

## EVALUATION PAR BIOLUMINESCENCE D'UN TRAITEMENT PAR PLASMA FROID FIBRE SEUL OU EN ASSOCIATION AVEC LA GEMCITABINE DANS UN MODELE ORTHOTOPIQUE DE CARCINOME PANCREATIQUE MIA PACA-LUC

Laura BRULLÉ<sup>1,2</sup>, Delphine RIES<sup>3</sup>, Stéphanie LERONDEL<sup>1</sup>, Eric ROBERT<sup>3</sup>, Eric MARTEL<sup>2</sup>, Pascal CHAMPEROUX<sup>2</sup>, Jean-Michel POUVESLE<sup>3</sup>, Alain LE PAPE<sup>1</sup>

1. *CIPA-TAAM UPS44, 3B rue de la Férollerie 45071 Orléans Cédex 2*
2. *CERB, Chemin de Montifault 18800 Baugy*
3. *GREMI, Université d'Orléans, 14 rue d'Issoudun, B.P.6744, 45067 Orléans Cedex 2*

Le cancer du pancréas est le cancer gastrointestinal ayant le plus mauvais pronostic chez l'homme, avec un taux de survie à 5 ans de 5%. A ce jour, aucune chimiothérapie n'a démontré d'efficacité en termes de survie pour ce cancer. Au sein du laboratoire, une nouvelle thérapie ciblée, par plasma froid fibré généré à l'extrémité d'un petit capillaire, appelé aussi plasma gun, a démontré des effets significatifs sur la croissance tumorale du carcinome colorectal HCT116-luc et du glioblastome U87 MG-luc, in vitro et in vivo.

Afin d'expérimenter cette nouvelle stratégie anticancéreuse, un modèle orthotopique de carcinome pancréatique Mia Paca-luc a été développé afin de représenter le plus possible la pathologie humaine et de générer une tumeur primaire ainsi que des métastases, dans un environnement tissulaire similaire à celui d'origine.

Le but de cette étude est de caractériser le comportement de cellules de carcinome pancréatique Mia Paca-luc d'origine humaine, greffés en orthotopique chez la souris nude et de déterminer l'effet d'une nouvelle thérapie par plasma gun seul ou en association avec une chimiothérapie standard, la gemcitabine, sur l'évolution tumorale, par imagerie de bioluminescence in vivo.

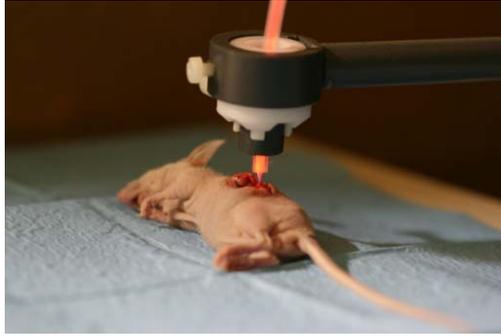
**Matériels et méthodes :** Les cellules Mia Paca-luc préalablement transduites par le gène de la luciférase sont injectées en orthotopique, au niveau de la tête du pancréas, à l'aide d'un micromanipulateur, à des souris swiss nudes. Après 4 jours (temps de prise de la greffe) les souris sont imagées par bioluminescence puis traitées par plasma gun et/ou Gemcitabine. Les souris ont subi 3 séances de traitements espacées de 10 jours au plasma gun, ainsi que 5 séances de traitement espacées de 5 jours à la Gemcitabine (200mg/kg) (Cf. schéma de traitement).

Un suivi longitudinal de l'évolution tumorale a été réalisé une fois par semaine par imagerie de bioluminescence.

### **Figure 1 : Schéma de traitement**

**Résultats et discussion :** Les cellules Mia Paca-luc génèrent des tumeurs de nature hypoxique que nous avons caractérisées dans une phase de validation du modèle, y compris par immuno-histochimie (anticorps anti-pimonidazole). Au-delà de 40 jours aucune évaluation quantitative de l'évolution tumorale par bioluminescence n'est pertinente car l'émission de lumière n'est plus proportionnelle au volume tumoral, compte tenu de la dépendance de l'imagerie de l'expression de la luciférase vis-à-vis du métabolisme (O<sub>2</sub> et ATP).

Durant cette période de 40 jours, des effets significatifs sur la réduction de la croissance tumorale ont été observés chez les souris traitées au plasma gun et/ou à la gemcitabine, cela dès le 14<sup>e</sup> jour post traitement (Cf. figure 2).



**Figure 2 : Effets d'un traitement au plasma gun ou à la gemcitabine sur la croissance tumorale**

Dans ce modèle de carcinome pancréatique Mia Paca-luc, l'estimation en temps réel de l'évolution tumorale par bioluminescence permet de comparer les effets du plasma gun en fonction de la nature du gaz et d'évaluer l'efficacité thérapeutique du plasma seul ou en association avec la gemcitabine, sur la croissance tumorale et la dissémination métastatique. Les effets sur l'inhibition de la croissance tumorale des souris traitées au plasma gun semblent très prometteurs.

## EVALUATION BY BIOLUMINESCENCE OF A NON THERMAL PLASMA TREATMENT ALONE OR IN COMBINATION WITH GEMCITABINE IN A MIA PACA-LUC ORTHOTOPIC PANCREATIC CARCINOMA MODEL

Laura BRULLÉ<sup>1,2</sup>, Delphine RIES<sup>3</sup>, Stéphanie LERONDEL<sup>1</sup>, Eric ROBERT<sup>3</sup>, Eric MARTEL<sup>2</sup>, Pascal CHAMPEROUX<sup>2</sup>, Jean-Michel POUVESLE<sup>3</sup>, Alain LE PAPE<sup>1</sup>

1. *CIPA-TAAM UPS44, 3B rue de la Férollerie 45071 Orléans Cédex 2*
2. *CERB, Chemin de Montifault 18800 Baugy*
3. *GREMI, Université d'Orléans, 14 rue d'Issoudun, B.P.6744, 45067 Orléans Cedex 2*

Pancreatic cancer is the gastrointestinal cancer with the worst prognosis in humans and with a survival rate of 5% at 5 years. Nowadays, no chemotherapy has demonstrated efficacy in terms of survival for this cancer. In our laboratory, a new targeted therapy by Non Thermal Plasma (NTP) generated at the extremity of a very small capillary and so called plasma gun, showed significant effects on tumor growth in a colorectal carcinoma HCT116 and in a glioblastoma U87 MG, in vitro and in vivo.

To experiment this new anticancer strategy, a Mia Paca-luc orthotopic pancreatic carcinoma model was developed to represent as much as possible the human disease and to generate primary tumor and metastases, in a tissue similar to the original.

The aim of this study was to characterize the human Mia Paca-luc pancreatic carcinoma cells behavior, grafted orthotopically in nude mice and to determine the effects of a new therapy by plasma gun alone or in combination with a standard chemotherapy, gemcitabine, on tumor growth, by in vivo bioluminescence imaging.

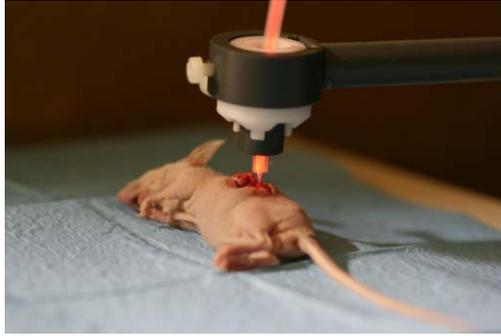
**Materials and methods:** Mia Paca-luc cells, previously transduced by luciferase gene were orthotopically implanted with a micro-manipulator into the head of pancreas in nude mice. After 4 days (time required for engraftment) mice were imaged by bioluminescence and then treated with plasma gun and/or gemcitabine. Mice underwent three treatment sessions spaced 10 days with plasma gun, or 5 treatment sessions spaced 5 days with Gemcitabine (200 mg/kg) (see Figure 1).

A longitudinal follow of tumor growth was carried out once a week by bioluminescence imaging.

### Figure 1: Experiment schedule

**Results and discussion:** Mia Paca-luc cells generate hypoxic tumors that we characterized in a previous validation phase of model, including immuno-histochemistry (anti-pimonidazole antibodies). Beyond 40 days, no bioluminescence quantitative assessment of tumor progression is relevant, because light emission is not proportional to tumor volume, given the dependence of luciferase expression imaging towards the metabolism (O<sub>2</sub> and ATP).

During this 40 days period, significant inhibition of tumor growth was observed in plasma gun and/or gemcitabine treated mice, this from the 14th day post treatment (see figure 2).



**Figure 2: Effects of plasma gun or gemcitabine treatments on tumor growth**

In this Mia Paca-luc pancreatic carcinoma model, the real-time estimation of tumor progression by bioluminescence allows to compare plasma gun effects depending on the gas and to assess the therapeutic efficacy of plasma gun alone or in combination with gemcitabine, on tumor growth and metastasis. The effects on the inhibition of tumor growth in plasma gun treated mice look very promising.

## **FUSION DU CELL-SELEX ET D'UNE METHODE DE CRIBLAGE PAR IMAGERIE FLUORESCENTE *IN VIVO* POUR IDENTIFIER DES APTAMERES CIBLANT DES TUMEURS ET DES BIOMARQUEURS.**

Agnes Cibiel<sup>1,2</sup>, Anikitos Garofalakis<sup>1,2</sup>, Karine Gombert<sup>1,2</sup>, Bertrand Tavitian<sup>1,2</sup>, Carine Pestourie<sup>1,2</sup> and Frédéric Ducongé<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> CEA, DSV, I<sup>2</sup>BM, Service Hospitalier Frédéric Joliot (SHFJ), 4 place du général Leclerc, 91401 Orsay-France

<sup>2</sup> INSERM U1023, Laboratoire d'Imagerie Moléculaire Expérimentale, Université Paris Sud, 4 place du général Leclerc, 91401 Orsay-France

Les aptamères sont des oligonucléotides de petite taille (<100 bases) sélectionnés à partir d'une population de séquences aléatoires ( $10^{12}$  à  $10^{15}$ ) pour leur capacité à se lier une cible (acides aminés, antibiotiques, protéines ...). Ces ligands sont isolés par une méthode d'évolution moléculaire dirigée, généralement appelée SELEX (évolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel). Depuis 2005, notre groupe a adapté le SELEX contre des cellules vivantes. En utilisant cette méthode (cell-SELEX), nous avons sélectionné plusieurs aptamères ARN 2'-fluoro-pyrimidines (2'-F-Py) contre des biomarqueurs qui sont surexprimés à la surface de cellules cancéreuses. En utilisant des techniques d'imagerie *in vivo* par fluorescence (planaire et 3D), nous avons étudié leur biodistribution et leur capacité à cibler des tumeurs dans des modèles murins. Malgré une forte affinité pour les cellules *in vitro*, un seul aptamère (nommé ACE8) présente une captation significative dans la tumeur par rapport à une séquence contrôle (respectivement  $0,67 \pm 0,16$  et  $0,07 \pm 0,06$  % de la dose injectée, trois heures après l'injection). Cet aptamère a ensuite été utilisé pour purifier et identifier sa cible : l'annexine A2 (AI1). Cette protéine est un marqueur connu du cancer qui est impliqué dans les métastases et l'angiogenèse. De plus, nous avons également démontré que l'aptamère ACE8 inhibe l'angiogenèse dans un modèle *in vitro* de formation de tubes endothéliaux.

En conclusion, le SELEX effectué contre les cellules vivantes peut sélectionner rapidement et simultanément des aptamères contre des cibles différentes de la surface des cellules. Le criblage par imagerie fluorescente représente une méthode puissante pour discriminer ceux qui peuvent se lier à une cible d'intérêt thérapeutique et, surtout, ceux qui ont le plus de chance d'être rapidement utilisés *in vivo*. Ainsi, cette stratégie peut avoir une application, non seulement pour identifier des traceurs pour l'imagerie, mais aussi pour identifier des biomarqueurs de tumeurs.

## **FUSION OF CELL-SELEX AND *IN VIVO* IMAGING-BASED SCREENING TO IDENTIFY BOTH TUMOR-TARGETING APTAMERS AND BIOMARKERS.**

Agnes Cibiel<sup>1,2</sup>, Anikitos Garofalakis<sup>1,2</sup>, Karine Gombert<sup>1,2</sup>, Bertrand Tavitian<sup>1,2</sup>, Carine Pestourie<sup>1,2</sup> and Frédéric Ducongé<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> CEA, DSV, I<sup>2</sup>BM, Service Hospitalier Frédéric Joliot (SHFJ), 4 place du général Leclerc, 91401 Orsay-France

<sup>2</sup> INSERM U1023, Laboratoire d'Imagerie Moléculaire Expérimentale, Université Paris Sud, 4 place du général Leclerc, 91401 Orsay-France

Aptamers are short oligonucleotides (< 100 bases) selected from large combinatorial pools of sequences (from 10<sup>12</sup> to 10<sup>15</sup>) for their capacity to bind a target (amino acids, antibiotic, proteins...). Such ligands are isolated by a method of directed molecular evolution usually named SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment). Since 2005, our group have adapted the SELEX against whole living cells. Using this strategy (named cell-SELEX), we selected several nuclease resistant 2'-Fluoro-pyrimidines (2'-F-Py) RNA aptamers against cell surface biomarkers that can represent surrogate markers of cancer cells. Using fluorescence imaging techniques (planar and tomography), we investigated their biodistribution and tumour targeting capacities in nude mouse xenograft models. Despite high affinity against cells *in vitro*, only one aptamer (named ACE8) exhibited significant tumor uptake compared to a control sequence (0.67 ± 0.16% of injected dose 3 hours after injection compared to 0.07 ± 0.06%, respectively). This aptamer was then used to purify and identify its target, annexin A2 (AI), a known cancer biomarker involved in metastasis and angiogenesis. Accordingly, we also demonstrated that ACE8 inhibits angiogenesis in an endothelial tube formation assay.

In conclusion, since SELEX performed against living cells can select several aptamers against different cell surface targets in parallel, we postulate that *in vivo* imaging-based screening using fluorescence imaging represents a powerful method to discriminate those that can bind a target of therapeutic interest and, most importantly, that have the highest chance of being rapidly translated for *in vivo* use. Thus, fusion of cell-SELEX with fluorescence imaging-based screening can have a broad application not only to identify tracers for imaging but also "druggable" tumor-associated biomarkers.

# MESURES CORTICALES ET DE MICRO-ARCHITECTURE TRABÉCULAIRE EN HIGH RESOLUTION-PERIPHERAL QUANTITATIVE COMPUTED TOMOGRAPHY AU TIBIA : COMPARAISON AVEC LA MICRO-TOMOGRAPHIE PAR RAYONNEMENT SYNCHROTRON

**CHAPPARD Christine<sup>1</sup>, PEYRIN Françoise<sup>2</sup>, FERNANDEZ Sylvie<sup>3</sup>, DE VERNEJOL Marie Christine<sup>3</sup>.**

*1 B20A UMR 7052-CNRS-Paris Diderot-Pres Sorbonne Paris Cité, 10 avenue de Verdun 75010, Paris*

*2 ID 19, ESRF, 10 rue Jules Horowitz 38043, Grenoble*

*3 U606 Inserm Paris Diderot-Pres Sorbonne Paris Cité, 2 rue Ambroise Paré 75010 Paris*

**Introduction :** L'absorptiométrie biphonique est la technique utilisée en routine clinique pour évaluer la fragilité osseuse. Il existe un scanner haute résolution dédié à l'évaluation de la micro-architecture trabéculaire (XtremeCT Scanco®, Bassedorf Suisse) qualifié de High-resolution peripheral Quantitative Computed Tomography (HR-pQCT). Cet outil a pour caractéristique de séparer l'os trabéculaire de l'os cortical avec une taille de voxels de  $82 \mu\text{m}^3$  sur des sites périphériques comme le tibia ou le radius. Cette méthode est largement utilisée en recherche clinique pour tester l'efficacité des traitements anti-ostéoporotiques.

Jusqu'à présent seuls des études de validation de HR-pQCT ont été réalisées avec un micro-scanner par rayonnement X conventionnel et sur un petit nombre de pièces osseuses. Néanmoins, la méthode de référence est la micro computed tomography (micro-CT) par rayonnement synchrotron qui a comme principales caractéristiques un rayonnement monochromatique, un faisceau à géométrie parallèle ce qui permet d'améliorer le contraste, le rapport signal sur bruit et d'obtenir une reconstruction exacte.

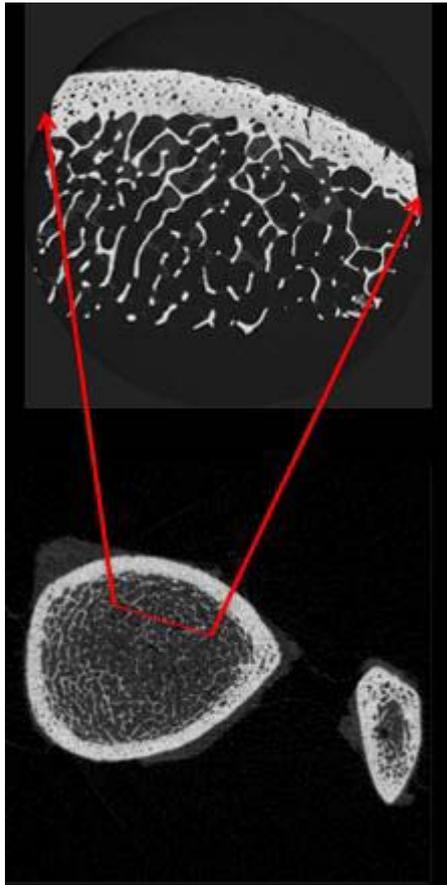
**Matériel et méthodes :** Nous avons étudié 30 pièces osseuses de tibia humain (20 femmes et 10 hommes d'âge moyen :  $82,2 \text{ ans} \pm 9,7$ ).

Les paramètres d'acquisition en HR-pQCT sont 60kV, 95mA, champ de vue :  $1536 \times 1536$  sur un total de 110 coupes. L'atténuation locale est convertie en équivalent hydroxy-apatite (HA). La zone mesurée se situe à 4 cm du pilon tibial pour une mesure en globalité (globale) et locale (Voir Figure 1).

La segmentation de l'os est obtenue à l'aide d'un filtre Hamming et par un seuil situé à 18% de la hauteur du pic des niveaux de gris de l'os. Les paramètres obtenus sont la Densité trabéculaire (Dtrab), le BV/TV pour la proportion d'os, l'épaisseur des travées Tb.Th, l'espacement inter-travées Tb.Sp, le nombre de travées Tb.N, l'épaisseur corticale (Ct.Th) et la densité corticale (Dcomp).

Les acquisitions SR micro-CT ont été réalisées sur la ligne ID19 ESRF Grenoble. Les paramètres d'acquisition sont 30KeV, 3500 vues, rotation  $360^\circ$  avec un détecteur de taille  $2048 \times 2048$ , la résolution est de  $7.5 \mu\text{m}^3$ .

Les paramètres mesurés pour l'os trabéculaire sont BV/TV, Tb.Th, Tb.Sp, Tb.N. Pour l'os cortical, les paramètres mesurés sont l'épaisseur corticale, la porosité corticale PoV/TV, la surface spécifique des pores (PoS/BV), le diamètre des pores (Po.Dm), le nombre de pores (Po.N), l'espacement des pores (Po.Sp).



**Résultats** : Les résultats de corrélation sont représentés dans la table 1.

Les coefficients de corrélation sont améliorés en analyse locale par rapport à l'analyse globale pour l'os trabéculaire. Dcomp est fortement corrélé à la porosité corticale mais l'analyse locale ne permet pas d'améliorer la relation entre les paramètres. L'épaisseur corticale en HR-pQCT versus l'épaisseur corticale en micro-CT est  $r=0,55$  (global) et  $r=0,66$  (local).

Figure 1 : Image HR-pQCT et de micro-CT par rayonnement synchrotron

Table 1 : Résultats de corrélation entre les mesures corticales et trabéculaire en HR-pQCT globale et locale (italique).

Trabéculaire						Corticale	
HR-pQCT /SR	Dtrab	BV/TV	Tb.Th	Tb.N	Tb.Sp	Dcomp	
BV/TV	0,55**/ 0,71 <sup>‡</sup>	0,57**/ 0,71 <sup>‡</sup>	ns/ 0,46**	0,59**/ 0,72 <sup>‡</sup>	-0,49*/ -0,66**	-0,78 <sup>‡</sup> / -0,38*	PoV/TV
BS/BV	ns/ -0,57**					0,54**/ ns	PoS/BV
Tb.N	0,57**/ 0,62 <sup>‡</sup>					-0,74 <sup>‡</sup> / ns	Po.N
Tb.Th	ns/ 0,54**					-0,63 <sup>‡</sup> / ns	Po.Dm
Tb.Sp	-0,68 <sup>‡</sup> / -0,57**					0,71 <sup>‡</sup> / ns	Po.Sp

**Conclusion** : La micro-architecture trabéculaire et la porosité corticale peuvent être évaluées raisonnablement en HR-pQCT mais avec une plus grande incertitude sur les mesures d'épaisseur liées à la résolution.

# CORTICAL BONE AND TRABECULAR MICRO-ARCHITECTURE MEASUREMENTS WITH HIGH RESOLUTION PERIPHERAL QUANTITATIVE COMPUTED TOMOGRAPHY AT THE TIBIA: COMPARISON WITH MICRO-TOMOGRAPHY USING SYNCHROTRON RADIATION

CHAPPARD Christine<sup>1</sup>, PEYRIN Françoise<sup>2</sup>, FERNANDEZ Sylvie<sup>3</sup>, DE VERNEJOU Marie Christine<sup>3</sup>.

1 B20A UMR 7052-CNRS-Paris Diderot-Pres Sorbonne Paris Cité, 10 avenue de verdun 75010, Paris

2 ID 19, ESRF, 10 rue Jules Horowitz, 38043, Grenoble

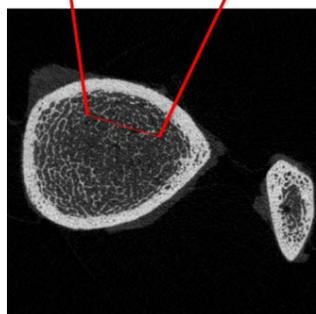
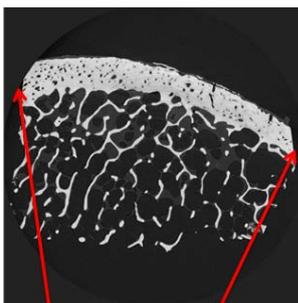
3 U606 Inserm Paris Diderot-Pres Sorbonne Paris Cité, 2 rue Ambroise Paré 75010 Paris

**Introduction:** Dual X-ray absorptiometry is the technique used in clinical routine to evaluate bone fragility. There is a high-resolution peripheral computed tomography device (HR-pQCT) dedicated to the assessment of trabecular microarchitecture and measurement of cortical thickness (XtremeCT Scanco®, Bâle, Switzerland). This tool has the characteristics to separate trabecular bone of the cortical bone with a voxel size of  $82 \mu\text{m}^3$  and is used for peripheral sites such as the tibia or radius. This method is widely used in clinical research to test the effectiveness of anti-osteoporotic drugs.

Until now, validation studies of HR-pQCT were performed on few bones using micro computed tomography (microCT) with conventional X-rays. However, the reference method is the micro-CT using synchrotron radiation with two main features: a monochromatic radiation beam and a parallel geometry. These characteristics improve the contrast, the signal to noise ratio and allow an exact reconstruction.

**Material and methods:** We studied 30 human tibias (20 women and 10 men of mean age  $82.2 \text{ years} \pm 9.7$ ). HR-pQCT acquisition parameters were 60kV, 95mA, field of view:  $1536 * 1536$  on a total of 110 slices. The local attenuation is converted to equivalent hydroxyapatite (HA). The region of interest was 4 cm from the tibial joint limit, global and local measurements were performed (see Figure 1).

The segmentation of bone is obtained using a Hamming filter and a threshold at 18% height of the bone gray levels peak. The parameters obtained are the trabecular density (Dtrab), the BV / TV for the proportion of bone, the trabecular thickness (Tb.Th), the trabecular spacing (Tb.Sp), the trabecular number (Tb.N), the cortical thickness and cortical density (Dcomp).



The SR micro-CT acquisitions were performed on the line: ID19 ESRF Grenoble. Acquisition parameters were 30KeV, 3500 views, rotation:  $360^\circ$ , detector size:  $2048 * 2048$ , the voxel size is  $7.5 \mu\text{m}^3$ .

The parameters measured for the trabecular bone are BV / TV, Tb.Th, Tb.Sp, Tb.N. For cortical bone, the measured parameters are cortical thickness, cortical porosity, PoV / TV, the surface area of pores (PoS / BV), the pore diameter (Po.Dm), the number of pores (Po. N), the spacing of the pores (Po.Sp)

**Results :** Correlation coefficients results are represented in Figure 1.

The correlation coefficients were improved by local analysis versus global analysis for the trabecular bone. Dcomp was highly correlated with cortical porosity, but the local analysis did not improve the relationship between the parameters. The cortical thickness in HR-pQCT versus cortical thickness in micro-CT was  $r = 0.58$  (global) and  $r=0.66$  (local).

Figure 1: images from HR-pQCT and micro-CT by synchrotron radiation from the same region.

Table 1 : Results of correlation between HR-pQCT measurements performed globally and locally and SR micro-CT.

Trabéculaire						Corticale	
HR-pQCT /SR	Dtrab	BV/TV	Tb.Th	Tb.N	Tb.Sp	Dcomp	
BV/TV	0,55**/ 0,71‡	0,57**/ 0,71‡	ns/ 0,46**	0,59**/ 0,72‡	-0,49*/ -0,66**	-0,78‡/ -0,38*	PoV/TV
BS/BV	ns/ -0,57**					0,54**/ ns	PoS/BV
Tb.N	0,57**/ 0,62‡					-0,74‡/ ns	Po.N
Tb.Th	ns/ 0,54**					-0,63‡/ ns	Po.Dm
Tb.Sp	-0,68‡/ -0,57**					0,71‡/ ns	Po.Sp

**Conclusion:** The trabecular microarchitecture and cortical porosity can be evaluated reasonably in HR-pQCT, because of low resolution, there is an uncertainty in thickness measurements for both trabecular and cortical bone.

## **Interactions entre différentes populations de macrophages et axones lésés dans la moelle épinière de souris adultes: une étude in vivo par imagerie biphotonique**

Keith K FENRICH, Pascal WEBER, Mélanie HOCINE, Genviève ROUGON, Franck DEBARBIEUX

*IBDML - Developmental Biology Institute of Marseille-Luminy  
Universite Aix Marseille II  
Case 907 - Parc Scientifique de Luminy  
13009 Marseille  
France*

Suite à une lésion de la moelle épinière (SCI) des macrophages sont recrutés au site de lésion où ils sont activés et contribuent alors à la rétraction des axones (Horn et al., J Neurosci. 2008, 28 (38) :9330-41). Des études récentes décrivent cependant l'existence d'une sous-population de macrophages dérivée des monocytes, caractérisée par la co-expression des marqueurs Ly6 et CD11c, et ayant des effets bénéfiques sur la régénération axonale (Shechter, et al, PLoS Med 2009, 6 (7): e1000113). La controverse apparente entre ces travaux pourrait résulter d'un recrutement séquentiel et dynamique de différentes populations de macrophages (Ly6 (+) par rapport Ly6 (+) / CD11c (+)). Seule une étude in vivo de la dynamique des interactions entre ces populations de macrophages et les axones lésés peut permettre de clarifier leurs rôles spécifiques dans la récupération post-traumatique. Notre objectif est donc d'examiner sur plusieurs mois par microscopie biphotonique in vivo les interactions entre axones et macrophages suite à une lésion de la moelle épinière.

Nous avons pour cela développé un protocole de vitre dorsale que nous implantons sur des souris fluorescentes multicolores ayant des axones des ganglions dorsaux (DRG) marqués en bleu (Thy1-CFP), les cellules myelomonocytes, et monocytes-macrophages marqués en vert (LysM-GFP), les cellules dendritiques et la microglie myéloïde marqués en jaune (CD11c-YFP). Cette approche, nous permet d'acquérir des images à résolution subcellulaire dans la moelle épinière intacte et de répéter les sessions d'imagerie jusqu'à 21 fois sur une période de 205 jours. Nous montrons sur animaux contrôles que l'implantation de ces fenêtres est sans effet intrinsèque sur le réseau axonal et qu'elle ne produit que des augmentations mineures et transitoires des densités de cellules LysM (+) dans les régions périvasculaires et de cellules CD11c (+) dans la matière blanche. Sur animaux lésés, nos images supportent l'idée d'une interaction entre les cellules LysM (+) ou CD11c (+) et les bulbes de rétraction des axones DRG.

Ainsi, dès le deuxième jour après section des colonnes dorsales par une aiguille, les cellules LysM (+) envahissent les zones périlésionnelles et dans une moindre mesure le site de lésion. Une proximité inférieure à 0,3  $\mu$ m a plusieurs fois été observée entre les terminaisons lésées des axones DRG et les cellules LysM (+). Des enregistrements temps réel ont également montré le phénotype très motile de certaines cellules CD11c (+) qui établissent des interactions transitoires et dynamiques avec les axones lésés. De façon générale l'épicentre est d'ailleurs plus densément peuplé par les cellules CD11c (+) que par les cellules Lys6 (+). Nos études à long terme de la distribution relative de ces populations de macrophages et l'étude de la dynamique à long terme des interactions cellulaires devrait permettre de préciser si tous les macrophages sont délétères pour les axones, ou si la population de cellules LysM (+) / CD11c (+) au moins peut avoir un effet bénéfique.

## **Differential interactions between macrophages and axotomized dorsal root ganglia axons in the adult mouse spinal cord: an in vivo two-photon imaging study**

Keith K FENRICH, Pascal WEBER, Mélanie HOCINE, Genviève ROUGON, Franck DEBARBIEUX

*IBDML - Developmental Biology Institute of Marseille-Luminy  
Universite Aix Marseille II  
Case 907 - Parc Scientifique de Luminy  
13009 Marseille  
France*

Following a spinal cord injury (SCI) macrophages are recruited to the injury site where they were shown to mediate axonal die-back once activated (Horn et al., J Neurosci. 2008, 28(38):9330-41). Recent reports, however, describe a subpopulation of monocyte-derived macrophages with beneficial effect on axonal regeneration (Shechter, et al., PLoS Med. 2009, 6(7): e1000113) characterized by the co-expression of Ly6, and CD11c. The apparent controversy in the experiments could arise from the dynamic and sequential recruitment of various populations of macrophages (Ly6(+)) versus Ly6(+)/CD11c(+). In vivo study of the dynamics of cell-to-cell interactions between cut axons and identified populations of macrophages is needed to clarify their specific roles following SCI. Taking advantage of multicolor fluorescent mice with dorsal root ganglia (DRG) axons labeled in blue (Thy1-CFP), myelomonocyte cells, including monocyte-derived macrophages, labeled in green (LysM-GFP), and dendritic cells, including microglia-derived macrophages, labeled in yellow (CD11c-YFP), our goal is to examine axonal-macrophage interactions following SCI using two-photon fluorescent microscopy of the living spinal cords of adult mammals for extended periods of time. We developed a novel method for implanting windows over the exposed spinal cords of adult transgenic mice for repeated two-photon fluorescent imaging. With this approach we can acquire images, with sub-cellular resolution, of the exposed spinal cords for up to 21 imaging sessions over the period of 205 days post-implantation. In uninjured animals we show that window implantation has virtually no effect on axon structure despite a minor and transient increase in LysM(+) cells in perivascular regions and a slightly more pronounced increase in CD11c(+) cells in the spinal white matter. Our results support the view that LysM(+) and CD11c(+) cells interact with cut DRG axon terminals. We found that as early as two days following a 'pin-prick' dorsal column SCI, LysM(+) cells are preferentially recruited to zones surrounding the lesion site and to a lesser extent within the lesion site. Close appositions (<0.3  $\mu$ m) between cut DRG axon terminals and LysM(+) cells were occasionally observed. Moreover, time-lapse experiments outlined a highly motile phenotype of some CD11c(+) cells that exhibit transient and dynamic interactions with cut DRG axon terminals. These experiments also show that the lesion epicenter was more densely packed with CD11c(+) cells than with Lys6(+) cells. Long term studies of the relative distributions and dynamics of cellular interactions should clarify whether all macrophages are detrimental for axons or whether LysM(+)/CD11c(-) cells can have beneficial effect.

## SUIVI DE L'INFILTRATION DES MONOCYTES PAR IRM HAUTE RÉOLUTION DANS UN MODÈLE MURIN D'ISCHÉMIE DE LA PATTE

KOLOSNAJ-TABI Jelena<sup>1,2</sup>, LUCIANI Nathalie<sup>2</sup>, VILAR José, SILVESTRE Jean-Sébastien, FITOUSSI Victor<sup>1</sup>, PIDIAL Laetitia, AUTRET Gwennhael<sup>1</sup>, WILHELM Claire<sup>2</sup>, GAZEAU Florence<sup>2</sup>, CLEMENT Olivier<sup>1</sup>

1) *Paris-Centre de recherche Cardiovasculaire (PARCC), INSERM-U970, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, France*

2) *Laboratoire Matières et Systèmes Complexes (MSC), CNRS-UMR7057, Université Paris Diderot, France*

Le marquage cellulaire aux nanoparticules d'oxyde de fer citratées permet le développement de nouvelles méthodes diagnostiques. Les cellules marquées aux nanoparticules anioniques super paramagnétiques pourraient ainsi être suivies dans leur site d'action *in vivo* par l'IRM en haute résolution. Dans le but de pouvoir évaluer l'effet des monocytes marqués sur la revascularisation de la patte ischémisée, nous avons développé une méthode de suivi de ces cellules dans un modèle murin d'ischémie de la patte.

Après avoir validé la méthode du marquage et visualisation sur des cellules de culture, nous avons marqué les monocytes isolés à partir de la moelle osseuse des tibias et fibulae de souris. L'internalisation de l'agent de contraste a été évaluée par la magnétophorèse cellulaire. Les monocytes murins marqués ont servi à la préparation des fantômes d'agarose ou été injectés en i.v. chez la souris. Leur distribution a été évaluée par IRM en haute résolution (Scanner Bruker 4,7 T équipé de cryosonde, séquence en écho de gradient, TR/TE = 20/5 ms, angle de bascule = 25° résolution de 50 x 50 x 50  $\mu\text{m}^3$ ).

Le marquage des monocytes murins avec les nanoparticules anioniques d'oxyde de fer est reproductible et quantifiable par magnétophorèse cellulaire. Une fois administrées chez la souris, les cellules migrent et peuvent être visualisées dans la patte ischémisée par l'IRM en haute résolution.

La méthode que nous avons développée permet de suivre les cellules marquées *in vivo* et ouvre la voie à une étude plus détaillée sur l'effet de ces cellules dans l'organisme vivant.

## HIGH-RESOLUTION MRI MONITORING OF MONOCYTES INFILTRATION IN EXPERIMENTAL MURINE HIND LIMB ISCHEMIA MODEL

KOLOSNAJ-TABI Jelena<sup>1,2</sup>, LUCIANI Nathalie<sup>2</sup>, VILAR José, SILVESTRE Jean-Sébastien, FITOUSSI Victor<sup>1</sup>, PIDIAL Laetitia, AUTRET Gwennhael<sup>1</sup>, WILHELM Claire<sup>2</sup>, GAZEAU Florence<sup>2</sup>, CLEMENT Olivier<sup>1</sup>

1) *Paris-Centre de recherche Cardiovasculaire (PARCC), INSERM-U970, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, France*

2) *Laboratoire Matières et Systèmes Complexes (MSC), CNRS-UMR7057, Université Paris Diderot, France*

Cell labeling with iron oxide citrate-coated anionic nanoparticles could be used for new diagnostic purposes. Such an approach allows the *in vivo* monitoring of mobilization of magnetically labeled cells to their site of action by high-resolution MRI. In order to evaluate the effect of magnetically labeled monocytes on post-ischemic neovascularization, we have aimed to develop a method of high-resolution MRI monitoring of single cell distribution of magnetically labeled monocytes in a murine hind limb ischemia model.

After the validation of high-resolution MRI visualization of labeled cultured cell lines, murine bone marrow derived monocytes were labeled with iron oxide citrate-coated anionic nanoparticles. The internalization of this contrast agent was evaluated by single cell magnetophoresis. Labeled murine monocytes were used to prepare agarose phantoms or administered to mice by intra-venous route and the distribution was evaluated by high-resolution MRI (cryoprobe-equipped Bruker 4.7 T Scanner; 3D gradient echo sequence, TR/TE = 20/5 ms, flip angle=25°, resolution: 50 x 50 x 50  $\mu\text{m}^3$ ).

The labeling of these murine monocytes with iron oxide citrate-coated anionic nanoparticles is reproducible and can be quantified by single cell magnetophoresis. Once such cells are administered to mice, they migrate to the ischemic paw and can be visualized by high resolution MRI.

The method we have developed allows *in vivo* tracking of magnetically labeled single cells and paves the way for a more detailed study of the fate of labeled cells.