

De la cellule au tissu

Le magnétisme auxiliaire de la biomédecine

Guillaume Frasca (guillaume.frasca@gmail.com), **Florence Gazeau**,

Claire Wilhelm (claire.wilhelm@univ-paris-diderot.fr)

Laboratoire Matière et Systèmes Complexes (MSC), UMR 7057 CNRS & Université Paris Diderot, 75013 Paris

Un des défis actuels de la science est d'adapter les techniques d'ingénierie pour manipuler le vivant, notamment dans un but thérapeutique.

Unité de base d'un organisme vivant, la cellule peut aujourd'hui subir des manipulations d'origine physique grâce à l'introduction, au cœur même de celle-ci, de dispositifs manipulables par des champs extérieurs. En incorporant des nanoparticules d'oxyde de fer, les cellules devenues magnétiques peuvent être guidées de manière contrôlée et à distance grâce à l'application de champs magnétiques externes. Il devient ainsi possible de contrôler *in vitro* la migration cellulaire ou encore d'édifier des tissus fonctionnels.

In vivo, les cellules peuvent être dirigées dans l'organisme vers un site cible.

Les termes suivis d'un astérisque sont expliqués dans le glossaire.

Le biophysicien ambitionne aujourd'hui de pouvoir manipuler le vivant et reconstruire de toutes pièces un tissu fonctionnel à partir de cellules* individuelles. Dans cette perspective, il ne suffit pas de rassembler les différents éléments constitutifs du tissu, il faut encore les ordonner pour donner du sens à cet assemblage. Ainsi, si un tissu se caractérise par un (ou des) type(s) cellulaire(s)* spécifique(s), sa fonctionnalité dépend tout autant de son architecture interne, qui structure les interactions entre les cellules. L'enjeu principal est donc de parvenir à manipuler précisément celles-ci, afin de contrôler leur arrangement spatial en trois dimensions et recréer ainsi l'architecture complexe d'un tissu sain vivant.

Les manipulations physiques présentent l'avantage de pouvoir être contrôlées à distance et dans le temps par des champs extérieurs. Profitant des développements récents des nanotechnologies, il est possible d'adapter ces techniques au monde biologique et d'introduire des dispositifs réagissant à ces champs extérieurs au cœur même de la cellule, sans pour autant modifier son fonctionnement.

Nous présentons ici une approche originale consistant à utiliser des nanoparticules d'oxyde de fer qui sont capables de pénétrer les cellules, leur conférant de nouvelles propriétés magnétiques. Les « cellules magnétiques » ainsi formées deviennent manipulables par des champs magnétiques, ce qui permet de les diriger vers un site cible.

Glossaire

Cellules

La cellule est l'entité biologique structurale de tout organisme vivant. Les cellules eucaryotes possèdent un noyau renfermant l'ADN, et sont délimitées par une *membrane plasmique* qui sépare l'espace intracellulaire de l'environnement. Les cellules se caractérisent par de nombreux compartiments internes, organisant les différentes activités métaboliques dans des vésicules spécifiques.

Cellules amibiennes

Cellules à fort potentiel migratoire, dont certaines sont pathogènes et peuvent envahir le corps d'un hôte.

Cellules endothéliales

Cellules qui tapissent l'intérieur des vaisseaux sanguins.

Cellules souches

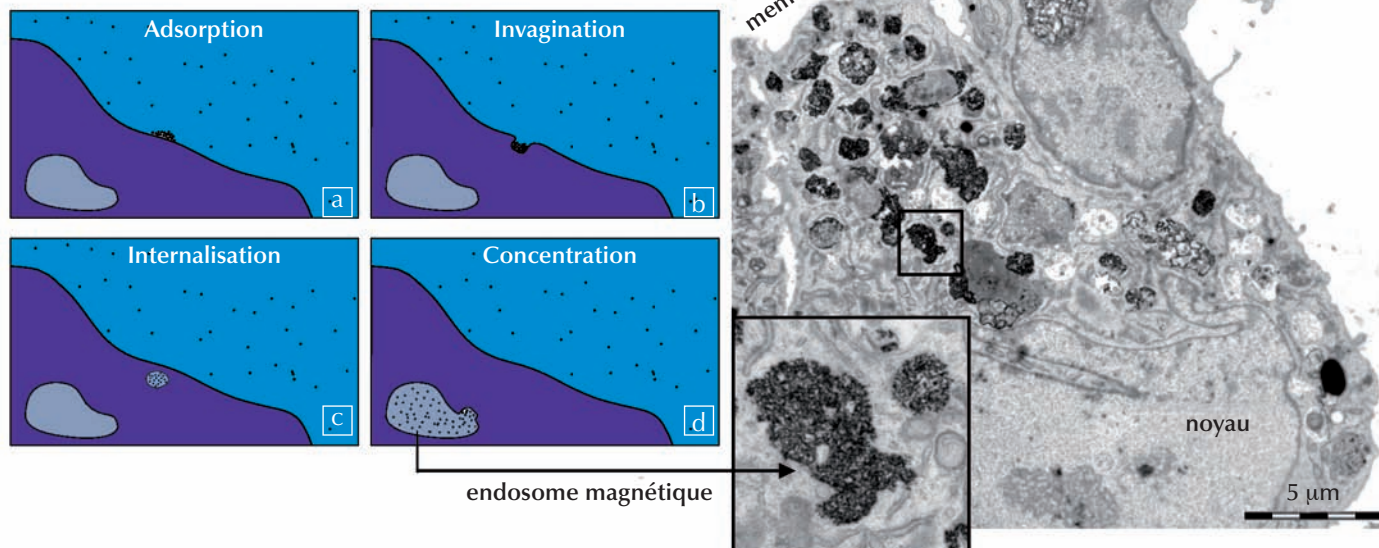
Dites « indifférenciées », elles peuvent se transformer pour donner une cellule spécifique, telle qu'un chondrocyte (cellule du cartilage).

Chimiotaxie

Phénomène de migration de certaines cellules ou bactéries, guidées par la présence de molécules chimiques dans l'environnement immédiat. Les cellules peuvent se diriger vers une source de nourriture (glucose, par exemple) ou fuir un agent nuisible.

Endocytose

Mécanisme de transport de molécules et de particules vers l'intérieur de la cellule. La particule interagit – de manière spécifique ou non spécifique – avec la membrane de la cellule. Cette dernière se déforme pour entourer complètement la particule, jusqu'à former une vésicule qui pénètre à l'intérieur de la cellule et va fusionner avec des vésicules intracellulaires préexistantes : les *endosomes*.



1. Des nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer empruntent la voie d'endocytose pour pénétrer du milieu extracellulaire (en bleu) vers l'intérieur des cellules (en violet) : adsorption sur la membrane plasmique (a) qui s'invagine en retour, formant une vésicule (b) qui se détache, transporte son contenu magnétique dans la cellule (c) et va fusionner avec un endosome préexistant (gris) (d) qui se charge progressivement en nanoparticules. On peut observer ces endosomes magnétiques sur des images de microscopie électronique (à droite) sur lesquelles les nanoparticules, denses aux électrons, apparaissent comme de petits points noirs.

Fibroblastes

Cellules de soutien du tissu conjonctif.

Hépatocytes

Cellules du foie. Ce sont de véritables usines chimiques, assurant de nombreuses fonctions métaboliques.

Magnétotaxie

Migration de cellules le long des lignes de force d'un champ magnétique.

Monocytes

Cellules de la circulation sanguine, non adhérentes, de la famille des leucocytes (globules blancs).

Superparamagnétisme

Comportement d'un matériau ferromagnétique ou ferrimagnétique sous forme de nanoparticules monodomaines. Chaque particule présente un moment magnétique permanent non nul. Sous l'effet de l'agitation thermique, et en l'absence de champ magnétique externe, l'aimantation moyenne de la suspension est nulle, les orientations des grains se moyennant. Un champ magnétique peut aimanter la suspension, comme pour un matériau paramagnétique, mais l'aimantation est ici beaucoup plus grande.

Surexpression

Par manipulation génétique, on peut « forcer » une cellule à fabriquer en plus grand nombre une certaine protéine au-delà de son niveau normal. On peut également induire la synthèse d'une protéine que la cellule ne fabrique pas habituellement.

Types cellulaires

Les cellules se classent en différents types selon leur fonctionnalité. Ainsi, par exemple, les *cellules souches*, les *monocytes*, les *hépatocytes*, les *cellules endothéliales*, les *fibroblastes* ou les *cellules amibiennes*.

Comment rendre des cellules magnétiques

Le marquage magnétique doit être suffisant pour que la force appliquée par le champ parvienne à déplacer chaque cellule, sans pour autant modifier le fonctionnement cellulaire. Le processus utilisé par notre équipe repose sur la voie naturelle d'endocytose* de nanoparticules d'oxyde de fer en suspension dans le milieu extracellulaire. Les nanoparticules de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), d'un diamètre voisin de 7 nm, sont synthétisées au laboratoire PECSA (UMR 7195, Paris). La maghémite étant un solide ferrimagnétique, la suspension de nanoparticules possède des propriétés superparamagnétiques*. Ces nanoparticules, chargées négativement en surface, interagissent électrostatiquement avec la membrane cellulaire, puis sont internalisées et concentrées dans des vésicules intracellulaires appelées endosomes (fig. 1).

Ce confinement des nanoparticules dans des endosomes, compartiments biologiques naturels, limite la toxicité du matériel magnétique introduit dans la cellule. Dans la perspective d'applications diagnostiques et thérapeutiques pour ces cellules « marquées magnétiquement », il est indispensable de vérifier l'innocuité biologique de ces marqueurs intracellulaires. Ce marquage a ainsi été testé sur un grand nombre de types cellulaires* : des cellules du système immunitaire, des cellules cancéreuses, des cellules musculaires, ou encore des cellules souches* [1]. Pour l'ensemble des cas étudiés,

nous avons vérifié que l'internalisation des nanoparticules magnétiques par les cellules ne modifie pas leur prolifération et surtout préserve leurs propriétés fonctionnelles et thérapeutiques, à la fois *in vitro* et *in vivo*. La biocompatibilité de ces marqueurs est ainsi garantie, autorisant leur utilisation *in vivo* pour des applications en thérapies cellulaires.

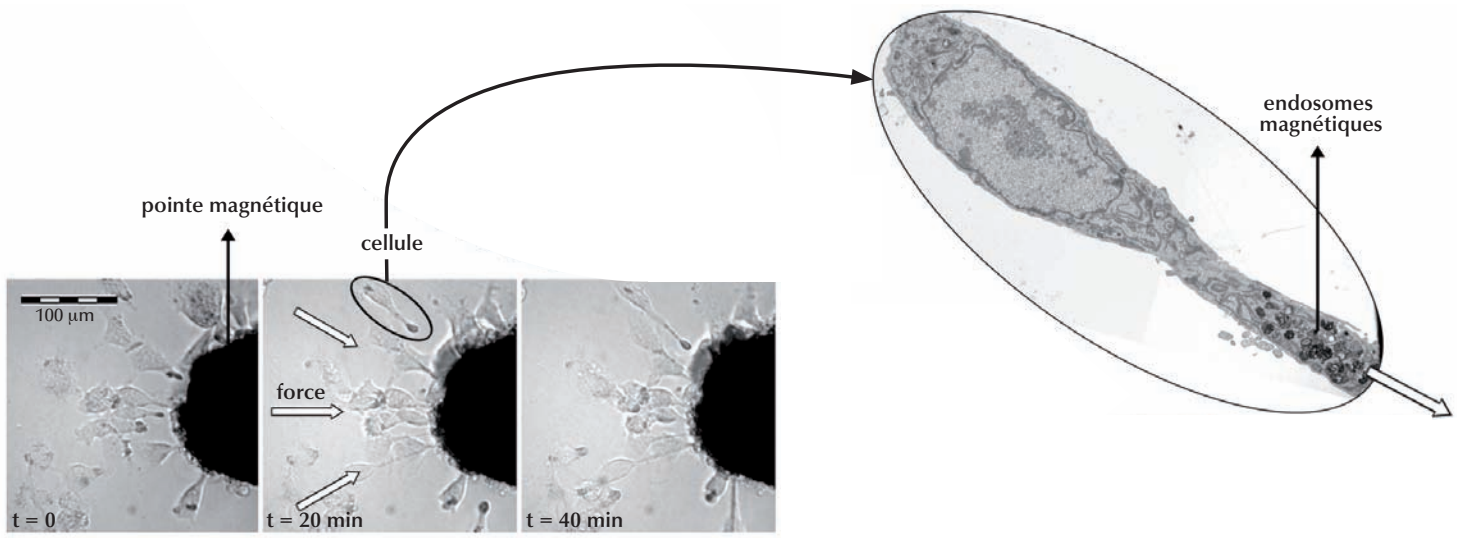
Le marquage confère à la cellule des propriétés superparamagnétiques : dans un champ magnétique externe, la cellule acquiert une aimantation proportionnelle à la masse de nanoparticules internalisées, et qui s'annule en dehors du champ. On peut ainsi activer de manière temporaire le magnétisme d'une cellule individuelle afin de la guider dans l'espace, sans modifier son comportement biologique.

Peut-on influencer à distance la migration cellulaire par des forces magnétiques ?

Actuellement, il existe très peu de réalisations expérimentales permettant d'orienter, en la contraignant par un champ de forces, la migration d'une cellule. Dans ce contexte, l'application d'une force magnétique à l'échelle des cellules présente plusieurs avantages : la force est à la fois localisée (les gradients magnétiques peuvent être focalisés dans une petite zone de l'espace) et s'applique « à distance » (aucun contact direct n'est nécessaire).

Nous avons développé une pointe magnétique, qui permet d'appliquer des





2. Attraction magnétique de cellules souches endothéliales*. Une pointe magnétique crée une force au niveau des endosomes, qui se regroupent du côté de la cellule proche de la pointe (comme on le voit sur le gros plan d'une cellule observée par microscopie électronique). Chaque cellule subit alors une force de quelques centaines de pN, provoquant sa migration vers la pointe (intervalle de temps entre deux images : 20 min).

>>>

gradients de champ de l'ordre de 1000 T/m dans un rayon de 100 μm . Chaque endosome rempli de nanoparticules magnétiques subit une force de quelques piconewtons (pN), suffisante pour rassembler la population d'endosomes d'un côté de la cellule (fig. 2), appliquant alors sur le corps cellulaire une force résultante qui avoisine le nanonewton (nN). Pour des cellules souches de cellules endothéliales*, l'application de la force magnétique nous a permis d'attirer les cellules individuelles au premier stade de leur différenciation permettant la formation de capillaires sanguins. Connaissant les forces magnétiques appliquées, qui s'ajoutent aux forces générées par la cellule pour induire sa migration spontanée, il est ainsi possible de quantifier ces forces d'origine biologique, qui se situent dans une gamme de l'ordre de la centaine de pN (fig. 2) [2].

Qu'en est-il si la migration cellulaire a lieu à des densités plus importantes, proches des conditions physiologiques d'un tissu, où les cellules interagissent fortement entre elles ?

Pour étudier un tel comportement, la cellule amibienne* *Dictyostelium* est un modèle particulièrement intéressant. En effet, au cours de son cycle de vie, elle passe d'un mode de vie individuel à un mode collectif, formant alors un agrégat multicellulaire structuré de plus de 100 000 cellules. La formation de l'agrégat est induite par la sécrétion par les cellules elles-mêmes d'une molécule chimiotactique* : le cAMP. On observe alors la formation de « lignes de courant » cellulaires qui se dirigent de manière

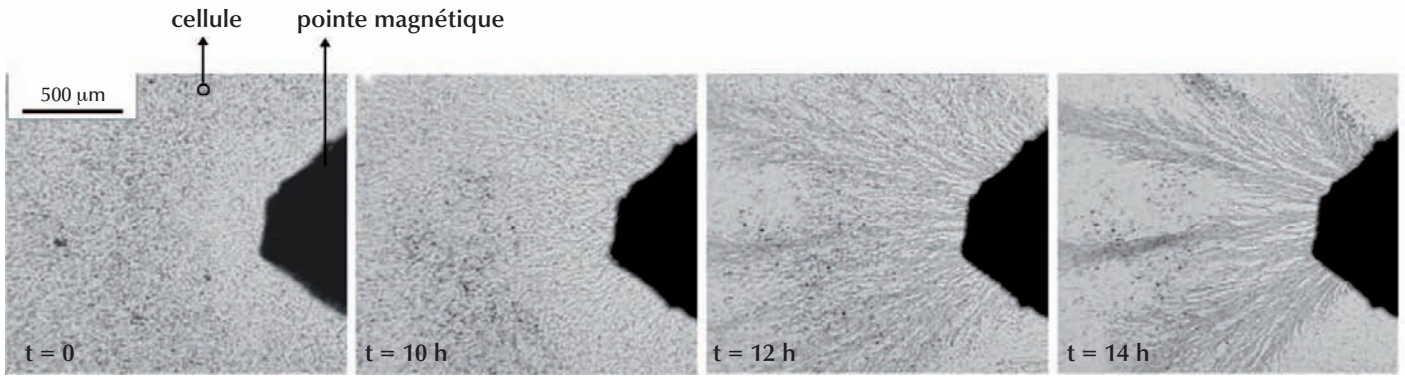
centripète vers un centre d'agrégation, suivant les gradients de molécules chimiques. Cette formation spontanée d'agrégats cellulaires a été mise en compétition avec une force magnétique [3]. Ainsi, l'application du gradient de champ très localisé créé par une pointe magnétique a permis de dévier les « lignes de courant cellulaires », en contrant les signaux chimiotactiques envoyés par les cellules. Les cellules magnétiques convergent alors massivement vers la pointe magnétique (fig. 3). La chimiotaxie* générée par la molécule signal cAMP est en compétition avec un phénomène de magnétotaxie*. En modifiant la force magnétique appliquée, on met en évidence un seuil de force minimal au-delà duquel la magnétotaxie seule gouverne le mouvement cellulaire. On quantifie alors la chimiotaxie intercellulaire, motrice en deçà de ce seuil, autour de 50 pN.

On peut également chercher à guider des cellules en suspension, sans interaction les unes avec les autres. La seule force à contrebalancer est la force visqueuse du milieu entourant les cellules. On parlera de magnétophorèse lorsque les cellules magnétiques sont placées dans un gradient magnétique uniforme. Si l'environnement magnétique est hétérogène, on peut aussi induire l'accumulation de cellules au niveau des points focaux de la carte de gradient de champ. On contrôle alors l'organisation spatiale des cellules magnétiques en suspension par des dispositifs d'attracteurs magnétiques, de géométrie bien définie. Cette technique peut être mise à profit par l'ingénierie tissulaire.

La cellule magnétique, brique élémentaire d'un meccano tissulaire

L'ingénierie tissulaire vise à réparer un tissu déficient dans l'organisme et à éviter les procédures chirurgicales lourdes, qui résolvent le problème sans parvenir à régénérer totalement les propriétés d'un tissu sain. Un tissu est un assemblage multicellulaire hautement organisé et hiérarchisé. L'ingénierie tissulaire doit donc focaliser son attention sur deux paramètres essentiels au maintien de la viabilité et de la fonctionnalité du tissu : la nature des cellules le composant, apportant leurs propriétés physiologiques spécifiques, et l'architecture tridimensionnelle globale, qui structure les interactions entre les différentes sous-unités cellulaires. Ainsi, si chaque cellule confère au tissu ses propriétés propres, en terme de métabolisme biologique ou de résistance mécanique, la structure globale assure une coordination fonctionnelle indispensable entre les différentes cellules constituant le tissu.

Différents outils peuvent être utilisés pour contrôler l'organisation spatiale des cellules et reproduire l'architecture native des tissus. L'application d'une force externe contraint le mouvement cellulaire, et force ainsi l'organisation cellulaire. Exploitant les propriétés électriques de la cellule vivante, certaines équipes ont pu utiliser des champs électriques localisés pour ordonner des cellules individuelles. D'autres ont fixé une bille de latex sur la membrane cellulaire, permettant de déplacer la cellule à l'aide de pinces optiques.



3. Mise en évidence du phénomène de magnétotaxie. Au début de la mise en carence (absence de nourriture dans le milieu des cellules) ($t=0$), les cellules amibiennes *Dictyostelium* sont individuelles et l'effet de la force magnétique ne modifie en rien leur comportement migratoire aléatoire. Dix heures après, la population de cellules entre dans un régime collectif. La phase d'agrégation est cette fois gouvernée par les forces magnétiques appliquées : les cellules convergent massivement vers la pointe, en suivant les lignes de forces.

Le marquage magnétique, lui, offre les avantages de n'utiliser comme champs de forces que des champs magnétiques, non nocifs pour les cellules, et de pouvoir appliquer localement des forces contrôlées simultanément sur l'ensemble de la population cellulaire. La géométrie de l'assemblage multicellulaire final peut ainsi être imposée de manière précise par une grande variété de paramètres, comme la géométrie de l'attracteur magnétique ou le nombre de cellules déposées (fig. 4) [4].

Un avantage de cette technique d'assemblage tridimensionnel de cellules est qu'elle se base sur une contrainte temporaire qui, une fois relâchée, ne modifie pas le métabolisme cellulaire. À l'issue d'une phase préalable de confinement cellulaire par les forces magnétiques, nous pouvons ainsi étudier le comportement spontané de cet agrégat en l'absence de toute force magnétique : la relaxation de l'assemblage cellulaire renseigne sur les interactions intercellulaires qui se sont développées en son sein.

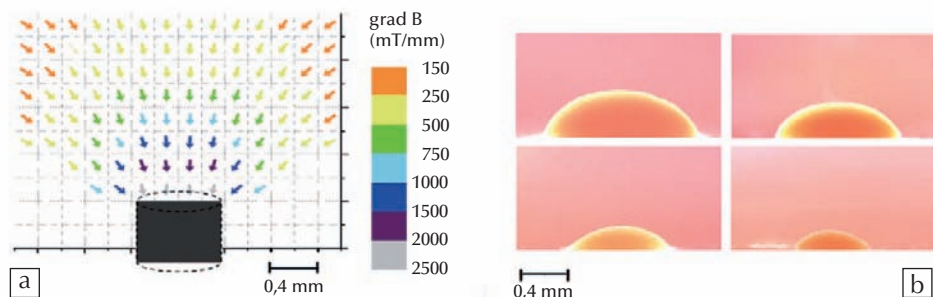
On observe en particulier des différences de comportement entre un agrégat de monocytes*, qui se désolidarisent rapidement pour s'étaler sur le substrat, et un agrégat de cellules tumorales, fortement adhérentes, qui forment un ensemble extrêmement cohésif. Pour une même souche cellulaire, la surexpression* des protéines d'adhésion provoque une transition d'un agrégat faiblement cohésif vers un agrégat très dense, dans lequel les cellules sont fortement liées. On avance donc ici vers une mesure de la cohésion tissulaire dans un objet biologique de

plusieurs centaines de milliers de cellules, se rapprochant d'un tissu.

Enfin, il devient possible de fabriquer un tissu mêlant plusieurs types cellulaires, comme l'on fait Ito *et al.* Cette équipe japonaise a également utilisé la technologie magnétique pour construire *in vitro* des feuillets cellulaires [5]. Par superposition de différents feuillets de cellules endothéliales, de cellules musculaires lisses et de fibroblastes*, ils sont parvenus à reconstituer un vaisseau sanguin, possédant les caractéristiques physiologiques requises (résistance hydrodynamique, faible risque de thrombose...) [6]. C'est la première étape vers la construction *in vitro* d'une architecture multicellulaire complexe.

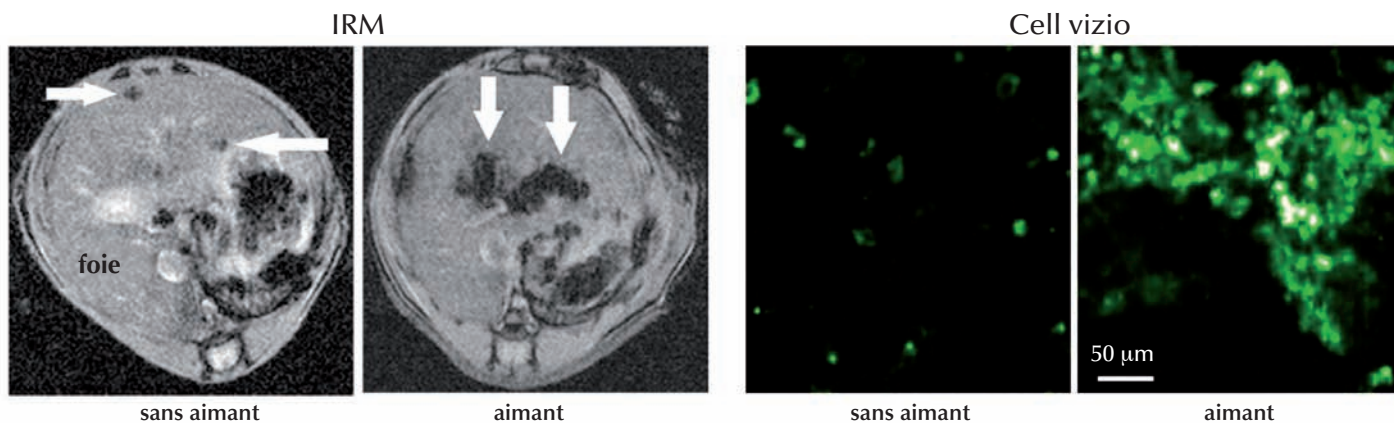
Vectorisation magnétique *in vivo*

Une stratégie alternative à la construction *in vitro* d'un tissu organisé est d'implanter directement *in vivo* des cellules qui vont spontanément participer à la régénération du tissu lésé. Le défi principal réside dans le guidage à distance et la localisation précise des cellules saines dans l'organisme. Les nouvelles propriétés magnétiques conférées aux cellules par l'internalisation de nanoparticules magnétiques vont être doublement utiles : d'une part pour guider les cellules (c'est ce qu'on appellera la vectorisation magnétique, réalisable avec des champs magnétiques de la fraction du tesla, et des gradients dans la gamme 10-100 T/m), d'autre part pour les localiser par imagerie par résonance magnétique (IRM).



4. Cartographie des gradients de champ et empilements de cellules générés par une pointe magnétique en fer doux.

a : Gradients de champ (flèches en couleurs) générés par une pointe magnétique (en noir) de symétrie cylindrique. b : Empilement de cellules correspondant à la figure a (de 10^5 cellules en haut à gauche à 10^4 cellules en bas à droite) ; les cellules, dont on contrôle exactement le nombre, sont déposées au-dessus de l'attracteur magnétique. L'organisation des cellules peut ainsi être modulée à l'échelle submillimétrique.



5. Sous l'effet d'un aimant externe, des hépatocytes magnétiques injectés dans la rate migrent vers le foie, où ils s'implantent beaucoup plus massivement que sans aimant. Cet effet peut être observé globalement par imagerie par résonance magnétique (IRM), où les cellules apparaissent en noir du fait de leur contenu en nanoparticules magnétiques qui sont des agents de contraste IRM provoquant une diminution du signal. À l'échelle de la cellule, la colonisation des cellules magnétiques (préalablement rendues fluorescentes dans le vert) dans le foie peut être observée grâce au *Cell Vizio* (« biopsie optique ») qui permet de faire une microscopie confocale intravitale.

(Coll. : Olivier Clément, Hôpital européen Georges Pompidou).

Références

- 1• C. Wilhelm et F. Gazeau, "Universal cell labelling with anionic magnetic nanoparticles", *Biomaterials*, **29** (2008) 3161.
- 2• C. Wilhelm *et al.*, "Magnetic control of vascular network formation with magnetically labeled Endothelial Progenitor Cells", *Biomaterials*, **28** (2007) 3797.
- 3• C. Wilhelm, C. Rivière et N. Biais, "Magnetic control of Dictyostelium aggregation", *Phys Rev E*, **75** (2007) 041906.
- 4• G. Frasca, F. Gazeau et C. Wilhelm, "Formation of three-dimensional multicellular assembly using magnetic patterning", *Langmuir*, **25** (2009) 2348.
- 5• A. Ito *et al.*, "Construction of Heterotypic Cell Sheets by Magnetic Force-Based 3-D Coculture of HepG2 and NIH3T3 Cells", *J. Biosci. Bioeng.*, **104** (2007) 371.
- 6• A. Ito *et al.*, "Novel Methodology for Fabrication of Tissue-Engineered Tubular Constructs Using Magnetite Nanoparticles and Magnetic Force", *Tissue Eng.*, **11** (2007) 1553.
- 7• A. Luciani *et al.*, "Magnetic targeting of murine hepatocytes dually labelled with magnetic and fluorescent markers in a liver cell transplant model", *Eur. Radiol.* **19** (2009) 1087-1096.
- 8• K. Kaluza et R.G. Vile, "Magnetic cells for cancer therapy: Adopting magnets for cell-based cancer therapies", *Gene Therapy, News and Commentary*, **15** (2008) 1511-1512.
"Magnetic Cell Therapy", *Technology Review*, www.technologyreview.com/Biotech/20022/.

>>>

Peut-on manipuler des cellules directement dans l'organisme vivant ? Peut-on attirer ou retenir des cellules au plus près de leur cible à l'aide de forces à distance ? Il s'agit d'un enjeu majeur dans le cadre des thérapies cellulaires, car la distribution des cellules implantées dans l'organisme reste mal contrôlée.

Ainsi, nous avons testé la vectorisation magnétique de cellules dans un modèle de thérapie du foie. La thérapie cellulaire hépatique consiste à implanter des hépatocytes* dans le foie pour qu'ils y reconstituent le tissu lésé. Nous avons rendu magnétiques ces hépatocytes, montré que leur distribution dans le foie pouvait être suivie par IRM, et nous avons démontré que l'application d'un aimant sur le foie permettait de favoriser l'implantation des cellules dans cet organe, après injection au niveau de la rate (fig. 5) [7].

Nous avons également tenté de démontrer que la vectorisation magnétique de cellules pourrait améliorer les techniques de thérapie cellulaire cardiaque (collaboration Philippe Menasché, INSERM U633, Olivier Clément, INSERM U970, HEGP, Paris). L'objectif de ces thérapies est de régénérer par implantation de nouvelles cellules souches des zones irréversiblement détruites du myocarde. L'un des problèmes actuels est le faible taux de rétention des cellules injectées dans l'organe cible, ce qui réduit l'efficacité thérapeutique. Nous avons démontré, avec un modèle d'injection de cellules progénitrices endothéliales dans un cœur infarcté chez le rat, que l'application d'un

aimant externe permettait de faciliter la rétention des cellules, augmentant nettement leur nombre dans le muscle cardiaque.

Récemment, la pose de *stents* magnétiques a permis d'avancer vers des stratégies actives de régénération des tissus lésés [8]. Ces dispositifs métalliques sont communément utilisés pour dilater une artère rétrécie. Ainsi, des *stents* magnétiques ont été proposés pour générer des champs magnétiques locaux, favorisant l'adhésion de cellules circulantes magnétiques sur l'artère endommagée et sa régénération naturelle. Il devient également possible d'envisager la vectorisation de drogues, associées dans un nanoconteneur avec du matériel magnétique, venant agir préférentiellement au niveau du *stent* pour y libérer des substances favorisant la régénération du tissu endommagé.

Conclusion

L'internalisation de nanoparticules magnétiques au cœur des cellules permet de développer des techniques innovantes pour (i) appliquer une force contrôlée pendant la migration cellulaire, (ii) contrôler la géométrie d'assemblages cellulaires à trois dimensions, et (iii) guider une population cellulaire dans l'organisme. Ces contraintes mécaniques sont créées dans l'espace intracellulaire, au niveau des endosomes chargés en nanoparticules magnétiques. Chaque cellule subit ainsi une force magnétique calibrée, pouvant être modulée dans le temps et dans l'espace. Les applications directes concernent l'ingénierie tissulaire et les thérapies cellulaires. ■