 75.](#)
- [Saitoh, 2018] SAITOH, M. (2018). Involvement of partial EMT in cancer progression. *The Journal of Biochemistry*, 164(4):257–264. [Cité page 62.](#)
- [Samoilova *et al.*, 2018] SAMOILOVA, E. M., KALSIN, V. A., KUSHNIR, N. M., CHISTYAKOV, D. A., TROITSKIY, A. V. et BAKLAUSHEV, V. P. (2018). Adult Neural Stem Cells : Basic Research and Production Strategies for Neurorestorative Therapy. *Stem Cells International*, 2018:1–18. [2 citations pages 12 and 123.](#)
- [Sanson, 2016] SANSON, M. (2016). Marqueurs tumoraux des gliomes. *Journal of Neuroanatomy*, 43(2):74–75. [Cité page 65.](#)
- [Schiffer *et al.*, 2014] SCHIFFER, D., MELLAI, M., ANNOVAZZI, L., CALDERA, V., PIAZZI, A., DENYSENKO, T. et MELCARNE, A. (2014). Stem Cell Niches in Glioblastoma : A Neuropathological View. *BioMed Research International*, 2014:1–7. [Cité page 12.](#)
- [Schüler, 2008] SCHÜLER, D. (2008). Genetics and cell biology of magnetosome formation in magnetotactic bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 32(4):654–672. [Cité page 16.](#)
- [Scudiero *et al.*, 1988] SCUDIERO, D. A., SHOEMAKER, R. H., PAULL, K. D., MONKS, A., TIERNEY, S., NOFZIGER, T. H., CURRENS, M. J., SENIFF, D. et BOYD, M. R. (1988). Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity

- in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines. *Cancer Research*, 48(17):4827–4833. Publisher : American Association for Cancer Research Section : Basic Sciences. *Cité page 122.*
- [Seshadri *et al.*, 1989] SESHADRI, R., MATTHEWS, C., DOBROVIC, A. et HORSFALL, D. J. (1989). The significance of oncogene amplification in primary breast cancer. *International Journal of Cancer*, 43(2):270–272. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/ijc.2910430218>. *Cité page 78.*
- [Shan *et al.*, 2018] SHAN, Z., WEI, Z. et SHAIKH, Z. A. (2018). Suppression of ferroportin expression by cadmium stimulates proliferation, EMT, and migration in triple-negative breast cancer cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 356:36–43. *Cité page 85.*
- [Sharanek *et al.*, 2020] SHARANNEK, A., BURBAN, A., LAAPER, M., HECKEL, E., JOYAL, J.-S., SOLEIMANI, V. D. et JAHANI-ASL, A. (2020). OSMR controls glioma stem cell respiration and confers resistance of glioblastoma to ionizing radiation. *Nature Communications*, 11(1):4116. *Cité page 65.*
- [Shen *et al.*, 2020] SHEN, X., WU, S., ZHANG, J., LI, M., XU, F., WANG, A., LEI, Y. et ZHU, G. (2020). Wild-type IDH1 affects cell migration by modulating the PI3K/AKT/mTOR pathway in primary glioblastoma cells. *Molecular Medicine Reports*, 22(3):1949–1957. *Cité page 65.*
- [Siegel *et al.*, 2021] SIEGEL, R. L., MILLER, K. D., FUCHS, H. E. et JEMAL, A. (2021). Cancer Statistics, 2021. *CA : A Cancer Journal for Clinicians*, 71(1):7–33. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.3322/caac.21654>. *Cité page 78.*
- [Silver *et al.*, 2013] SILVER, D. J., SIEBZEHRUBL, F. A., SCHILDTS, M. J., YACHNIS, A. T., SMITH, G. M., SMITH, A. A., SCHEFFLER, B., REYNOLDS, B. A., SILVER, J. et STEINDLER, D. A. (2013). Chondroitin Sulfate Proteoglycans Potently Inhibit Invasion and Serve as a Central Organizer of the Brain Tumor Microenvironment. *The Journal of Neuroscience*, 33(39):15603–15617. *Cité page 52.*
- [Silvestri *et al.*, 2016] SILVESTRI, L., COSTANTINI, I., SACCONI, L. et PAVONE, F. S. (2016). Clearing of fixed tissue : a review from a microscopist’s perspective. *Journal of Biomedical Optics*, 21(8):081205. *Cité page 172.*
- [Simińska *et al.*, 2021] SIMIŃSKA, D., KORBECKI, J., KOJDER, K., KAPCZUK, P., FABIAŃSKA, M., GUTOWSKA, I., MACHOY-MOKRZYŃSKA, A., CHLUBEK, D. et BARANOWSKA-BOSIACKA, I. (2021). Epidemiology of Anthropometric Factors in Glioblastoma Multiforme-Literature Review. *Brain Sciences*, 11(1). *Cité page 11.*
- [Simon *et al.*, 2014] SIMON, T., COQUEREL, B., PETIT, A., KASSIM, Y., DEMANGE, E., LE CERF, D., PERROT, V. et VANNIER, J.-P. (2014). Direct Effect of Bevacizumab on Glioblastoma Cell Lines In Vitro. *NeuroMolecular Medicine*, 16(4):752–771. *Cité page 122.*
- [Singhal *et al.*, 2018] SINGHAL, J., CHIKARA, S., HORNE, D., SALGIA, R., AWASTHI, S. et SINGHAL, S. S. (2018). 2-Hydroxyflavanone inhibits in vitro and in vivo growth of breast cancer cells by targeting RLIP76. *Molecular carcinogenesis*, 57(12):1751–1762. *2 citations pages 103 and 164.*

- [Sokolova *et al.*, 2020] SOKOLOVA, V., NZOU, G., van der MEER, S. B., RUKS, T., HEGGEN, M., LOZA, K., HAGEMANN, N., MURKE, F., GIEBEL, B., HERMANN, D. M., ATALA, A. J. et EPPLE, M. (2020). Ultrasmall gold nanoparticles (2 nm) can penetrate and enter cell nuclei in an in vitro 3D brain spheroid model. *Acta Biomaterialia*, 111:349–362. [Cité page 122.](#)
- [Soomro *et al.*, 2017] SOOMRO, S. H., TING, L. R., QING, Y. Y. et REN, M. (2017). Molecular biology of glioblastoma : Classification and mutational locations. *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association*, 67(9):1410–1414. [Cité page 11.](#)
- [Spalteholz, 1914] SPALTEHOLZ, W. (1914). *Über das Durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen Präparaten und seine theoretischen Bedingungen, nebst Anhang : Über Knochenfärbung*. S. Hirzel, Leipzig, 2., erw. aufl édition. OCLC : 11138774. [Cité page 172.](#)
- [Srivastava *et al.*, 2018] SRIVASTAVA, C., IRSHAD, K., DIKSHIT, B., CHATTOPADHYAY, P., SARKAR, C., GUPTA, D. K., SINHA, S. et CHOSDOL, K. (2018). FAT1 modulates EMT and stemness genes expression in hypoxic glioblastoma. *International Journal of Cancer*, 142(4):805–812. [Cité page 62.](#)
- [Subik *et al.*, 2010] SUBIK, K., LEE, J.-F., BAXTER, L., STRZEPEK, T., COSTELLO, D., CROWLEY, P., XING, L., HUNG, M.-C., BONFIGLIO, T., HICKS, D. G. et TANG, P. (2010). The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer : Basic and Clinical Research*, 4:117822341000400. [2 citations pages 78 and 80.](#)
- [Sugahara *et al.*, 2009] SUGAHARA, K. N., TEESALU, T., KARMALI, P. P., KOTAMRAJU, V. R., AGEMY, L., GIRARD, O. M., HANAHAN, D., MATTREY, R. F. et RUOSLAHTI, E. (2009). Tissue-penetrating delivery of compounds and nanoparticles into tumors. *Cancer cell*, 16(6):510–520. [Cité page 75.](#)
- [Sugamata *et al.*, 2013] SUGAMATA, Y., UCHIYAMA, R., HONDA, T., TANAKA, T., MATSUNAGA, T. et YOSHINO, T. (2013). Functional expression of thyroid-stimulating hormone receptor on nano-sized bacterial magnetic particles in *Magnetospirillum magneticum* AMB-1. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7):14426–14438. [Cité page 17.](#)
- [Sun *et al.*, 2011] SUN, J., LI, Y., LIANG, X.-J. et WANG, P. C. (2011). Bacterial Magnetosome : A Novel Biogenetic Magnetic Targeted Drug Carrier with Potential Multifunctions. *Journal of nanomaterials*, 2011(2011):469031–469043. [Cité page 17.](#)
- [Sun *et al.*, 2010] SUN, J., TANG, T., DUAN, J., XU, P.-X., WANG, Z., ZHANG, Y., WU, L. et LI, Y. (2010). Biocompatibility of bacterial magnetosomes : acute toxicity, immunotoxicity and cytotoxicity. *Nanotoxicology*, 4(3):271–283. [2 citations pages 17 and 74.](#)
- [Susaki *et al.*, 2014] SUSAKI, E. A., TAINAKA, K., PERRIN, D., KISHINO, F., TAWARA, T., WATANABE, T. M., YOKOYAMA, C., ONOE, H., EGUCHI, M., YAMAGUCHI, S., ABE, T., KIYONARI, H., SHIMIZU, Y., MIYAWAKI, A., YOKOTA, H. et UEDA, H. R. (2014). Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell*, 157(3):726–739. [3 citations pages 172, 173, and 176.](#)
- [Suzuki *et al.*, 2010] SUZUKI, A., SEKIYA, S., GUNSHIMA, E., FUJII, S. et TANIGUCHI, H. (2010). EGF signaling activates proliferation and blocks apoptosis of mouse and human intestinal stem/progenitor cells in long-term monolayer cell culture. *Laboratory Investigation ; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 90(10):1425–1436. [Cité page 122.](#)

- [Séhédic *et al.*, 2015] SÉHÉDIC, D., CIKANKOWITZ, A., HINDRÉ, F., DAVODEAU, F. et GARCION, E. (2015). Nanomedicine to overcome radioresistance in glioblastoma stem-like cells and surviving clones. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36(4):236–252. [Cité page 12.](#)
- [Tadmor *et al.*, 2000] TADMOR, R., ROSENSWEIG, R. E., FREY, J. et KLEIN, J. (2000). Resolving the Puzzle of Ferrofluid Dispersants. *Langmuir*, 16(24):9117–9120. [Cité page 22.](#)
- [Taherkhani *et al.*, 2014] TAHERKHANI, S., MOHAMMADI, M., DAOUD, J., MARTEL, S. et TABRIZIAN, M. (2014). Covalent binding of nanoliposomes to the surface of magnetotactic bacteria for the synthesis of self-propelled therapeutic agents. *ACS nano*, 8(5):5049–5060. [Cité page 75.](#)
- [Tainaka *et al.*, 2018] TAINAKA, K., MURAKAMI, T. C., SUSAKI, E. A., SHIMIZU, C., SAITO, R., TAKAHASHI, K., HAYASHI-TAKAGI, A., SEKIYA, H., ARIMA, Y., NOJIMA, S., IKEMURA, M., USHIKU, T., SHIMIZU, Y., MURAKAMI, M., TANAKA, K. F., IINO, M., KASAI, H., SASAOKA, T., KOBAYASHI, K., MIYAZONO, K., MORII, E., ISA, T., FUKAYAMA, M., KAKITA, A. et UEDA, H. R. (2018). Chemical Landscape for Tissue Clearing Based on Hydrophilic Reagents. *Cell Reports*, 24(8):2196–2210.e9. [Cité page 172.](#)
- [Takahashi *et al.*, 2009] TAKAHASHI, M., YOSHINO, T., TAKEYAMA, H. et MATSUNAGA, T. (2009). Direct magnetic separation of immune cells from whole blood using bacterial magnetic particles displaying protein G. *Biotechnology Progress*, 25(1):219–226. [Cité page 17.](#)
- [Takeyama *et al.*, 1995] TAKEYAMA, H., YAMAZAWA, A., NAKAMURA, C. et MATSUNAGA, T. (1995). Application of bacterial magnetic particles as novel DNA carriers for ballistic transformation of a marine cyanobacterium. *Biotechnology Techniques*, 9(5):355–360. [Cité page 17.](#)
- [Tan *et al.*, 2020] TAN, A. C., ASHLEY, D. M., LÓPEZ, G. Y., MALINZAK, M., FRIEDMAN, H. S. et KHASRAW, M. (2020). Management of glioblastoma : State of the art and future directions. *CA : a cancer journal for clinicians*, 70(4):299–312. [Cité page 11.](#)
- [Tanaka *et al.*, 2003] TANAKA, T., MARUYAMA, K., YODA, K., NEMOTO, E., UDAGAWA, Y., NAKAYAMA, H., TAKEYAMA, H. et MATSUNAGA, T. (2003). Development and evaluation of an automated workstation for single nucleotide polymorphism discrimination using bacterial magnetic particles. *Biosensors & Bioelectronics*, 19(4):325–330. [Cité page 17.](#)
- [Tang *et al.*, 2021] TANG, M., RICH, J. N. et CHEN, S. (2021). Biomaterials and 3D Bioprinting Strategies to Model Glioblastoma and the Blood-Brain Barrier. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 33(5):e2004776. [Cité page 123.](#)
- [Taylor *et al.*, 2008] TAYLOR, R. C., CULLEN, S. P. et MARTIN, S. J. (2008). Apoptosis : controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(3):231–241. Bandiera_abtest : a Cg_type : Nature Research Journals Number : 3 Primary_atype : Reviews Publisher : Nature Publishing Group. [Cité page 51.](#)
- [Thulborn *et al.*, 1990] THULBORN, K. R., SORENSEN, A. G., KOWALL, N. W., MCKEE, A., LAI, A., MCKINSTRY, R. C., MOORE, J., ROSEN, B. R. et BRADY, T. J. (1990). The role of ferritin and hemosiderin in the MR appearance of cerebral hemorrhage : a histopathologic biochemical study in rats. *American Journal of Roentgenology*, 154(5):1053–1059. [Cité page 30.](#)

- [Toga *et al.*, 1997] TOGA, A. W., GOLDKORN, A., AMBACH, K., CHAO, K., QUINN, B. C. et YAO, P. (1997). Postmortem cryosectioning as an anatomic reference for human brain mapping. *Computerized Medical Imaging and Graphics : The Official Journal of the Computerized Medical Imaging Society*, 21(2):131–141. [Cité page 172.](#)
- [Tomer *et al.*, 2014] TOMER, R., YE, L., HSUEH, B. et DEISSEROTH, K. (2014). Advanced CLARITY for rapid and high-resolution imaging of intact tissues. *Nature Protocols*, 9(7):1682–1697. [Cité page 172.](#)
- [Torti *et Torti*, 2020] TORTI, S. V. et TORTI, F. M. (2020). Iron : The Cancer Connection. *Molecular aspects of medicine*, 75:100860. [Cité page 12.](#)
- [Tveit *et Pihl*, 1981] TVEIT, K. M. et PIHL, A. (1981). Do cell lines in vitro reflect the properties of the tumours of origin? A study of lines derived from human melanoma xenografts. *British Journal of Cancer*, 44(6):775–786. [Cité page 122.](#)
- [Uchida *et al.*, 2000] UCHIDA, N., BUCK, D. W., HE, D., REITSMA, M. J., MASEK, M., PHAN, T. V., TSUKAMOTO, A. S., GAGE, F. H. et WEISSMAN, I. L. (2000). Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(26):14720–14725. [Cité page 12.](#)
- [Urbano *et al.*, 2021] URBANO, T., VINCETI, M., WISE, L. A. et FILIPPINI, T. (2021). Light at night and risk of breast cancer : a systematic review and dose–response meta-analysis. *International Journal of Health Geographics*, 20:44. [Cité page 78.](#)
- [Vajkoczy *et Menger*, 2004] VAJKOCZY, P. et MENGER, M. D. (2004). Vascular Microenvironment in Gliomas. In ROSEN, S. T., KIRSCH, M. et BLACK, P. M., éditeurs : *Angiogenesis in Brain Tumors*, volume 117, pages 249–262. Springer US, Boston, MA. Series Title : Cancer Treatment and Research. [Cité page 11.](#)
- [Valette *et al.*, 2012] VALETTE, J., GIRAudeau, C., MARCHADOUR, C., DJEMAI, B., GEFROY, F., GHALY, M. A., LE BIHAN, D., HANTRAYE, P., LEBON, V. et LETHIMONNIER, F. (2012). A new sequence for single-shot diffusion-weighted NMR spectroscopy by the trace of the diffusion tensor. *Magnetic Resonance in Medicine*, 68(6):1705–1712. [Cité page 4.](#)
- [Valnes *et Brandtzaeg*, 1985] VALNES, K. et BRANDTZAEG, P. (1985). Retardation of immunofluorescence fading during microscopy. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 33(8):755–761. [Cité page 183.](#)
- [van Noorden *et al.*, 2021] van NOORDEN, C. J., HIRA, V. V., van DIJCK, A. J., NOVAK, M., BREZNIK, B. et MOLENAAR, R. J. (2021). Energy Metabolism in IDH1 Wild-Type and IDH1-Mutated Glioblastoma Stem Cells : A Novel Target for Therapy? *Cells*, 10(3):705. [Cité page 65.](#)
- [Vargas *et al.*, 2018] VARGAS, G., CYPRIANO, J., CORREA, T., LEÃO, P., BAZYLINSKI, D. A. et ABREU, F. (2018). Applications of Magnetotactic Bacteria, Magnetosomes and Magnetosome Crystals in Biotechnology and Nanotechnology : Mini-Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(10):E2438. [Cité page 17.](#)
- [Vargo-Gogola *et Rosen*, 2007] VARGO-GOGOLA, T. et ROSEN, J. M. (2007). Modelling breast cancer : one size does not fit all. *Nature Reviews Cancer*, 7(9):659–672. Number : 9 Publisher : Nature Publishing Group. [Cité page 164.](#)

- [Vaupel et Multhoff, 2021] VAUPEL, P. et MULTHOFF, G. (2021). Revisiting the Warburg effect : historical dogma *versus* current understanding. *The Journal of Physiology*, 599(6): 1745–1757. *Cité page 65.*
- [Vincent *et al.*, 2009] VINCENT, S., VALENT, A., D'ERNEVILLE, A.-M., SUCIU, V. et VIELH, P. (2009). Fixation et cytopathologie. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2009(408):33–37. *Cité page 128.*
- [Volatron *et al.*, 2017] VOLATRON, J., KOLOSNAJ-TABI, J., JAVED, Y., VUONG, Q. L., GOSSUIN, Y., NEVEU, S., LUCIANI, N., HÉMADI, M., CARN, F., ALLOYEAU, D. et GAZEAU, F. (2017). Physiological Remediation of Cobalt Ferrite Nanoparticles by Ferritin. *Scientific Reports*, 7(1):40075. *Cité page 72.*
- [Wacker *et al.*, 2007] WACKER, R., CEYHAN, B., ALHORN, P., SCHUELER, D., LANG, C. et NIEMEYER, C. M. (2007). Magneto immuno-PCR : a novel immunoassay based on biogenic magnetosome nanoparticles. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 357(2):391–396. *Cité page 17.*
- [Wajnberg *et al.*, 1986] WAJNBURG, E., de SOUZA, L. H. S., de BARROS, H. G. P. L. et ESQUIVEL, D. M. S. (1986). A Study of Magnetic Properties of Magnetotactic Bacteria. *Biophysical Journal*, 50(3):451–455. *Cité page 15.*
- [Wang *et al.*, 2019] WANG, C., LI, J., SINHA, S., PETERSON, A., GRANT, G. A. et YANG, F. (2019). Mimicking brain tumor-vasculature microanatomical architecture via co-culture of brain tumor and endothelial cells in 3D hydrogels. *Biomaterials*, 202:35–44. *Cité page 123.*
- [Waterhouse *et al.*, 2011] WATERHOUSE, B. R., GIJSEN, M., BARBER, P. R., TULLIS, I. D., VOJNOVIC, B. et KONG, A. (2011). Assessment of EGFR/HER2 dimerization by FRET-FLIM utilizing Alexa-conjugated secondary antibodies in relation to targeted therapies in cancers. *Oncotarget*, 2(9):728–736. *Cité page 80.*
- [Weissleder *et al.*, 1989] WEISSLEDER, R., STARK, D., ENGELSTAD, B., BACON, B., COMPTON, C., WHITE, D., JACOBS, P. et LEWIS, J. (1989). Superparamagnetic iron oxide : pharmacokinetics and toxicity. *American Journal of Roentgenology*, 152(1):167–173. Publisher : American Roentgen Ray Society. *Cité page 72.*
- [Weksler *et al.*, 2013] WEKSLER, B., ROMERO, I. A. et COURAUD, P.-O. (2013). The hC-MEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. *Fluids and barriers of the CNS*, 10(1):16. *Cité page 130.*
- [Weksler *et al.*, 2005] WEKSLER, B. B., SUBILEAU, E. A., PERRIÈRE, N., CHARNEAU, P., HOLLOWAY, K., LEVEQUE, M., TRICOIRE-LEIGNEL, H., NICOTRA, A., BOURDOULOUS, S., TUROWSKI, P., MALE, D. K., ROUX, F., GREENWOOD, J., ROMERO, I. A. et COURAUD, P. O. (2005). Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *The FASEB Journal*, 19(13):1872–1874. *Cité page 130.*
- [Wen *et al.*, 2020] WEN, P. Y., WELLER, M., LEE, E. Q., ALEXANDER, B. M., BARNHOLTZ-SLOAN, J. S., BARTHEL, F. P., BATCHELOR, T. T., BINDRA, R. S., CHANG, S. M., CHIOCCA, E. A., CLOUGHESY, T. F., DEGROOT, J. F., GALANIS, E., GILBERT, M. R., HEGI, M. E., HORBINSKI, C., HUANG, R. Y., LASSMAN, A. B., LE RHUN, E., LIM, M., MEHTA, M. P., MELLINGHOFF, I. K., MINNITI, G., NATHANSON, D., PLATTEN, M., PREUSSER, M., ROTH, P., SANSON, M., SCHIFF, D., SHORT, S. C., TAPHOORN, M. J. B.,

- TONN, J.-C., TSANG, J., VERHAAK, R. G. W., von DEIMLING, A., WICK, W., ZADEH, G., REARDON, D. A., ALDAPE, K. D. et van den BENT, M. J. (2020). Glioblastoma in adults : a Society for Neuro-Oncology (SNO) and European Society of Neuro-Oncology (EANO) consensus review on current management and future directions. *Neuro-Oncology*, 22(8):1073–1113. *Cité page 13.*
- [White, 1946] WHITE, P. R. (1946). Cultivation of animal tissues in vitro in nutrients of precisely known constitution. *Growth*, 10(3):231–289. *Cité page 122.*
- [Wilding et Bodmer, 2014] WILDING, J. L. et BODMER, W. F. (2014). Cancer Cell Lines for Drug Discovery and Development. *Cancer Research*, 74(9):2377–2384. Publisher : American Association for Cancer Research Section : Review. *Cité page 122.*
- [Wilson et al., 1972] WILSON, S. H., SCHRIER, B. K., FARBER, J. L., THOMPSON, E. J., ROSENBERG, R. N., BLUME, A. J. et NIRENBERG, M. W. (1972). Markers for gene expression in cultured cells from the nervous system. *The Journal of Biological Chemistry*, 247(10):3159–3169. *Cité page 122.*
- [Wolff et al., 2013] WOLFF, A. C., HAMMOND, M. E. H., HICKS, D. G., DOWSETT, M., MCSHANE, L. M., ALLISON, K. H., ALLRED, D. C., BARTLETT, J. M., BILOUS, M., FITZGIBBONS, P., HANNA, W., JENKINS, R. B., MANGU, P. B., PAIK, S., PEREZ, E. A., PRESS, M. F., SPEARS, P. A., VANCE, G. H., VIALE, G. et HAYES, D. F. (2013). Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer : American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *Journal of Clinical Oncology*, 31(31):3997–4013. Publisher : Wolters Kluwer. *Cité page 78.*
- [Woo et al., 2016] WOO, J., LEE, M., SEO, J. M., PARK, H. S. et CHO, Y. E. (2016). Optimization of the optical transparency of rodent tissues by modified PACT-based passive clearing. *Experimental & Molecular Medicine*, 48(12):e274–e274. *Cité page 172.*
- [Wu et al., 2015] WU, B., SUN, C., FENG, F., GE, M. et XIA, L. (2015). Do relevant markers of cancer stem cells CD133 and Nestin indicate a poor prognosis in glioma patients? A systematic review and meta-analysis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, 34(1):44. *Cité page 60.*
- [Xiang et al., 2007] XIANG, L., WEI, J., JIANBO, S., GUILI, W., FENG, G. et YING, L. (2007). Purified and sterilized magnetosomes from *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 were not toxic to mouse fibroblasts in vitro. *Letters in Applied Microbiology*, 45(1): 75–81. _eprint : <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1472-765X.2007.02143.x>. *Cité page 17.*
- [Xiang et al., 2017] XIANG, Z., YANG, X., XU, J., LAI, W., WANG, Z., HU, Z., TIAN, J., GENG, L. et FANG, Q. (2017). Tumor detection using magnetosome nanoparticles functionalized with a newly screened EGFR/HER2 targeting peptide. *Biomaterials*, 115:53–64. *3 citations pages 79, 80, and 164.*
- [Xu et al., 2014] XU, J., HU, J., LIU, L., LI, L., WANG, X., ZHANG, H., JIANG, W., TIAN, J., LI, Y. et LI, J. (2014). Surface expression of protein A on magnetosomes and capture of pathogenic bacteria by magnetosome/antibody complexes. *Frontiers in Microbiology*, 5:136. *Cité page 115.*

- [Yamaguchi-Sekino *et al.*, 2012] YAMAGUCHI-SEKINO, S., CIOBANU, L., SEKINO, M., DJEMAI, B., GEFFROY, F., MERIAUX, S., OKUNO, T. et BIHAN, D. L. (2012). Acute exposure to ultra-high magnetic field (17.2 T) does not open the blood brain barrier. page 6. *Cité page 4.*
- [Yan *et al.*, 2017] YAN, H., ROMERO-LÓPEZ, M., BENITEZ, L. I., DI, K., FRIEBOES, H. B., HUGHES, C. C. W., BOTA, D. A. et LOWENGRUB, J. S. (2017). 3D Mathematical Modeling of Glioblastoma Suggests That Transdifferentiated Vascular Endothelial Cells Mediate Resistance to Current Standard-of-Care Therapy. *Cancer Research*, 77(15):4171–4184. *Cité page 12.*
- [Yan *et al.*, 2011] YAN, X., MA, L., YI, D., YOON, J.-g., DIERCKS, A., FOLTZ, G., PRICE, N. D., HOOD, L. E. et TIAN, Q. (2011). A CD133-related gene expression signature identifies an aggressive glioblastoma subtype with excessive mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(4):1591–1596. *2 citations pages 12 and 60.*
- [Yang *et al.*, 2014] YANG, B., TREWEEK, J., KULKARNI, R., DEVERMAN, B., CHEN, C.-K., LUBECK, E., SHAH, S., CAI, L. et GRADINARU, V. (2014). Single-Cell Phenotyping within Transparent Intact Tissue through Whole-Body Clearing. *Cell*, 158(4):945–958. *2 citations pages 172 and 183.*
- [Yao *et al.*, 2018] YAO, Q., CAI, G., YU, Q., SHEN, J., GU, Z., CHEN, J., SHI, W. et SHI, J. (2018). IDH1 mutation diminishes aggressive phenotype in glioma stem cells. *International Journal of Oncology*, 52(1):270–278. *Cité page 12.*
- [Yoshino *et al.*, 2009] YOSHINO, T., NISHIMURA, T., MORI, T., SUZUKI, S., KAMBARA, H., TAKEYAMA, H. et MATSUNAGA, T. (2009). Nano-sized bacterial magnetic particles displaying pyruvate phosphate dikinase for pyrosequencing. *Biotechnology and Bioengineering*, 103(1):130–137. *Cité page 17.*
- [Yoza *et al.*, 2002] YOZA, B., MATSUMOTO, M. et MATSUNAGA, T. (2002). DNA extraction using modified bacterial magnetic particles in the presence of amino silane compound. *Journal of Biotechnology*, 94(3):217–224. *Cité page 17.*
- [Zhang *et al.*, 1996] ZHANG, S., HOWARTH, P. H. et ROCHE, W. R. (1996). Cytokine Production by Cell Cultures from Bronchial Subepithelial Myofibroblasts. *The Journal of Pathology*, 180(1):95–101. *Cité page 122.*
- [Zhang *et al.*, 2019] ZHANG, Y., NI, Q., XU, C., WAN, B., GENG, Y., ZHENG, G., YANG, Z., TAO, J., ZHAO, Y., WEN, J., ZHANG, J., WANG, S., TANG, Y., LI, Y., ZHANG, Q., LIU, L., TENG, Z. et LU, G. (2019). Smart Bacterial Magnetic Nanoparticles for Tumor-Targeting Magnetic Resonance Imaging of HER2-Positive Breast Cancers. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 11(4):3654–3665. *Cité page 79.*
- [Zhao *et al.*, 2020] ZHAO, C., GUO, R., GUAN, F., MA, S., LI, M., WU, J., LIU, X., LI, H. et YANG, B. (2020). MicroRNA-128-3p Enhances the Chemosensitivity of Temozolomide in Glioblastoma by Targeting c-Met and EMT. *Scientific Reports*, 10:9471. *Cité page 12.*
- [Zheng *et al.*, 2015] ZHENG, G., GE, M., QIU, G., SHU, Q. et XU, J. (2015). Mesenchymal Stromal Cells Affect Disease Outcomes via Macrophage Polarization. *Stem Cells International*, 2015:989473. *Cité page 52.*

- [Ziegler *et al.*, 2019] ZIEGLER, J., ZALLES, M., SMITH, N., SAUNDERS, D., LERNER, M., FUNG, K.-M., PATEL, M., WREN, J. D., LUPU, F., BATTISTE, J. et TOWNER, R. A. (2019). Targeting ELTD1, an angiogenesis marker for glioblastoma (GBM), also affects VEGFR2 : molecular-targeted MRI assessment. *American Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 9(1):93–109. [Cité page 12.](#)
- [Zimmer *et al.*, 2020] ZIMMER, A. S., VAN SWEARINGEN, A. E. D. et ANDERS, C. K. (2020). HER2-positive breast cancer brain metastasis : A new and exciting landscape. *Cancer Reports*. [Cité page 79.](#)
- [Zolata *et al.*, 2016] ZOLATA, H., AFARIDEH, H. et DAVANI, F. A. (2016). Triple Therapy of HER2+ Cancer Using Radiolabeled Multifunctional Iron Oxide Nanoparticles and Alternating Magnetic Field. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 31(9):324–329. Publisher : Mary Ann Liebert, Inc., publishers. [Cité page 80.](#)
- [Zottel *et al.*, 2020] ZOTTEL, A., JOVČEVSKA, I., ŠAMEC, N., MLAKAR, J., ŠRIBAR, J., KRIŽAJ, I., SKOBLAR VIDMAR, M. et KOMEL, R. (2020). Anti-vimentin, anti-TUFM, anti-NAP1L1 and anti-DPYSL2 nanobodies display cytotoxic effect and reduce glioblastoma cell migration. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 12:1758835920915302. [Cité page 63.](#)
- [Žuk *et al.*, 2021] ŽUK, M., GAWĘDA, W., MAJKOWSKA-PILIP, A., OSIAL, M., WOLSKI, M., BILEWICZ, A. et KRYSIŃSKI, P. (2021). Hybrid Radiobioconjugated Superparamagnetic Iron Oxide-Based Nanoparticles for Multimodal Cancer Therapy. *Pharmaceutics*, 13(11): 1843. [Cité page 80.](#)

Liste des figures

1.1	Introduction : Arches de NeuroSpin	3
1.2	Intro : Imagerie Moléculaire	4
2.1	Mefisto : Différents types de contraste en IRM	14
2.2	Mefisto : IRM multimodale	15
2.3	Mefisto : Différentes formes de magnétosomes	16
2.4	Mefisto : Schéma des magnétosomes VRGD	19
2.5	Mefisto : Temps d'incubation 3h30, Dose 2mg/L V vs VRGD	20
2.6	Mefisto : Temps d'incubation 3h30, Gamme de dose VRGD	21
2.7	Mefisto : Magnétosomes en milieu de dispersion	23
2.8	Mefisto : Gamme de concentrations de magnétosomes AMB-VRGD, milieu de Dispersion	25
2.9	Mefisto : Gamme de concentration de magnétosomes AMB1-VRGD, ROI	26
2.10	Mefisto : Magnétosomes AMB1-VRGD 250 $\mu\text{g}_{\text{Fer}}/\text{L}$ 24h, milieu de Dispersion	26
2.11	Mefisto : Immunomarquages 2D Anticorps anti-GFP et anti-AMB1	28
2.12	Mefisto : Devenir des magnétosomes dans les cellules U87MG en culture	29
2.13	Mefisto : Coloration au Bleu de Prusse 2D	30
2.14	Mefisto : Immunomarquages 2D Anti-AMB1 in&out	31
2.15	Mefisto : Immunomarquages 2D Anti-AMB1 in&out	32
2.16	Mefisto : Immunomarquages 2D Multi-traitement	33
2.17	Mefisto : Multi-traitement 250 1 fois vs fractionnée mosaïques	34
2.18	Mefisto : Multi-traitement 250 1 fois vs fractionnée x 20	35
2.19	Mefisto : Multi-traitement 250 1 fois vs fractionnée x 20 ROI	36
2.20	Mefisto : Coloration Perl's et IRM <i>in vitro</i>	38
2.21	Mefisto : Courbe de croissance des tumeurs U87MG chez la souris nude	40
2.22	Mefisto : IRM <i>in vivo</i> chez la souris porteuse de tumeur, 24h après injection des magnétosomes AMB1-V et AMB1-VRGD	42
2.23	Mefisto : IRM <i>in vivo</i> chez la souris porteuse de tumeur, multiples injections des magétosomes AMB1-VRGD	43
2.24	Mefisto : IRM <i>in vivo</i> , multiples injections des magétosomes AMBVRGD, quantification du signal IRM	44
2.25	Mefisto : Immunomarquages sur souris porteuses de tumeurs, après une injection de magnétosomes 200 μmoles de fer /kg, anti-AMB1(A647) plus anti-CD31(A488) plus anti- $\alpha_v\beta_3$ (PE)	46
2.26	Mefisto : Etude semi-quantitative du contenu en magnétosomes (un traitement versus deux traitements)	48
2.27	Mefisto : Comparaison Immunomarquage anti-AMB1 et coloration Perl's	49

2.28 Mefisto : Immunomarquages sur le foie de souris porteuses de tumeurs, après 1 injection de magnétosomes 200 μ moles de fer/kg, anti-AMB1 (Alexa 647) + anti-CD68 (Alexa 488)	50
2.29 Mefisto : Immunomarquages sur le foie de souris porteuses de tumeurs,après 1 injection de magnétosomes 200 μ moles de fer/kg, anti-Caspase3 ou anti-RIP3 (Alexa 594) + WGA (Oregon 488)	51
2.30 Mefisto : Quadruple marquage anti-AMB1+ anti-GFAP+anti-Iba1 + anti- $\alpha_\nu\beta_3$ grossissement x10	53
2.31 Mefisto : Quadruple marquage anti-AMB1+ anti-GFAP+anti-Iba1 + anti- $\alpha_\nu\beta_3$ grossissement x63	54
2.32 Mefisto : Reconstruction 3D x63	55
2.33 Mefisto : Immunomarquages sur souris porteuses de tumeurs, après une injection de magnétosomes AMB1-VRGD 200 μ moles/kg, anti-AMB1 (Alexa647) plus anti-CD31 (Alexa 488) plus anti-Iba1 (blanc, fausse couleur), et anti-Caspase3 (Alexa 647) plus anti- $\alpha_\nu\beta_3$ (PE)	56
2.34 Mefisto : Immunomarquages sur souris porteuses de tumeurs, après deux injections de magnétosomes AMB1VRGD 100 μ moles/kg, anti-AMB1 (Alexa350) plus anti-CD31 (Alexa 488) plus anti-Iba1 Alexa647), et anti- $\alpha_\nu\beta_3$ (PE), grossissement x20	57
2.35 Mefisto : Immunomarquages sur souris porteuses de tumeurs, anti-Nestine plus anti- $\alpha_\nu\beta_3$ plus anti-CD31, grossissement x10	58
2.36 Mefisto : Niches périvasculaire)	59
2.37 Mefisto : Immunomarquages sur souris porteuses de tumeurs, anti-CD133 (Alexa488) plus anti- $\alpha_\nu\beta_3$ PE), grossissement x20	60
2.38 Mefisto : Immunomarquages sur souris porteuses de tumeurs, anti-SOX2 (Alexa488)+ anti- $\alpha_\nu\beta_3$ (PE), grossissement x20	61
2.39 Mefisto : Immunomarquages sur souris porteuses de tumeurs, anti-BCRP (Alexa488) plus anti- $\alpha_\nu\beta_3$ PE), grossissement x10	62
2.40 Mefisto : Immunomarquages sur souris porteuses de tumeurs, anti-Vimentine plus anti-GFAP plus anti- $\alpha_\nu\beta_3$)	63
2.41 Mefisto : Immunomarquages sur souris porteuses de tumeurs, anti-S100A4 (Alexa 488) plus anti- $\alpha_\nu\beta_3$, grossissement x20)	64
2.42 Mefisto : Immunomarquages sur souris porteuses de tumeurs, anti-IDH1 (Alexa 488)+ anti- $\alpha_\nu\beta_3$ (PE)	66
2.43 Mefisto : Immunomarquages multiples anti-BCRP plus anti-Nestine plus anti-AMB1, grossissement x20	67
2.44 Mefisto : Immunomarquages multiples anti-BCRP, anti-CD133, anti-AMB1, grossissement x20	68
2.45 Mefisto : Immunomarquages multiples anti-Nestine, anti-S100A4, anti-Vimentine, anti-AMB1, grossissement x20	69
2.46 Mefisto : Immunomarquages multiples anti-SOX2, anti-S100A4, anti-Vimentine et anti-AMB1, grossissement x20	70
2.47 Mefisto : Immunomarquages multiples anti-IDH1, anti- $\alpha_\nu\beta_3$, anti-Vimentine et anti-AMB1, grossissement x20	71
2.48 Mefisto : Etude de toxicologie	73
2.49 Mefisto : ICP-Etude de toxicologie	74

3.1	Orano : Expression d'HER2 des lignées cellulaires	81
3.2	Orano : Lots de magnétosomes	83
3.3	Orano : Incubation des cellules SKBR3 avec les magnétosomes conjugués et non conjugués	84
3.4	Orano : Incubation des cellules MDA-MB-231 avec les magnétosomes conjugués et non conjugués, grossissement x10	85
3.5	Orano : Incubation des cellules A431 avec les magnétosomes conjugués et non conjugués, grossissement x10	86
3.6	Orano : Incubation des cellules MCF7 avec les magnétosomes conjugués et non conjugués, grossissement x10	87
3.7	Orano : Incubation des cellules MCF12a avec les magnétosomes conjugués et non conjugués, grossissement x20	88
3.8	Orano : Incubation des cellules SKBR3 avec les magnétosomes conjuguées Cinétique	89
3.9	Orano : Incubation au cours du temps des cellules SKBR3 avec les magnétosomes conjugués, grossissement x20	90
3.10	Orano : Incubation au cours du temps des cellules MDA-MB-231 avec les magnétosomes conjugués, grossissement x20	91
3.11	Orano : Incubation au cours du temps des cellules MDA-MB-231 avec les magnétosomes conjugués, grossissement x20	92
3.12	Orano : Incubation des cellules SKBR3 avec les magnétosomes conjugués et non conjugués, sous agitation, grossissement x10	93
3.13	Orano : Incubation des cellules MDA-MB-231 avec les magnétosomes conjugués et non conjugués, sous agitation, grossissement x10	94
3.14	Orano : Incubation des cellules SKBR3 et MDA-MB-231 avec les magnétosomes conjugués 72h d'incubation, grossissement x20	95
3.15	Orano : Incubation des cellules SKBR3 avec les magnétosomes conjuguées multitraitement, grossissement x10	96
3.16	Orano : Incubation des cellules SKBR3 avec l'anticorps MAB9589	96
3.17	Orano : Immunomarquage des cellules SKBR3 et des cellules MDA-MB-231 avec l'anticorps Trastuzumab	97
3.18	Orano : Sphéroïdes traités avec les magnétosomes conjugués et non conjugués, immunomarquage sous agitation	99
3.19	Orano : Sphéroïdes de cellules SBR3, MDA-MB-231, MCF12a et A431, non traités versus traités avec les magnétosomes conjugués et non conjugués, coloration Perl's	100
3.20	Orano : Sphéroïdes de cellules SKBR3, traités avec les magnétosomes conjugués coloration Perl's	100
3.21	Orano : Sphéroïdes traités avec les magnétosomes conjugués coloration Perl's	101
3.22	Orano : Coloration Perl's sur sphéroïdes A431	102
3.23	Orano : Croissance des tumeurs A431	104
3.24	Orano : IRM sur tumeur A431	106
3.25	Orano : Immunomarquage HER2 <i>in vivo</i> , coupe de tumeur A431, grossissement x10	108
3.26	Orano : Immunomarquage CD31 <i>in vivo</i> sur coupe de tumeur A431, grossissement x10	109
3.27	Orano : Double immunomarquage CD31/HER2 sur coupe de tumeur A431, grossissement x10	110

3.28	Orano : Immunomarquage anti-AMB1 et CD31 sur tumeur A431, souris traitées par les magnétosomes AMB1-WT, grossissement x10	111
3.29	Orano : Immunomarquages anti-AMB1 et CD31 sur tumeur A431, souris traitées par les magnétosomes AMB1-TzTCMCgrossissement x10	112
3.30	Orano : Immunomarquage anti-AMB1 et CD31 sur tumeur A431, souris traitées par les magnétosomes AMB1-TzTCMC-Plomb, grossissement x10	112
3.31	Orano : Immunomarquage anti-Trastuzumab sur tumeur A431, souris traitées avec les magnétosomes AMB1-WT, grossissement x10	114
3.32	Orano : Immunomarquage anti-Trastuzumab sur tumeur A431, souris traitées avec les magnétosomes AMB1-TzTCMC, grossissement x10	114
3.33	Orano : Immunomarquage anti-Trastuzumab sur tumeur A431, souris traitées avec les magnétosomes AMB1-TzTCMC-Plomb, grossissement x10	115
3.34	Orano : Coloration Perl's sur Tumeurs A431, souris traitées avec les magnétosomes AMB1-WT	116
3.35	Orano : Coloration Perls sur Tumeurs A431, souris traitées avec les magnétosomes AMB1-TzTCMC	116
3.36	Orano : Coloration Perls sur Tumeurs A431, souris traitées avec les magnétosomes AMB1-TzTCMC-Pb	117
4.1	3D : Sphéroïdes de cellules U87MG en Matrigel™	125
4.2	3D : Sphéroïdes de cellules U87MG Immunomarquage sur coupe	126
4.3	3D : Sphéroïdes de cellules SKBR3 en Matrigel™	128
4.4	3D : Test des fixateurs sur sphéroïdes, coupes	129
4.5	3D : Immunocytomarquages	132
4.6	3D : Composition des milieux de culture utilisés pour les modèles bi-cellulaires	133
4.7	3D : Réseau de cellules U87MG et de cellules hCMEC/D3	135
4.8	3D : Suivi d'un sphéroïde de U87MG sur une couche de cellules hCMEC/D3	136
4.9	3D : Suivi d'un sphéroïde bi-cellulaire U87MG + hCMEC/D3	137
4.10	3D : coloration des cellules tumorales et endothéliales avec les colorants Vybrant™	138
4.11	3D : Sphéroïdes bi-cellulaire Vybrant™	140
4.12	3D : Cellules U87MG E2-Crimson et hCMEC/D3 pZgreen	142
4.13	3D : Sphéroïdes hCMEC/D3-pZgreen	143
4.14	3D : Sphéroïdes U87MG et hCMEC/D3 pZgreen	145
4.15	3D : Sphéroïdes U87MG E2-Crimson et hCMEC/D3 pZgreen	146
4.16	3D : Sphéroïdes U87MG E2-Crimson et hCMEC/D3 pZgreen	148
4.17	Projet 3D : Tumeur U87MG <i>in vivo</i> issues de sphéroïdes	150
4.18	3D : Cellules U87MG en réseau, 4 jours incubation avec Vénus et VénusRGD	152
4.19	3D : Sphéroïdes U87MG IRM	153
4.20	3D : Microsphéroïdes monocellulaires U87MG, 24h incubation sous agitation avec AMB1V vs AMB1VRGD	154
4.21	3D : Microsphéroïdes monocellulaires U87MG, 24 et 48h incubation sous agitation avec AMB1-VRGD	155
4.22	3D : Microsphéroïdes monocellulaires U87MG, 24 et 48h incubation sous agitation avec AMB1-VRGD	156
4.23	3D : Sphéroïdes monocellulaires U87MG, traités AMB1-VRGD sous agitation	157
4.24	3D : Sphéroïdes monocellulaires U87MG, traités AMB1-VRGD sous agitation	158
4.25	3D : Sphéroïdes monocellulaires U87MG, traités AMB1-VRGD sous agitation	159

4.26	3D : Sphéroïdes bi-cellulaires U87MG et hCMEC/D3, 72h incubation sous agitation avec AMB1VRGD 250 μ g _{Fer} /L	160
4.27	3D : Sphéroïde bi-cellulaire U87MG et hCMEC/D3, Multi-traitement AMB1-VRGD 250 μ g _{Fer} /L	161
4.28	3D : Sphéroïde bi-cellulaire U87MG WT et hCMEC/D3pZgreen, Traitement AMB1-VRGD 250 μ g _{Fer} /L	162
4.29	3D : Récapitulatif des différents essais d'implantation de cellules SKBR3 <i>in vivo</i>	165
4.30	3D : Tumeur SKBR3, immunomarquage HER2	167
4.31	3D : Cellules de cancer de sein transfectées avec pZgreen	168
5.1	Transparency : Cerveau transparisé par la méthode CLARITY	174
5.2	Transparency : Méthode Scale	175
5.3	Transparency : Cerveau transparisé par la méthode CUBIC	176
5.4	Transparency : Cerveaux transparisés par la méthode iDISCO	178
5.5	Transparency : Cerveau APP/PS1 transparisé par la méthode iDISCO	179
5.6	Transparency : Cerveaux transparisés par la méthode GClear	180
5.7	Transparency : Ganglion buccal d'Aplysie	181
5.8	Transparency : Cerveaux transparisés par la méthode GClear	182
5.9	Transparency : Cerveau transparisé par la méthode GClear6	182
5.10	Transparency : Cerveau transparisé en GClear17d3 et d5	184
5.11	Transparency : Cerveau APP en GClear17d3, d9, 10	185
5.12	Transparency : Cerveau APP/PS1 transparisés en GClear17d3, d9, 10	185
5.13	Transparency : Cerveau transparisé en GClear17d8, d9 et d10	186
5.14	Transparency : Cerveaux perméabilisés et transparisés par la méthode GClear	187
5.15	Transparency : Cerveaux perméabilisés et transparisés par la méthode GClear	188
5.16	Transparency : Immunomarquages sur des cerveaux perméabilisés	190
5.17	Transparency : Immunomarquages sur des cerveaux perméabilisés	191
5.18	Transparency : Immunomarquages sur cerveaux perméabilisés	192
5.19	Transparency : Vascularisation	194
5.20	Transparency : DIL G17	195
5.21	Transparency : Silicone J0	196
5.22	Transparency : Silicone J7J14	197
5.23	Transparency : Fantômes	198
A.1	Mefisto : Poster WMIC2015 F.Geffroy	204
A.2	Mefisto : Poster WMIC2016 F.Geffroy	205
A.3	Mefisto : Poster WMIC2016 M.Boucher	206
A.4	Mefisto : Liste des Primers utilisés pour la fonctionnalisation	207
A.5	Mefisto : Schéma du plasmide codant pour VRGD	207
A.6	Mefisto : Agents de dispersion	211
A.7	Mefisto : Agents de dispersion sur cellules U87-MG	212
A.8	Annexes vitro : Protocoles d'immunomarquages sur cellules	213
A.9	Annexes vitro : Protocole in&out	214
A.10	Mefisto : Incubation 3h30 à 10mg/L des Magnétosomes V et VRGD	214
A.11	Mefisto : Incubation24, 48 et 72h à 250 μ g _{Fer} /L des Magnétosomes V et VRGD	215
A.12	Mefisto : Coloration Perl's avec et sans étape de perméabilisation	217
A.13	Kit de transfection JetOptimus	218

B.1	Annexe vivo : Angiogrammes MV1 et Ferrumoxide	221
B.2	Annexe vivo : Effet EPR après injection des magnétosomes WT chez la souris porteuse de tumeur U-87 MG	222
B.3	Annexe vivo : IRM de souris porteuses de tumeurs après injection des magnétosomes fonctionnalisés, temps 100 minutes	223
B.4	Annexe vivo : IRM de souris porteuses de tumeurs après injection des magnétosomes fonctionnalisés, temps 24h	223
B.5	Annexe vivo : Protocoles d'immunomarquages à un anticorps sur coupes <i>ex vivo</i>	225
B.6	Annexe vivo : Protocoles d'immunomarquages à deux anticorps sur coupes <i>ex vivo</i>	226
B.7	Annexe vivo : Protocoles d'immunomarquages à trois anticorps sur coupes <i>ex vivo</i>	227
B.8	Annexe vivo : Protocoles d'immunomarquages à quatre anticorps sur coupes <i>ex vivo</i>	228
B.9	Mefisto : Différents Protocoles de marquages du fer sur les coupes <i>ex vivo</i>	229
B.10	Mefisto : Analyses histologiques	230
B.11	Mefisto : Immunomarquages anti-Nestine sur cellules	231
B.12	Mefisto : Immunomarquages anti-Vimentine et anti- $\alpha_v\beta_3$	232
B.13	Orano : Croissance des tumeurs A431	233
B.14	Orano : Double immunomarquage CD31/HER2	233
B.15	Orano : Biodistribution des magnétosomes dans les animaux sains	234
B.16	Orano : Imagerie IRM des tumeurs A431	235
B.17	Orano : Traitements des souris 10 à 15	235
C.1	Projet 3D : Poster WMIC 2010	238
C.2	Projet 3D : Méthode des gouttes inversées	239
C.3	Projet 3D : Test des fixateurs sur sphéroïdes	240
C.4	Projet 3D : Sphéroïdes de cellules SKBR3 fixés au glutaraldéhyde, immunomarquage anti-HER2	241
C.5	Projet 3D : Sphéroïdes SKBR3 fixés à l'acétone/éthanol, immunomarquage anti-HER2	241
C.6	Projet 3D : Formation de capillaires par les cellules hCMEC/D3	242
C.7	Projet 3D : Cellules hCMEC/D3 sur Matrigel™	242
C.8	Projet 3D : Marqueurs communs des cellules U87MG et hCMEC/D3	243
C.9	Projet 3D : Numération en fonction du milieu	244
C.10	Projet 3D : Modèles bicellulaire, 2D, milieu C	244
C.11	Projet 3D : Densités d'ensemencements	245
C.12	Projet 3D : Nodules bicellulaires colorés en Matrigel™	246
C.13	Projet 3D : Sphéroïdes bicellulaires Fluorescents	247
C.14	Projet 3D : Sphéroïdes monocellulaire U87MG, 2 et 4 jours incubation avec VenusRGD, 0,66 μ g/mL	248
C.15	Transparency : GClear premiers essais	251
C.16	Transparency : GClear premiers essais	252
C.17	Transparency : GClear premiers essais	253
C.18	Transparency : Perfusion de DIL	254
C.19	Transparency : Thioflavine et cellules gliales	255
C.20	Transparency : Neurones	255
D.1	Transparency : Références des produits chimiques	258

D.2	Transparency : Références des produits chimiques pour le projet Transparency .	259
D.3	Transparency : Références des cellules	260
D.4	Transparency : Références des réactifs de culture cellulaire	261
D.5	Transparency : Colorants Vybrant	262
D.6	Transparency : Colorants Vybrant	263
D.7	Transparency : Références des Anticorps	264
D.8	Transparency : Références des Anticorps	265

Table des matières

Remerciements

Préface

Sommaire

1 Introduction

- 1.1 NeuroSpin, centre de neuroimagerie par IRM haut champ
- 1.2 L'IRM moléculaire
- 1.3 Projets auxquels j'ai participé à NeuroSpin
- 1.4 Première partie du manuscrit
 - 1.4.1 Projet Mefisto
 - 1.4.2 Projet Orano
- 1.5 Deuxième Partie du manuscrit
 - 1.5.1 Culture cellulaire 3D
 - 1.5.2 Transparency

2 Mefisto

- 2.1 Contexte du Projet Mefisto
 - 2.1.1 Pathologie étudiée : le glioblastome
 - 2.1.2 Quelques notions d'IRM
 - 2.1.3 Bactéries magnétotactiques
 - 2.1.4 Magnétosomes non fonctionnalisés comme agents de contraste IRM
 - 2.1.5 Fonctionnalisation des Magnétosomes
- 2.2 Résultats *in vitro*
 - 2.2.1 Ciblage : comparaison des Magnétosomes Venus et VRGD
 - 2.2.2 Incorporation
 - 2.2.3 Immunomarquages *in vitro* en 2D
 - Anti-GFP et Anti-AMB1
 - Devenir des magnétosomes dans les cellules
 - 2.2.4 Coloration Perl's en 2D
 - 2.2.5 Cinétiques d'incorporation des magnétosomes *in vitro*
 - Un traitement, cinétique sur 72 heures
 - Multi-traitements, cinétique sur 72 heures
 - 2.2.6 IRM sur cellules *in vitro*
 - 2.2.7 Modèles cellulaires 3D
- 2.3 Résultats *in vivo*
 - 2.3.1 Modèle tumoral
 - 2.3.2 Résultats IRM *in vivo*

- Etudes préalables
 - Etudes avec les magnétosomes AMB1V et AMB1VRGD
 - 2.4 Résultats *ex vivo*
 - 2.4.1 Histologie
 - AMB1V versus AMB1VRGD : Cerveau
 - AMB1V versus AMB1VRGD : Foie
 - AMB1-VRGD : cellules gliales, microgliales, macrophages
 - AMB1-VRGD : Néo-vaisseaux
 - AMB1-VRGD : Marqueurs de cellules souches
 - AMB1-VRGD : Marqueurs d'EMT
 - AMB1-VRGD : Marqueurs de métabolisme
 - AMB1-VRGD : Multiples marquages avec les marqueurs CSC, d'EMT et du métabolisme
 - 2.4.2 Toxicologie
 - 2.5 Conclusion et perspectives
- ### 3 Orano
- 3.1 Contexte scientifique du projet
 - 3.2 Lignées cellulaires utilisées lors du projet
 - 3.3 Résultats *in vitro*
 - 3.3.1 Culture cellulaire en 2D
 - Incubation sur cellules vivantes, en statique
 - Incubation sur cellules vivantes, sous agitation
 - Incubation sur cellules fixées
 - 3.3.2 Culture cellulaire en 3D
 - 3.4 Résultats *in vivo*
 - 3.4.1 Modèle tumoral
 - 3.4.2 Résultats IRM *in vivo*
 - 3.5 Résultats *ex vivo*
 - 3.6 Conclusion et perspectives
- ### 4 Culture cellulaire 3D
- 4.1 Intérêt des modèles de culture en 3D
 - 4.2 Modèles tumoraux monocellulaires
 - 4.2.1 Sphéroïdes : Méthode des gouttes inversées ou MGI
 - Description de la méthode
 - Caractérisation des sphéroïdes de cellules U87MG obtenus en MGI
 - 4.2.2 Sphéroïdes : Modèles sous agitation
 - Matériel non adhérent standard
 - Matériel non adhérent CELLSTAR™ Cell-Repellent
 - 4.2.3 Méthode par enrobage de Matrigel™
 - 4.2.4 Fixation des sphéroïdes
 - 4.3 Modèles tumoraux bi-cellulaires non colorés
 - 4.3.1 Cellules endothéliales
 - 4.3.2 Caractérisation des deux lignées en immunomarquages
 - 4.3.3 Culture des 2 lignées ensemble en 2D
 - 4.3.4 Modèles bi-cellulaires de culture cellulaire en 3D
-

- 4.4 Modèles bi-cellulaires de cellules colorées
 - 4.5 Modèles bicellulaires fluorescents
 - 4.5.1 Transfection
 - 4.5.2 Modèles réalisés avec les cellules fluorescentes
 - U87MG WT+ hCMEC/D3 pZgreen
 - U87MG E2-Crimson + hCMEC/D3 pZgreen
 - 4.6 Applications des modèles de culture cellulaire 3D
 - 4.6.1 Projet Iseult
 - 4.6.2 Projet Mefisto
 - 4.6.3 Projet Orano
 - Modèles utilisés *in vitro*
 - Modèles développés pour les études *in vivo*
 - 4.7 Conclusion et perspectives
- 5 Transparency**
- 5.1 Contexte
 - 5.2 Test des méthodes issues de publications
 - 5.2.1 Méthodes à base de solvants aqueux
 - CLARITY
 - SeeDB, Scale et ScaleS
 - CUBIC
 - 5.2.2 Méthodes à base de solvants organiques
 - iDISCO, uDISCO
 - 5.3 GClear
 - 5.3.1 Mise au point
 - 5.3.2 Protocole retenu
 - 5.4 Protocoles de perméabilisation
 - 5.5 Visualisation de la vascularisation
 - 5.6 Conclusion et perspectives
- 6 Conclusion**
- A Annexes *in vitro***
- A.1 Mefisto : Posters WMIC
 - A.2 Mefisto : Fonctionnalisation des Magnétosomes
 - A.3 Culture Cellulaire 2D
 - A.3.1 Mefisto : U87MG
 - A.3.2 Orano : SKBR3
 - A.3.3 Orano : MDA-MB-231
 - A.3.4 Orano : A431
 - A.3.5 Orano : MCF7
 - A.3.6 Orano : MCF12A
 - A.3.7 3D : hCMEC/D3
 - A.4 Mise en contact des magnétosomes avec les cellules
 - A.5 Mefisto : Tests des agents de dispersion
 - A.6 Mefisto : Anticorps anti-AMB1
 - A.6.1 Production de l'anticorps anti-AMB1 chez le lapin
-

- A.6.2 Protocoles d'immunomarquages sur cellules
- A.7 Mefisto : Résultats *in vitro*
- A.8 Mefisto : Cytopainter
- A.9 Mefisto : Coloration Perl's sur cellules
- A.10 Projet 3D : protocoles de transfection
- A.11 Projet 3D : protocoles de sous-clonage

B Annexes *in vivo* et *ex vivo*

- B.1 Mefisto : Séquences IRM utilisées
- B.2 Mefisto : Angiogrammes MV1 et Ferrumoxide
- B.3 Mefisto : IRM *in vivo*
 - B.3.1 Mefisto : Caractérisation du modèle tumoral en IRM
 - B.3.2 Mefisto : Résultats d'IRM moléculaire avec les magnétosomes AMB1V et AMB1VRGD
- B.4 Protocole d'exsanguination-perfusion
- B.5 Protocoles d'immunohistochimie
- B.6 Mefisto : Coloration Perl's sur coupes
- B.7 Mefisto : Analyse Imaris
- B.8 Mefisto : Immunomarquage Nestine
- B.9 Mefisto : Immunomarquage Vimentine
- B.10 Orano : Tumeurs A431
- B.11 Orano : Résultats IRM

C Annexes Projets 3D

- C.1 Poster WMIC 2010
- C.2 Méthode de la goutte inversée : MGI
- C.3 Fixation
- C.4 Cellules hCMEC/D3 sur matrice extracellulaire
- C.5 Modèles bi-cellulaires
 - C.5.1 Caractérisation des lignées
 - C.5.2 Milieux de culture cellulaire
 - C.5.3 Densité d'ensemencement
- C.6 Sphéroïdes bi-cellulaires colorés avec les colorants Vybrant™
- C.7 Sphéroïdes bi-cellulaires fluorescents : milieu A versus milieu B
- C.8 Mise en contact des magnétosomes avec les sphéroïdes
 - C.8.1 Mefisto : Sphéroïdes en Matrigel™
Orano/Mefisto : Microsphéroïdes sous agitation
3D : Sphéroïdes sous agitation en support Cell-Repellent
- C.9 Transparency : Protocoles de coloration à la Thioflavine S
- C.10 Transparency : Protocoles GClear 1 à 6
- C.11 Transparency : Préparation GCclear17d3
- C.12 Transparency : Perfusion de DIL
- C.13 Transparency : Coloration à la Thioflavine associée à des immunomarquages
- C.14 Transparency : Quadruple immunomarquage des neurones

D Annexe Références

- D.1 Références des réactifs chimiques utilisés
-

- D.2 Références des cellules utilisées
- D.3 Références des réactifs utilisés pour la culture cellulaire
- D.4 Références des anticorps utilisés
- D.5 Animaux utilisés

Liste des abréviations, des sigles et des symboles

Bibliographie

Liste des figures

Table des matières
