



HAL
open science

Thermothérapies guidées par imagerie pour le traitement des cancers

Pauline Jeanjean

► **To cite this version:**

Pauline Jeanjean. Thermothérapies guidées par imagerie pour le traitement des cancers. Ingénierie biomédicale. Université de Bordeaux, 2019. Français. NNT : 2019BORD0396 . tel-03506232

HAL Id: tel-03506232

<https://theses.hal.science/tel-03506232>

Submitted on 2 Jan 2022

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ECOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : Bio-Imagerie

Par Pauline JEANJEAN

**Thermothérapies guidées par imagerie pour le traitement des
cancers**

Sous la direction du Dr. Franck COUILLAUD

Soutenue publiquement le 18 décembre 2019

Membres du jury

M. Nicolas LARMONIER, *PU, Université de Bordeaux*.....Président du jury
Mme. Claire BILLOTEY, *PU-PH, Université Jean Monnet*.....Rapporteur
Mme. Lucie SANCEY, *Chargée de Recherche, Université Joseph Fourier*..... Rapporteur
Mme. Muriel GOLZIO, *Directeur de Recherche, Université de Toulouse* Examineur
M. Bruno QUESSON, *Directeur de Recherche, Université de Bordeaux*..... Invité
M. Stéphane MORNET, *Directeur de Recherche, Université de Bordeaux*..... Invité
M. Franck COUILLAUD, *Directeur de Recherche, Université de Bordeaux*...Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je voudrais adresser mes sincères remerciements aux membres du jury de ma soutenance pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail. Je remercie le Pr. Claire BILLOTEY et le Dr. Lucie SANCEY pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Je remercie également le Pr. Nicolas LARMONIER et le Dr. Muriel GOLZIO pour avoir participé à l'examen de ce travail.

J'adresse mes plus sincères remerciements au Dr. Franck COUILLAUD, mon directeur de thèse, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe IMOTION (Imagerie Moléculaire et Thérapie Innovante en ONcologie) et d'avoir dirigé ma thèse durant ces trois années. Tout d'abord, je le remercie pour la confiance qu'il m'a accordée dès le début, son soutien et son encouragement durant toute ma thèse notamment lors des moments de doutes. Je le remercie pour la grande liberté qu'il m'a laissée tout en restant disponible en permanence. Merci pour tous les conseils, remarques, observations. Enfin, je le remercie également pour tout le temps consacré à me guider dans la rédaction de ce manuscrit ainsi que pour toutes les corrections apportées.

Cette thèse est le fruit de différentes collaborations me permettant d'interagir avec plusieurs laboratoires bordelais : l'Institut de Chimie de la Matière Condensée de Bordeaux (ICMCB), le Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques (LCPO) et l'Institut de Rythmologie et de modélisation Cardiaque (IHU Lyric). J'adresse donc mes remerciements aux Dr. Stéphane MORNET (ICMCB), Olivier SANDRE (LCPO) et Bruno QUESSON (IHU Lyric) qui ont contribué à la pluridisciplinarité de ce projet. Merci d'avoir partagé vos connaissances en chimie et physique, j'ai adoré découvrir de nouvelles facettes de la science en dehors de la biologie. Merci de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire lorsque j'ai eu besoin de venir faire des manip. Merci également pour les précieuses relectures scientifiques de ce manuscrit de thèse.

Je tiens également à remercier Coralie GENVOIS pour sa gentillesse, sa grande disponibilité pendant ces trois années. Merci pour tous les conseils, pour l'aide précieuse qu'elle m'a apportée au laboratoire durant mes manip et pour avoir répondu à toutes mes nombreuses questions. Et surtout, je la remercie pour toutes les corrections scientifiques (et grammaticales) qu'elle a apporté à ce manuscrit.

Je souhaite également remercier les autres personnes qui ont participé et m'ont aidée à mener à bien ce projet. Merci à Gauvin HEMERY pour les conseils précieux sur l'hyperthermie magnétique apportés en début de thèse qui m'ont bien servi durant ces trois années. Merci à Clément VECCO-GARDA pour les nanoparticules magnétiques parfaitement synthétisées et caractérisées. Merci pour ta disponibilité et ta réactivité à chaque fois que j'avais besoin d'aide sur le projet d'hyperthermie magnétique. Un grand merci à Dounia EL HAMRANI pour son investissement dans les manips de MRgHIFU, merci de m'avoir fait découvrir le monde de l'IRM, pour toutes tes explications et d'avoir répondu à toutes mes interrogations à ce sujet. Je tiens également à remercier Mathieu GUYOT d'avoir apporté son aide et son savoir-faire sur les ultrasons focalisés dans le projet MRgHIFU.

Un grand merci à toute l'équipe IMOTION pour leur chaleureux accueil au début de ma thèse. Merci à Isabel FERREIRO et à Charles HANDSCHIN pour leur gentillesse, pour avoir partagé leur savoir, savoir-faire et leurs expériences qui m'ont été d'une grande utilité pendant ma thèse et qui le seront encore après.

Je tiens également à remercier le Labex TRAIL de l'Université de Bordeaux pour avoir financé la totalité de ma thèse.

Je souhaite remercier mes amis qui, malgré l'incompréhension de la science, ont toujours été présents et m'ont toujours soutenue et encouragée bien avant le début de cette thèse. J'ai toujours et je pourrais toujours compter sur eux, peu importe la distance qui nous sépare. Une amitié inconditionnelle est si rare et précieuse. Alors je veux juste vous dire merci d'être là pour moi, merci pour ces bons moments passés ensemble et j'attends avec impatience les prochains.

Ma reconnaissance va évidemment envers mes parents et mes sœurs qui ont été d'un immense soutien. Pendant toutes ces années, ils n'ont cessé de m'épauler, de m'encourager et de croire en moi. Ils m'ont donné l'opportunité, les moyens et la capacité de réaliser cette expérience qu'est la thèse, sans avoir à me soucier des difficultés quotidiennes que l'on peut rencontrer. Je les remercie pour tout ce qu'ils m'ont transmis notamment cet esprit de curiosité et ce goût pour la science. C'est avec beaucoup de bonheur et d'émission que je leur présente mon travail de thèse puisque sans eux, je ne serais pas arrivée là où je suis aujourd'hui. Ce travail, je vous le dédie.

TABLE DES MATIERES

Introduction	18
1. Propriétés physiopathologiques et traitements des cancers	18
1.1. Propriétés physiopathologiques	18
1.1.1. Les cellules endothéliales	19
1.1.2. Les fibroblastes.....	21
1.1.3. Les cellules du système immunitaire	21
1.2. Les thérapies anticancéreuses	22
1.2.1. Les immunothérapies.....	23
1.2.2. Les thérapies ciblées	27
2. Les thermothérapies	33
2.1. La thérapie par le froid : la cryothérapie.....	34
2.1.1. Un peu d'histoire	34
2.1.2. Les différentes techniques de cryothérapie	34
2.1.3. Les mécanismes d'action de la cryothérapie	36
2.1.4. Les principaux paramètres de la cryothérapie.....	37
2.2. La thérapie par la chaleur : l'hyperthermie.....	38
2.2.1. Un peu d'histoire	38
2.2.2. Les différents types d'hyperthermie	39
2.2.3. La dose thermique	40
2.2.4. Les mécanismes de mort cellulaire induite par hyperthermie.....	41
2.2.5. Les différentes méthodes pour induire une hyperthermie locale	45
2.2.6. Applications de l'hyperthermie locale pour le traitement du cancer	58
3. Le voir pour le croire : l'apport de l'imagerie en thermothérapie	60
3.1. L'imagerie par résonance magnétique.....	62
3.2. L'imagerie de fluorescence.....	65
3.3. L'imagerie infrarouge	67
3.4. L'imagerie de bioluminescence	68
Objectif de la thèse	70
Matériels et méthodes	72
1. Synthèses des nanoparticules magnétiques.....	72

1.1.	IONPs-Tat et IONPs-PEG	72
1.1.1.	Réactifs et produits	72
1.1.2.	Synthèse des IONPs.....	73
1.1.3.	Modification du PEG-6000kD-SH avec l'ancre phosphonate	73
1.1.4.	Post modification de l'ELP ₄₀₋₆₀ -Tat avec l'ancre phosphonate	73
1.1.5.	Fonctionnalisation du fluorophore proche infrarouge Dy700 avec l'ancre phosphonate	74
1.1.6.	Greffage sur les IONPs du fluorophore proche infrarouge et des molécules préalablement fonctionnalisées avec l'ancre phosphonate.....	74
1.2.	SPC et SPC-protamine.....	76
1.2.1.	Réactifs et produits	76
1.2.2.	Synthèse des particules de maghémite.....	76
1.2.3.	Modification de surface des particules de maghémite avec de l'acide stéarique	77
1.2.4.	Formation des supraparticules magnétiques	77
1.2.5.	Formation d'une pré-couche de silice en milieu aqueux	78
1.2.6.	Formation d'une couche de silice bi-fluorescente	78
1.2.7.	Adsorption de la protamine à la surface des SPC	79
1.3.	NF-Q	80
1.3.1.	Réactifs et produits	80
1.3.2.	Synthèse des nanofleurs NF@SiO ₂ :DF	81
1.3.3.	Encapsulation des NF par une couche de silice bi-fluorescente	81
1.3.4.	Modifications de surface des NF@SiO ₂ :DF.....	83
1.4.	Caractérisation des NPMs.....	84
1.5.	Caractérisation des NPMs soumises au champ magnétique	84
2.	Systèmes biologiques	85
2.1.	Bactéries.....	85
2.2.	Lignées cellulaires	85
2.2.1.	Lignées natives	85
2.2.2.	Lignées génétiquement modifiées : U87-FRT et RM1-FRT	85
2.2.3.	Lignées cellulaires génétiquement modifiées	86
2.3.	Animaux.....	87
2.3.1.	Souris C57bl6 albinos.....	87
2.3.2.	Souris NSG.....	87

2.3.3.	Souris thermosensibles	87
3.	Méthodes de biologie moléculaire	88
3.1.	Tampons et milieux	88
3.2.	Digestion enzymatique	88
3.3.	Blunt du vecteur obtenu	88
3.4.	Séparation électrophorétique	89
3.5.	Extraction et purification des acides nucléiques	89
3.5.1.	Extraction et purification de l'ADN du gel d'agarose	89
3.5.2.	Extraction et purification de l'ADN plasmidique des bactéries	90
3.5.3.	Purification et précipitation de l'ADN	90
3.6.	Quantification des acides nucléiques par spectrofluorimétrie	91
3.7.	Quantification de l'ADN sur gel d'agarose	91
3.8.	Ligation de l'insert dans le vecteur	91
3.9.	Amplification par réaction de polymérisation en chaîne	92
3.10.	Amplification d'un vecteur par transformation bactérienne	93
4.	Méthodes de biologie cellulaire et biochimie	94
4.1.	Tampons, milieux et sérum	94
4.2.	Maintien des lignées	94
4.3.	Dénombrement cellulaire	95
4.4.	Transfection stable	95
4.4.1.	Système Flp-In	95
4.4.2.	Transfection aléatoire	96
4.5.	Traitement des cellules avec les nanoparticules magnétiques	97
4.6.	Evaluation de la cytotoxicité et de l'internalisation des NPMs	97
4.7.	Quantification du fer dans les cellules	98
4.8.	Mesure de l'activité luciférase sur lysat cellulaire	98
5.	Méthodes d'expérimentation animale	99
5.1.	Hébergements	99
5.2.	Anesthésie	99
5.3.	Préparation des animaux	100
5.4.	Génération de xénogreffes sous-cutanées	100
5.5.	Injection des NPMs	100
5.6.	Analgsie	100
5.7.	Prélèvement des tumeurs	101

6.	Méthodes d'imagerie.....	101
6.1.	Imagerie de bioluminescence et de fluorescence.....	101
6.1.1.	Appareillage.....	101
6.1.2.	Imagerie de bioluminescence.....	102
6.1.3.	Imagerie de fluorescence par réflexion.....	104
6.2.	Imagerie infrarouge.....	105
7.	Histologie	105
7.1.	Obtention des coupes de tissus et des cellules fixées	105
7.2.	Immunohistochimie	105
7.2.1.	Cellules vivantes.....	105
7.2.2.	Cellules et coupes de tumeurs fixées	106
7.3.	Coloration au bleu de Prusse	107
7.4.	Coloration HES.....	107
7.5.	Microscopie électronique à transmission sur cellules fixées	108
8.	Méthodes d'hyperthermie	108
8.1.	Chauffage au bain-marie.....	108
8.1.1.	Etudes <i>in vitro</i>	108
8.1.2.	Etudes <i>in vivo</i>	109
8.2.	Hyperthermie magnétique.....	109
8.2.1.	Champ magnétique alternatif à haute fréquence.....	109
8.2.2.	Induction d'une hyperthermie magnétique <i>in vitro</i>	111
8.2.3.	Induction d'une hyperthermie magnétique <i>in vivo</i>	111
8.3.	Ultrasons focalisés de haute intensité	112
8.3.1.	Appareillage.....	112
8.3.2.	Protocole d'hyperthermie par HIFU	112
8.4.	Ultrasons focalisés de haute intensité guidés par IRM.....	113
8.4.1.	Appareillage.....	113
8.4.2.	Placement de la souris dans le système MRgHIFU	114
8.4.3.	Protocole d'hyperthermie par MRgHIFU.....	116
9.	Statistiques	119

Chapitre 1 : Induction d'une hyperthermie magnétique <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	120
---	-----

Objectifs	121
Résultats et discussion.....	122
1. Hyperthermie magnétique induite avec des nanoparticules d'oxyde de fer décorées avec le peptide Tat	122
1.1. Caractéristiques des IONPs-Tat et IONPs-PEG	122
1.2. Internalisation dans les cellules et toxicité des IONPs-Tat et IONPs-PEG	123
1.3. Biodistribution des IONPs-Tat et IONPs-PEG.....	128
1.4. Induction d'une hyperthermie magnétique <i>in vivo</i>	129
2. Hyperthermie magnétique induite par des nanoparticules d'oxyde de fer décorées avec de la protamine	134
2.1. Caractérisation des SPC-protamine	134
2.2. Toxicité et internalisation des SPC-protamine	137
2.3. Localisation intracellulaire des SPC et SPC-protamine	139
2.4. Induction d'une hyperthermie magnétique <i>in vitro</i>	140
3. Nanofleurs décorées avec des groupements ammoniums quaternaires	142
3.1. Caractérisation des NF-Q.....	142
3.1.1. Synthèse des NF	142
3.1.2. Encapsulation de NF dans une couche de silice bi-fluorescente.....	143
3.1.3. Modifications de surface des NF@SiO ₂ :DF.....	144
3.1.4. Application du champ magnétique sur les NF-Q.....	147
3.2. Toxicité et internalisation des NF-Q.....	148
3.3. Localisation intracellulaire des NF-Q.....	151
3.4. Induction d'une hyperthermie magnétique intracellulaire <i>in vitro</i>	153
3.5. Induction d'une hyperthermie magnétique intracellulaire <i>in vivo</i>	154
3.6. Hyperthermie magnétique locale pour une thermoablation tumorale	158
3.7. Localisation intratumorale des NF-Q	162
3.8. Corrélation entre la dose de NF-Q injectée et l'efficacité de l'hyperthermie magnétique	163
3.9. Hyperthermie magnétique locale induit une thermo-modulation du microenvironnement tumoral	166
Discussion générale.....	172
Chapitre 2 : Induction d'une hyperthermie <i>in vivo</i> par MRgHIFU	177

Objectifs	178
Résultats et discussion.....	179
1. HIFU.....	179
1.1. Protocole d’hyperthermie par HIFU	179
1.2. Induction d’une hyperthermie par HIFU <i>in vivo</i>	179
2. MRgHIFU	182
2.1. Mise au point et validation du protocole	182
2.2. Hyperthermie modérée des tumeurs par MRgHIFU.....	183
2.4.1. Caractérisation <i>in vitro</i> de la réponse de la lignée cellulaire au choc thermique	184
2.4.2. Induction d’une hyperthermie modérée <i>in vivo</i>	185
2.4.3. Dommages cellulaires induits par MRgHIFU lors d’une hyperthermie modérée.....	189
2.3. Thermoablation tumorale par MRgHIFU	191
2.5.1. Induction d’une thermoablation <i>in vivo</i>	192
2.5.2. Dommages cellulaires induits par MRgHIFU lors d’une thermoablation	195
2.4. Induction d’une thermo-modulation du microenvironnement tumoral combinée à une thermoablation tumorale par MRgHIFU.....	197
Discussion générale.....	204
Conclusion générale	208
Bibliographie.....	211

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Différents types cellulaires composant le μ E	19
Figure 2 : Schéma représentant l'effet EPR dans les tumeurs	20
Figure 3 : Mécanisme d'action des anti-PD-1, anti PD-L1 et anti-CTLA4	24
Figure 4 : Processus de fabrication des cellules CAR-T	26
Figure 5 : Schémas des quatre types d'anticorps monoclonaux	29
Figure 6 : Mécanismes de mort cellulaire induite par des anticorps monoclonaux	31
Figure 7 : Système de troisième génération pour le traitement du cancer de la prostate par cryothérapie	35
Figure 8 : Atteintes cellulaires induites par cryothérapie	37
Figure 9 : Effets biologiques induits par hyperthermie en fonction de la dose thermique	41
Figure 10 : Effets biologiques d'une hyperthermie modérée et locale dans une tumeur	42
Figure 11 : Mécanisme d'activation de la synthèse des Hsp	44
Figure 12 : Schémas de transducteurs à ultrasons focalisés	46
Figure 13 : Principe de la cavitation	48
Figure 14 : Schéma du ciblage passif et actif des NPMs dans la tumeur.....	51
Figure 15 : Cycle d'hystérèse décrit lors de l'application d'un champ magnétique alternatif ..	53
Figure 16 : Effet des micro-ondes sur les molécules d'eau	55
Figure 17 : Caractéristiques des lasers médicaux	57
Figure 18 : Modalités d'imagerie utilisées en oncologie	61
Figure 19 : Représentation de l'aimantation des noyaux après l'application du champ magnétique B_1	63
Figure 20 : Images de phase d'une IRM de température	65
Figure 21 : Spectre d'atténuation de la lumière transmise à travers les tissus de la souris le long de l'axe dorso-ventral	66
Figure 22 : Configuration d'un système d'imagerie de fluorescence par réflexion	67
Figure 23 : Configuration d'un système d'imagerie de bioluminescence	69
Figure 24 : Schéma des nanoparticules IONPs-Tat	75
Figure 25 : Schéma des nanoparticules SCP-protamine	79
Figure 26 : Schéma des nanoparticules NF-Q	84
Figure 27 : Système d'imagerie Lumina LT	102
Figure 28 : Réaction enzymatique de la Luciférase firefly	102
Figure 29 : Réaction enzymatique de la Nanoluciférase	103

Figure 30 : Spectres d'excitation et d'émission des fluorophores	104
Figure 31 : Dispositif de chauffage au bain marie des pattes arrières de souris	109
Figure 32 : Système d'application du champ magnétique par le DM3	110
Figure 33 : Caractérisation du champ magnétique alternatif à haute fréquence	111
Figure 34 : Système <i>in vivo</i> pour l'application d'ultrasons focalisés de haute intensité	112
Figure 35 : Positionnement de la souris sur le système HIFU	113
Figure 36 : Rétrocontrôle en temps réel de la température par IRM	114
Figure 37 : Positionnement de la souris dans le système d'ultrasons focalisés de haute intensité guidés par IRM	115
Figure 38 : Positionnement du point focal	116
Figure 39 : Coupes coronales utilisées pour effectuer le rétrocontrôle de la température	117
Figure 40 : Nanoparticules IONPs-Tat.....	123
Figure 41 : Localisation intracellulaire des IONPs-Tat	124
Figure 42 : Images de microscopie confocale de cellules contenant des IONPs-Tat à différentes étapes du cycle cellulaire	125
Figure 43 : Effet du champ magnétique sur des cellules contenant des IONPs-Tat ou des IONPs-PEG par imagerie confocale	126
Figure 44 : Effet du champ magnétique sur des cellules contenant des IONPs-Tat ou des IONPs-PEG par MET	127
Figure 45 : Effet de l'hyperthermie magnétique <i>in vitro</i> sur la viabilité des cellules U87 contenant des IONPs-PEG ou IONPs-Tat	128
Figure 46 : Biodistribution des IONPs-Tat et des IONPs-PEG	129
Figure 47 : Conditions expérimentales	130
Figure 48 : Suivi de la température tumorale lors de l'application du champ magnétique ...	131
Figure 49 : Induction d'une hyperthermie magnétique <i>in vivo</i> en utilisant les IONPs-Tat ou IONPs-PEG	132
Figure 50 : Nanoparticules SCP	135
Figure 51 : Absorption de la protamine à la surface des SCP	136
Figure 52 : Application du champ magnétique sur les SCP-protamine	136
Figure 53 : Viabilité des cellules RM1 et des cellules U87 contenant des SCP ou des SCP-protamine	137
Figure 54 : Internalisation des SCP et des SCP-protamine dans les cellules RM1 et les cellules U87	138
Figure 55 : Comparaison de la quantité de SCP et de SCP-protamine internalisées dans les cellules U87 et les cellules RM1	139
Figure 56 : Localisation intracellulaire des SCP et des SCP-protamine dans les cellules U87 par microscopie confocale	140
Figure 57 : Induction d'une hyperthermie magnétique <i>in vitro</i> avec des SCP-protamine	141

Figure 58 : Caractérisation des NF et des NF@SiO ₂ :DF	144
Figure 59 : Mesure du potentiel zêta en fonction du pH	145
Figure 60 : Mesure du potentiel zêta et de la transmittance en fonction du pH	146
Figure 61 : Mesure de la transmittance en fonction de la concentration en NaCl	147
Figure 62 : Evolution de la température lors de l'application du champ magnétique sur les NF-Q	147
Figure 63 : Cytotoxicité et internalisation des NF-Q dans les cellules U87 et RM1	149
Figure 64 : Intérêt de la modification de surface des nanofleurs avec les groupements d'ammoniums quaternaires	150
Figure 65 : Localisation intracellulaire des NF-Q dans les cellules U87	152
Figure 66 : Effet d'une hyperthermie magnétique intracellulaire sur la viabilité des cellules U87 contenant des NF-Q <i>in vitro</i>	153
Figure 67 : Effet de l'hyperthermie magnétique intracellulaire sur l'activation du promoteur Hsp70 dans les cellules U87 contenant des NF-Q <i>in vitro</i>	154
Figure 68 : Conditions expérimentales	155
Figure 69 : Suivi de la température des tumeurs lors de l'application du champ magnétique..	156
Figure 70 : Application du champ magnétique <i>in vivo</i> sur des cellules traitées <i>in vitro</i> avec des NF-Q	157
Figure 71 : Conditions expérimentales	159
Figure 72 : Suivi de la température tumorale lors de l'application du champ magnétique ...	160
Figure 73 : Thermoablation totale ou partielle par hyperthermie magnétique <i>in vivo</i>	161
Figure 74 : Localisation des NF-Q dans la tumeur	163
Figure 75 : Conditions expérimentales	164
Figure 76 : Suivi de la température tumorale lors de l'application du champ magnétique ...	165
Figure 77 : Hyperthermie magnétique avec 0,6 mg d'oxyde de fer dans la tumeur	166
Figure 78 : Conditions expérimentales.....	167
Figure 79 : Thermo-modulation du μ E par hyperthermie magnétique <i>in vivo</i>	169
Figure 80 : Différentes localisations de l'activation du promoteur Hsp70 <i>in vivo</i> suite à un chauffage par HIFU	181
Figure 81 : Application des MRgHIFU sur la peau de souris thermosensibles	183
Figure 82 : Détermination de la dose thermique pour induire l'activation du promoteur Hsp70 dans les cellules RM1-Hsp70-LucF <i>in vitro</i>	184
Figure 83 : Suivi de la température tumorale par IRM lors d'une hyperthermie modérée induite par HIFU	186
Figure 84 : Induction d'une hyperthermie modérée par MRgHIFU <i>in vivo</i>	188
Figure 85 : Induction d'une hyperthermie modérée au bain marie <i>in vivo</i>	189
Figure 86 : Effet de l'hyperthermie modérée sur les tumeurs	191

Figure 87 : Suivi de la température tumorale par IRM lors de la thermoablation induite par HIFU	193
Figure 88 : Effet d'un traitement d'hyperthermie induit par MRgHIFU à une dose thermique inférieure à 1024 CEM ₄₃	194
Figure 89 : Effet d'un traitement d'hyperthermie induit par MRgHIFU avec une dose thermique supérieure à 1024 CEM ₄₃	195
Figure 90 : Effet du traitement d'hyperthermie sur la tumeur	196
Figure 91 : Suivi de la température tumorale lors de l'étude des effets induits par MRgHIFU sur le μ E	198
Figure 92 : Effet d'une hyperthermie induite par MRgHIFU à une dose thermique inférieure à 1024 CEM ₄₃ sur la tumeur et le μ E	200
Figure 93 : Effet d'une hyperthermie induite par les MRgHIFU sur le μ E suite à une thermoablation tumorale totale <i>in vivo</i>	201
Figure 94 : Effet d'une hyperthermie induite par MRgHIFU sur le μ E lors d'une thermoablation tumorale partielle <i>in vivo</i>	202

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Nomenclature internationale des quatre types d'anticorps monoclonaux	30
Tableau 2 : Modalités d'imageries principalement utilisées en clinique et lors des études précliniques	62
Tableau 3 : Les luciférases	68
Tableau 4 : Réactifs et produits nécessaires à la synthèse des IONPs-Tat et IONPs-PEG.....	72
Tableau 5 : Réactifs et produits nécessaires à la synthèse des SCP et SCP-protamine.....	76
Tableau 6 : Réactifs et produits nécessaires à la synthèse des NF-Q	80
Tableau 7 : Lignées cellulaires génétiquement modifiées et caractérisées <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> ...	86
Tableau 8 : Nom et composition des tampons et milieux utilisés en biologie moléculaire	88
Tableau 9 : Séquences des amorces d'oligonucléotides utilisées en PCR	92
Tableau 10 : Nom et composition des milieux de culture, tampons et sérum utilisés en culture cellulaire	94
Tableau 11 : Fréquences et amplitudes du champ magnétique disponibles sur le DM3	110
Tableau 12 : Paramètres des séquences IRM	118
Tableau 13 : Boucle de rétrocontrôle de la température lors de l'induction d'une hyperthermie modérée par MRgHIFU	118
Tableau 14 : Boucle de rétrocontrôle de la température lors de l'induction d'une thermoablation par MRgHIFU	119
Tableau 15 : Tableau récapitulatif des données obtenues lors des études <i>in vivo</i> menées sur les NF-Q	171
Tableau 16 : Tableau récapitulatif des données obtenues lors de l'étude des effets induits par MRgHIFU sur le μE	199

LISTE DES ABREVIATIONS

μE : microenvironnement tumoral	Effet EPR : enhanced permeation and retention
ADN : acide désoxyribonucléique	ELP : elastin-like polypeptide
ADNc : ADN complémentaire	eq : équivalent
AEP : acide 2-aminoéthylphosphonique	Er:YAG : Erbium-doped:YAG
AMF : alternating magnetic field	f : fréquence
AMP : adénosine monophosphate	FDA : food and drug administration
ATP : adénosine triphosphate	FLASH (séquence) : fast low angle shot
BLI : bioluminescent imaging	Flp : flippase
BSA : bovine serum albumin	FMT : fluorescence-mediated tomography
CAFs : cancer-associated fibroblasts	FRI : fluorescent reflectance imaging
CAIX : anhydrase carbonique IX	FRT : flippase recognition target
CAR : chimeric antigen receptor	g : force centrifuge
CAR-T : CAR T cell	GFP : green fluorescent protein
CCD : charge coupled device	GMBS : 4-maléimidobutyrate de N-succinimidyle
CD : cluster of differentiation	H : amplitude
CEEA50 : comité d'éthique en expérimentation animale n°50	HAMA : humain anti-mouse antibody
Cellules NK : cellules natural killer	Hb : hémoglobine
CEM43°C : cumulative equivalent minutes at 43 °C	Hb ox : oxyhémoglobine
Cm : concentration massique	Hc : champ coercitif
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité	HER2 : human epidermal growth factor receptor-2
CMV : cytomegalovirus	HES : hématoxyline, éosine, safran
CPP : cell-penetrating peptide	HIFU : high intensity focused ultrasound
CT : computerized tomography	Ho:YAG : holmium-doped:YAG
CTLA4 : cytotoxic T-lymphocytes-associated antigen 4	Hse : Heat shock promoter element
Cy 7.5 : cyanine 7.5-maléimide	Hsf : heat shock factor
Cy 3 : cyanine 3-maléimide	Hsp : heat shock protein
DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole	iCAR : CAR inhibiteur
DEG : diéthylène glycol	IFN-γ : interféron-γ
DLS : dynamic light scattering	IgG : immunoglobuline G
DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium	IGT : image guided therapy
DMSO : diméthylsulfoxyde	IL : interleukine
DO : densité optique	Inca : Institut national du cancer
DPSS : diode-pumped solid-state laser	IONPs : iron oxyde nanoparticles
DT : dose thermique	IONPs-Tat : IONPs décorées avec l'ELP ₄₀₋₆₀ couplé au peptide TAT
Dyn : dynamique	IONPs-PEG : IONPs décorées avec du PEG
EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique	irAEs : immune-related adverse events
EDPS : N-[3-(triméthoxysilyl)propyl]éthylènediamine	Ires : internal ribosome entry site
	IRM : imagerie par résonance magnétique
	ITK : inhibiteur de tyrosines kinases
	KTP : potassium-titanyl-phosphate

Lamp-1 : lysosomal-associated membrane protein
LAS : Luciferase assay substrate
LB : Luria Bertani
LITT : laser-induced interstitial thermotherapy
LPS: lipopolysaccharide
LucF: Luciferase firefly
Mab : monoclonal antibody
MEM NE AA : minimum essential medium non-essential amino acids
MET : microscopie électronique à transmission
miRNA : micro-ARN
mol : mole
MPI : magnetic particle imaging
MPS : (3-mercaptopropyl)triéthoxysilane
Mr : aimantation rémanente
MRgHIFU : MRI guided high intensity focused ultrasounds
MRI : magnetic resonance imaging
Ms : aimantation à saturation
Nd:YAG : Neodymium-doped:YAG
NF: nanofleur
NF@SiO₂:DF : nanofleur recouverte d'une couche de silice bi-fluorescente
NF@SiO₂:DF-NH₃⁺: nanofleur fluorescente décorées avec l'EDPS
NF-Q : nanofleurs fluorescentes décorées avec des groupements d'ammonium quaternaires
NIR : near infrared
Nluc: Nanoluciférase
NMDEA : N-méthyl-diéthanolamine
NPM : nanoparticule magnétique
ns : non significatif
p : photon
PBS : phosphate-buffered saline
PCR: polymerase chain reaction
PD1 : programmed cell death 1
PD-L: programmed cell death ligand
PEG : polyéthylène glycol
PET: positron-emission tomography
PFA : paraformaldéhyde
PPi : diphosphate
PRF : proton resonance frequency

PSA : pénicilline, streptomycine, amphotéricine
PSM : poste de sécurité microbiologique
qRT-PCR : quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
R.U. : Royaume-Uni
RARE (séquence) : rapid acquisition with relaxation enhancement
RLU : relative light unit
RMN : résonance magnétique nucléaire
ROI: region of interest
ROS : reactive oxygen species
Rpm : rotations par minute
RTK : récepteur à activité tyrosine kinase
SAR : specific absorption rate
scFv : single-chain variable fragment
SD : standard deviation
SDS : sodium dodécylsulfate
Sérum ϕ : sérum physiologique
SOC : super optimal broth
SPECT : single photon emission computerized tomography
SPC : supraparticules magnétiques
SPC-protamine : supraparticules magnétique décorées avec de la protamine
sr : stéradian
SVF : sérum de veau fœtal
TAE : Tris-acetate EDTA
TAM: tumor-associated macrophages
Tat : transactivator of transcription
TDM : tomodensitométrie X
TE : temps d'écho
TEN : tris EDTA NaCl
TEOS : orthosilicate de tétraéthyle
TEP : tomographie par émission de positons
TEMP : tomographie d'émission monophotonique
Tm:YAG : Thulium-doped:YAG
TR : temps de répétition
TRUS : transrectal ultrasounds
US : ultrasounds ou ultrasons
USA : United States of America
VIH : virus d'immunodéficience humaine
YAG : Yttrium Aluminum Garnet

PREAMBULE

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit ont été financés par le Labex TRAIL (Translational Research and Advanced Imaging Laboratory).

Ce travail de thèse a débuté en octobre 2016 au sein du laboratoire IMOTION (Imagerie Moléculaire et Thérapie Innovante en Oncologie) sous la direction du Dr. Franck COUILLAUD. Il a pour objectif de faire la preuve de concept, par imagerie *in vivo*, d'une thermoablation tumorale combinée avec une hyperthermie modérée du microenvironnement tumoral. L'hyperthermie modérée pourra ensuite être combinée avec d'autres thérapies ou elle pourra conduire à la libération contrôlée de médicament à partir de nanoparticules thermosensibles ou à la thermo-activation d'un gène afin d'atteindre les cellules cancéreuses périphériques qui auraient résisté à la thermoablation. La thermoablation et l'hyperthermie modérée sont induites par deux techniques de thérapie : l'hyperthermie magnétique et les ultrasons focalisés de haute intensité guidés par IRM. Ce sujet de thèse s'inscrit dans un contexte de constante amélioration des thérapies anticancéreuses.

INTRODUCTION

1. Propriétés physiopathologiques et traitements des cancers

Le cancer représente la deuxième cause de mortalité dans le monde. Selon l'institut national du cancer (Inca), 382 000 nouveaux cas ont été diagnostiqués et 157 000 décès par cancer ont été rapportés en 2018 en France métropolitaine. Toutefois, le taux de survie à 5 ans a augmenté entre 1989 et 2010. L'amélioration des systèmes de diagnostic permet de détecter plus précocement la maladie et facilite la prise en charge des patients. De plus, la progression des thérapies anti-tumorales conventionnelles (chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie) et la découverte de nouvelles thérapies innovantes, telles que l'immunothérapie et les traitements ciblés, ont également contribué à l'augmentation du taux de survie.

1.1. Propriétés physiopathologiques

Le cancer est une maladie complexe qui résulte de l'apparition de cellules anormales suite à plusieurs mutations génétiques. Les cellules cancéreuses sont dotées de propriétés spécifiques comme l'instabilité génétique, la prolifération anormale, la résistance à l'apoptose, l'induction d'une angiogenèse ou encore l'invasion de l'organisme par voie lymphatique et sanguine conduisant à la formation de métastases (Hanahan & Weinberg, 2011). Dans une même tumeur, on retrouve une forte hétérogénéité de cellules cancéreuses avec plusieurs niveaux de différenciation : des cellules cancéreuses et des cellules souches cancéreuses. Grâce à leur capacité d'autorenouvellement et à leur aptitude à se maintenir dans un état quiescent ou se différencier en de nombreuses lignées, les cellules souches cancéreuses sont souvent associées à la résistance aux traitements ainsi qu'à la formation de métastases (Dawood *et al.*, 2014; Nassar & Blanpain, 2016).

Les tumeurs cancéreuses ne contiennent pas uniquement des cellules tumorales. Elles sont également constituées de nombreux types cellulaires non cancéreux (fibroblastes, cellules endothéliales et cellules du système immunitaire) interagissant ensemble et de composants non cellulaires (protéines, protéases, cytokines) (Hanahan & Weinberg, 2011; Cirri & Chiarugi, 2012; Hirata & Sahai, 2017). Ensemble, ces cellules non cancéreuses et ces composants non

cellulaires forment le microenvironnement tumoral (μ E) ou stroma tumoral (Figure 1) et jouent un rôle clé dans les différentes étapes de l'évolution d'une tumeur.

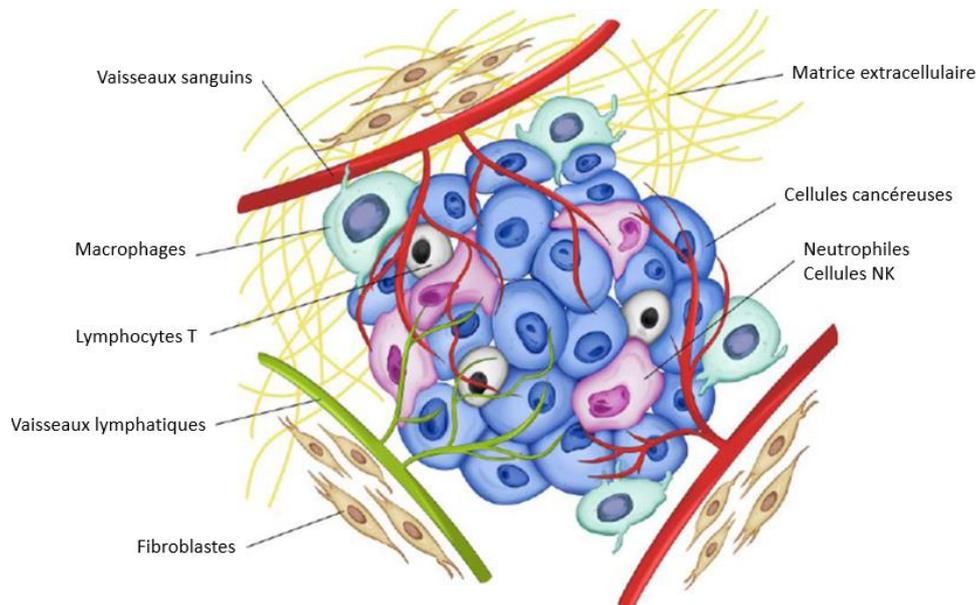


Figure 1 : Différents types cellulaires composant le μ E. Le μ E contient des cellules du système immunitaire (macrophages, lymphocytes T et B, cellules dendritiques, cellules natural killer (NK)), des fibroblastes, des cellules endothéliales (constituant les vaisseaux sanguins et vaisseaux lymphatiques) et une matrice extracellulaire. Selon (Norton *et al.*, 2019)

1.1.1. Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales tapissent la paroi interne des vaisseaux sanguins. Lors de la formation d'une tumeur, elles sont recrutées pour former de nouveaux vaisseaux permettant l'apport de nutriments et d'oxygène essentiels aux cellules tumorales, tout en éliminant les déchets métaboliques et le dioxyde de carbone. Ce phénomène est appelé angiogenèse (Hanahan & Weinberg, 2011; Hida *et al.*, 2018). Le développement de la vascularisation tumorale est très rapide conduisant à la formation anarchique des vaisseaux sanguins caractérisés par des niveaux anormaux de prolifération et d'apoptose des cellules endothéliales, un endothélium avec des pores élargis, un flux sanguin incohérent et des microhémorragies. De cette manière, le passage d'un médicament de la circulation sanguine vers le μ E est facilité (Hanahan & Weinberg, 2011; Bertrand *et al.*, 2014).

Les cellules endothéliales sont également recrutées lors de la formation des vaisseaux lymphatiques, on parle de lymphangiogenèse. Dans les tissus sains, les fluides extracellulaires

sont constamment drainés vers les vaisseaux lymphatiques. Ce phénomène permet un renouvellement continu du fluide interstitiel et une élimination des solutés extravasés. Dans les tissus tumoraux, le drainage lymphatique est défectueux conduisant à un faible renouvellement du fluide interstitiel (Hanahan & Weinberg, 2011; Bertrand *et al.*, 2014).

Le développement chaotique des vaisseaux sanguins combiné à l'absence de drainage par les vaisseaux lymphatiques augmentent l'accumulation de composés dans la tumeur. Cet effet est appelé effet EPR (enhanced permeability and retention) et il a été découvert par Matsumura et Maeda (Figure 2). Ils ont montré que les protéines, dont le poids moléculaire est supérieur à 30 kDa, sont préférentiellement distribuées dans la tumeur et y restent. L'effet EPR a largement été étudié sur des modèles murins avec des xénogreffes orthotopiques et sous-cutanées. Cependant, il fait encore l'objet de nombreuses études chez l'homme où il pourrait être moins important que chez les rongeurs. Chez l'homme, l'effet EPR est très hétérogène et dépend de diverses caractéristiques en plus de celles précédemment décrites (type, taille et localisation de la tumeur ; âge et sexe du patient). Il a été observé seulement dans quelques cancers humains tels que l'adénocarcinome pancréatique, le cancer colorectal, le cancer du sein, le cancer de l'estomac et le cancer ovarien (Prabhakar *et al.*, 2013; Ngoune *et al.*, 2016; Natfji *et al.*, 2017).

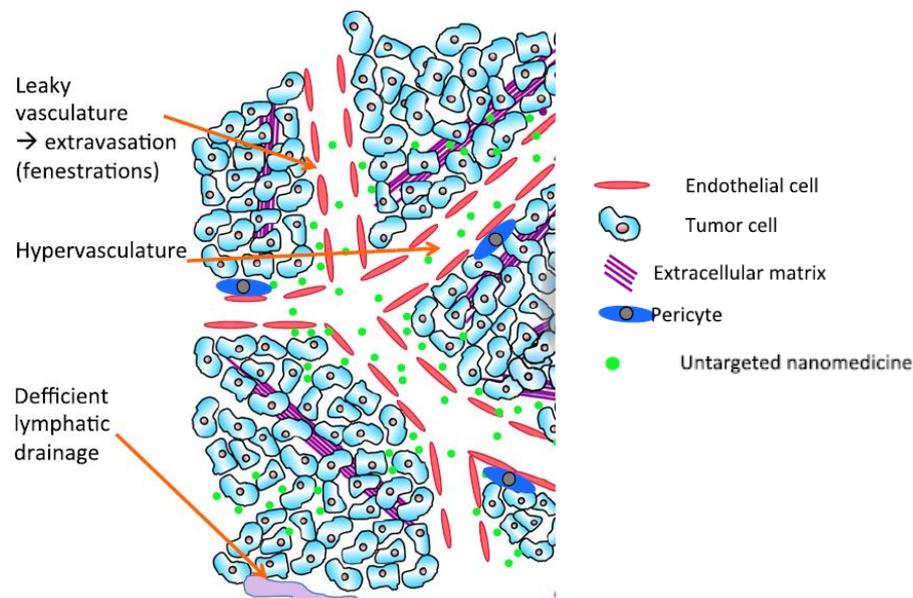


Figure 2 : Schéma représentant l'effet EPR dans les tumeurs. L'effet EPR résulte de deux phénomènes bien distincts : l'extravasation des molécules des vaisseaux sanguins et l'absence de drainage lymphatique (Danhier, 2016).

1.1.2. Les fibroblastes

De manière physiologique, les fibroblastes participent à la cicatrisation des tissus : on parle de fibroblastes activés. Les CAFs (cancer-associated fibroblasts) sont des fibroblastes activés présents en abondance dans le μ E (Xing *et al.*, 2010; Cirri & Chiarugi, 2012). La population de CAFs est très hétérogène due à leurs diverses origines (fibroblastes normaux, cellules épithéliales, cellules endothéliales). Ils sont génétiquement stables en comparaison avec les cellules cancéreuses. Le rôle principal des CAFs est de créer et de structurer la matrice extracellulaire grâce, notamment, à la sécrétion de facteurs solubles comme le collagène, la fibronectine et l'acide hyaluronique. La structure de la matrice extracellulaire favorise ainsi la survie, la croissance et l'invasion tumorale tout en limitant la délivrance des agents cytotoxiques au sein de la tumeur (Cirri & Chiarugi, 2012). Les CAFs sécrètent également des cytokines et des chimiokines permettant le recrutement des cellules du système immunitaire à la tumeur (macrophages, neutrophiles et lymphocytes) (Xing *et al.*, 2010; Junttila & de Sauvage, 2013).

1.1.3. Les cellules du système immunitaire

Le système immunitaire prévient le développement des tumeurs de trois manières : (1) il protège l'hôte contre les virus pouvant conduire à un cancer (papillomavirus et cancer du col de l'utérus ou l'hépatite B et C et le cancer du foie) ; (2) il est capable d'éliminer rapidement les pathogènes afin de limiter la mise en place d'un environnement inflammatoire conduisant à la formation d'un cancer et (3) il peut identifier et éliminer les cellules tumorales grâce à l'expression d'antigènes tumoraux ou de molécules induisant un stress cellulaire (Lakshmi Narendra *et al.*, 2013). Malgré cette immunosurveillance, pourquoi développe-t-on un cancer ?

Les cellules du système immunitaire sont capables de protéger l'hôte contre le développement d'une tumeur tout en sélectionnant les cellules cancéreuses avec une immunogénicité faible: on parle alors d'« immunoediting ». Ce phénomène est divisé en trois phases : l'élimination, l'équilibre et l'échappement. La phase d'élimination consiste à détruire les cellules cancéreuses. Lors de cette phase, l'ensemble ou une partie des cellules tumorales est détruite. La phase d'équilibre commence lorsqu'une partie des cellules tumorales survie à la phase d'élimination. Les cellules du système immunitaire et les cytokines qu'elles sécrètent exercent une forte et continue pression de sélection sur les cellules cancéreuses, pression qui limite la croissance tumorale mais n'est pas suffisante pour détruire l'ensemble des cellules.

Les cellules cancéreuses mères sont détruites mais les cellules cancéreuses filles développent des systèmes de résistance contre le système immunitaire. La phase d'équilibre se conclue par une nouvelle population de cellules cancéreuses avec une immunogénicité faible. La phase d'échappement consiste ensuite à la progression tumorale (Lakshmi Narendra *et al.*, 2013).

Le μ E contient des cellules du système immunitaire inné et acquis telles que les cellules NK, les cellules dendritiques, les lymphocytes et les macrophages. Elles ont des propriétés pro ou anti-tumorales et interviennent dans les différentes étapes du développement d'une tumeur (Grivennikov *et al.*, 2010; Lakshmi Narendra *et al.*, 2013). Par exemple, les macrophages représentent le type cellulaire du système immunitaire inné majoritairement retrouvé dans les tumeurs. Selon certains auteurs, il existerait deux types de macrophages : les macrophages de type M1, activés par des toxines bactériennes (LPS), l'interféron- γ (IFN- γ) ou des cytokines, et les macrophages de type M2, activés par différentes interleukines (IL-4, IL-10 et/ou IL-13). Les macrophages M1 sont considérés comme des cellules effectrices puissantes contre les micro-organismes ou les cellules cancéreuses alors que les macrophages M2 ont des propriétés pro-tumorales (remodelage tissulaire, angiogenèse, régulation de la réponse immunitaire). Les macrophages retrouvés dans les tumeurs solides, appelés TAMs (tumor-associated macrophages), sont principalement de type M2 (Grivennikov *et al.*, 2010; Fukuda *et al.*, 2012).

Les cellules du μ E jouent donc un rôle essentiel dans la croissance, la progression et l'invasion tumorale et, contrairement aux cellules cancéreuses, elles sont génétiquement stables. Elles représentent donc une cible intéressante dans les thérapies anticancéreuses. Cependant, la composition du μ E peut influencer la réponse aux traitements. Par exemple, l'efficacité de la radiothérapie est fortement améliorée lorsque le niveau en oxygène dans la tumeur est élevé et la diffusion des agents cytotoxiques dans la tumeur est réduit dans les tumeurs pauvrement vascularisées (Junttila & de Sauvage, 2013; Hirata & Sahai, 2017).

1.2. Les thérapies anticancéreuses

L'objectif des thérapies anticancéreuses conventionnelles est de détruire physiquement les cellules tumorales grâce à différentes méthodes telles que la chirurgie, la radiothérapie ou la chimiothérapie. La chirurgie vise l'exérèse de type R0 qui consiste à retirer la totalité de la tumeur avec une marge de tissus sains pour s'assurer de la résection totale. Les chimiothérapies

et les radiothérapies ciblent les cellules en division. Les cellules cancéreuses ne sont pas les seules cellules de l'organisme à avoir une croissance rapide, ce qui conduit à des effets secondaires importants. Ces trois approches donnent néanmoins de très bons résultats et restent, actuellement, les plus utilisées dans le traitement des cancers. Toutefois, des échappements aux traitements et des récives sont souvent observés. Pour surmonter ces problèmes, de nouvelles thérapies plus spécifiques des cellules cancéreuses ou des cellules du μ E ont été développées comme notamment les immunothérapies ou des thérapies ciblées.

1.2.1. Les immunothérapies

L'objectif principal des immunothérapies est de réactiver les lymphocytes T du système immunitaire pour rétablir leur capacité à détruire les cellules cancéreuses. Elles ciblent donc les cellules du μ E et non les cellules cancéreuses. Il existe deux catégories d'immunothérapie : les inhibiteurs de points de contrôle immunitaire et les lymphocytes T modifiés ou CAR-T.

Les inhibiteurs de points de contrôle immunitaire

Les points de contrôle immunitaire sont des récepteurs présents à la surface des lymphocytes T. De manière physiologique, ils inhibent l'activation des lymphocytes T afin de limiter la réponse immunitaire et prévenir le développement de maladies auto-immunes.

Les cellules tumorales sont capables d'utiliser ses points de contrôle immunitaire pour inhiber l'activation des lymphocytes T et se défendre contre le système immunitaire. Des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire ont alors été développés pour lever l'inactivation des lymphocytes T. Ce sont des anticorps spécifiques des récepteurs de points de contrôle et/ou de leur ligand. La liaison de l'anticorps sur le récepteur ou le ligand empêche l'inhibition de l'activité des lymphocytes T. De cette manière, les lymphocytes T sont encore capables de reconnaître les cellules cancéreuses et de les éliminer. Les deux points de contrôle immunitaire les plus étudiés sont le récepteur CTLA4 et le récepteur PD1 (Figure 3) (Pardoll, 2012; Postow *et al.*, 2015).

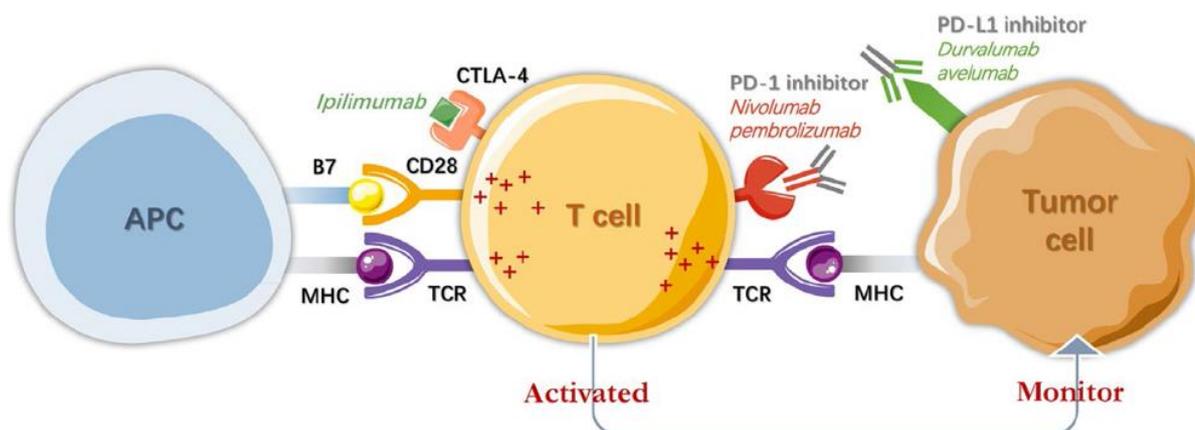


Figure 3 : Mécanisme d'action des anti-PD-1, anti-PD-L1 et anti-CTLA4. L'utilisation d'anticorps anti-PD-1, anti-PD-L1 et anti-CTLA-4 inhibe la liaison des récepteurs PD1 et CTLA4, présents à la surface des lymphocytes T, à leur ligand respectif PD-L1 et CD80/CD86 (ou B7) ce qui permet de lever l'inhibition des lymphocytes T. Selon (Ni *et al.*, 2018).

Le récepteur CTLA4 (Cytotoxic T-lymphocytes-associated antigen 4) possède deux ligands : CD80 et CD86 (également appelés B7.1 et B7.2, respectivement). Il est le premier récepteur de point de contrôle à être cliniquement ciblé grâce à des anticorps humanisés anti-CTLA4 : l'ipilimumab et le tremelimumab. L'ipilimumab a montré son efficacité lors de deux essais cliniques de phase III dans le traitement du mélanome métastatique, ce qui lui a permis d'obtenir les autorisations de mise sur le marché aux Etats-Unis et dans l'Union Européenne (Hodi *et al.*, 2010; Robert *et al.*, 2011). L'ipilimumab augmente significativement la durée de vie des patients puisque 18 % de ceux qui ont reçu le traitement à l'ipilimumab survivent plus de 2 ans contre seulement 5 % de ceux traités avec le traitement contrôle (vaccination gp100) (Pardoll, 2012; Topalian *et al.*, 2015; Postow *et al.*, 2015).

Le récepteur PD1 (programmed cell death 1) possède deux ligands : PD-L1 et PD-L2. Les études menées sur le récepteur PD1 visent à la fois le récepteur et/ou ses ligands. Les anticorps anti-PD1 inhibent la liaison du récepteur avec ses deux ligands ce qui est intéressant dans les tumeurs exprimant PD-L1 et PD-L2. Les anticorps anti-PD-L1 inhibent uniquement la liaison PD1/PD-L1 laissant ainsi la liaison PD1/PD-L2 libre afin de conserver l'homéostasie immunitaire dans les tissus sains périphériques (Pardoll, 2012; Topalian *et al.*, 2015; Postow *et al.*, 2015; Santini & Rudin, 2017). Des inhibiteurs anti-PD1 et anti-PD-L1 sont déjà utilisés en clinique. Le nivolumab et le pembrolizumab, deux inhibiteurs du récepteur PD1, sont utilisés dans le traitement de plusieurs cancers comme le mélanome, le lymphome de Hodgkin et le

cancer du poumon non à petites cellules (Kwok *et al.*, 2016; Koppolu & Rekha Vasigala, 2018). Le durvalumab et l'avelumab, deux inhibiteurs du ligand PD-L1, sont respectivement utilisés pour le traitement du cancer du poumon non à petites cellules et pour le carcinome à cellules de Merkel (cancer de la peau très rare) (Shirley, 2018; Mezquita & Planchard, 2018).

Cette thérapie anticancéreuse possède une activité à large spectre ciblant de nombreux types de cancers mais le mélanome (40 % des patients) et le lymphome de Hodgkin (60 % des patients) sont les tumeurs qui répondent le mieux. Des effets secondaires différents de ceux observés lors des traitements de chimiothérapies ou radiothérapies ont également été rapportés. Ils sont liés à l'activation du système immunitaire, on parle d'irAEs (immune-related adverse events). Ces effets secondaires peuvent touchés plusieurs organes comme le système gastro-intestinal, les reins, le système nerveux, le foie, les yeux, la peau, le pancréas et le système endocrinien. Toutefois, certains sont plus fréquemment ciblés comme le système gastro-intestinal (incidence des entérocolites est de 30 % pour les patients traités avec un anti-PD1) ou le système endocrinien (atteinte de la thyroïde, du pancréas, des glandes surrénales) (Postow *et al.*, 2015; Vuagnat & Champiat, 2018; Bajwa *et al.*, 2019).

Les cellules CAR-T

Les cellules CAR-T sont des lymphocytes T génétiquement modifiés pour reconnaître spécifiquement un antigène à la surface des cellules cancéreuses grâce à un récepteur d'antigène chimérique (Chimeric Antigen Receptors = CAR). De cette manière, les lymphocytes T sont capables de détruire les cellules cancéreuses. Les cellules sanguines mononucléaires sont prélevées du patient ou d'un donneur, les lymphocytes T sont isolés et activés puis génétiquement modifiés par transduction virale pour exprimer le CAR. Ils sont ensuite amplifiés et réinjectés au patient (Figure 4). Les CARs sont des protéines de fusion. Elles sont composées d'un fragment d'anticorps à domaine unique (single-chain variable fragment = scFv) nécessaire pour la reconnaissance de l'antigène cible et d'un ou plusieurs domaines nécessaires à l'activation du lymphocyte T. Il existe trois générations de CARs et chaque génération améliore l'activation du lymphocyte T par rapport à la précédente.

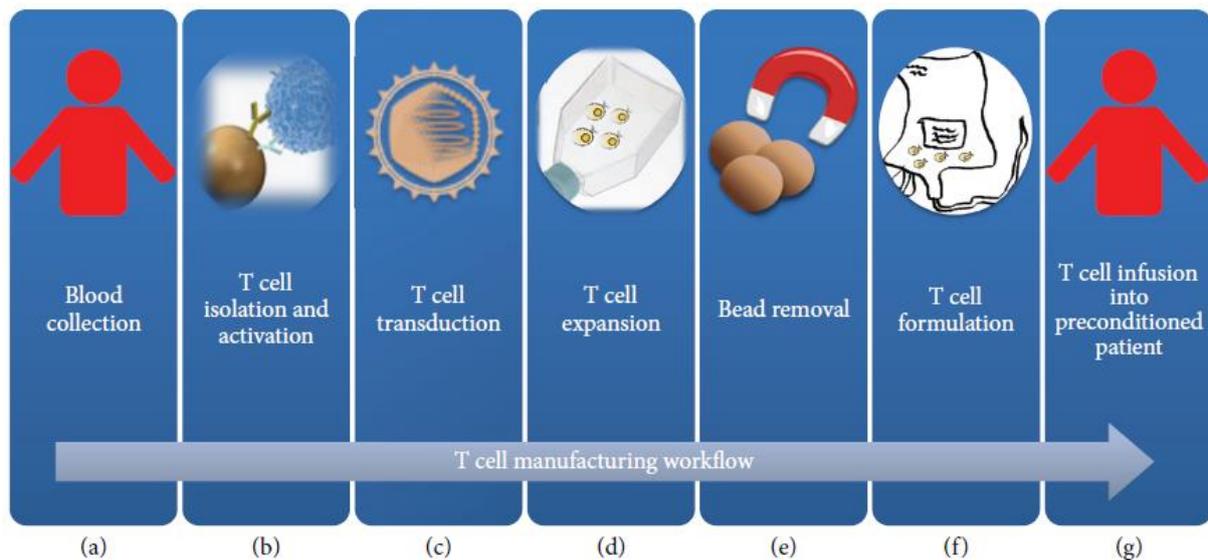


Figure 4 : Processus de fabrication des cellules CAR-T. Les cellules sanguines mononucléaires sont prélevées du patient (ou d'un donneur) (a) et les lymphocytes T sont isolés et activés en présence de billes magnétiques (b). Ils sont ensuite génétiquement modifiés par transduction virale pour exprimer le CAR (c). Les cellules T activées sont mises en culture pendant 10 à 14 jours afin d'atteindre le nombre de cellules nécessaire pour le traitement (d) avant l'extraction par des billes magnétiques (e) et la formulation, soit par congélation ou par transfert adoptif (f). Le patient subi une chimiothérapie avant la perfusion des cellules CAR-T (g) (Almåsbak et al., 2016).

Dans un premier temps, les cellules CAR-T ont été principalement utilisées dans les cancers du sang. Deux types de cellules CAR-T anti-CD19 (Kymriah et Yescarta) sont utilisés dans le traitement, en troisième ligne, du lymphome diffus à grandes cellules B (Neelapu *et al.*, 2017; Leahy *et al.*, 2018). Désormais, de plus en plus d'essais cliniques sont conduits sur des cancers solides comme les cancers du sein, des ovaires, de la vessie ou du pancréas. Dans les cancers solides, les cellules CAR-T doivent surmonter le terrain hostile du μ E caractérisé par la présence de facteurs et de cellules immunosupresseurs, de l'hypoxie, du stress oxydatif et d'une mauvaise infiltration. Pour cela, des cellules CAR-T ont été créées pour exprimer des enzymes afin de les protéger du stress oxydatif ou améliorer leur pénétration à travers le μ E (Almåsbak *et al.*, 2016; June *et al.*, 2018).

Le principal avantage des cellules CAR-T est leur reconnaissance spécifique de l'antigène cible. Une expression exclusive par les cellules cancéreuses est donc obligatoire pour limiter les effets secondaires aux tissus sains. Plusieurs essais cliniques ont montré des effets toxiques, plus ou moins graves, dus à l'affinité des cellules CAR-T avec des cellules saines. Un essai clinique de phase I sur des patients atteints de carcinomes rénaux traités avec des

lymphocytes T exprimant un CAR reconnaissant l'anhydrase carbonique IX (CAIX) a dû être arrêté car le traitement induisait une toxicité hépatique chez plusieurs patients à cause de l'expression de CAIX dans le canal cholédoque (Lamers *et al.*, 2006). De manière plus grave, un patient, atteint d'un cancer colorectal traité avec des cellules CAR-T ciblant le récepteur HER2, a développé une détresse respiratoire suivie de plusieurs arrêts cardiaques peu de temps après l'injection des cellules CAR-T puis est décédé 5 jours après d'une défaillance multi-organes. Il a été établi que les CAR-T ont reconnu le récepteur HER2 faiblement exprimé à la surface des cellules épithéliales pulmonaires (Morgan *et al.*, 2010). D'autres effets secondaires sont également retrouvés tels que le syndrome de libération de cytokines caractérisé par un niveau élevé de cytokines circulantes comme l'IL-6 et IFN- γ , le syndrome d'activation macrophagique, une neurotoxicité et le syndrome de lyse tumorale (Magee & Snook, 2014; Almåsbak *et al.*, 2016; Mikkilineni & Kochenderfer, 2017).

Afin de limiter les effets toxiques, plusieurs stratégies ont été mises en place. Des CARs inhibiteurs (iCARs) exploitent l'inhibition naturelle des lymphocytes T par les points de contrôle immunitaire pour protéger les tissus sains de l'effet off-target. D'autres stratégies consistent à activer les cellules CAR-T uniquement en présence d'une molécule, comme par exemple la rapamycine, ou à utiliser un gène suicide dès que les effets indésirables deviennent trop importants (Almåsbak *et al.*, 2016).

1.2.2. Les thérapies ciblées

Les thérapies ciblées ciblent de manière spécifique une protéine cytoplasmique ou un récepteur surexprimé à la surface des cellules cancéreuses ou des cellules du μ E. Elles sont différenciées des traitements conventionnels qui peuvent toucher toutes les cellules de l'organisme comme les chimiothérapies qui agissent sur toutes les cellules en division. Les thérapies ciblées sont développées depuis de nombreuses années. Une des premières est l'utilisation de l'iode 131 dans le traitement du cancer de la thyroïde en complément de la chirurgie (Joo *et al.*, 2013). L'hormonothérapie est également une thérapie ciblée. Comme son nom l'indique, elle utilise les hormones dans le traitement des cancers du sein (tamoxifène) et de la prostate hormono-dépendants (inhibiteurs des hormones androgènes) (Pronzato & Rondini, 2005, Anon, 2005; Miura & Horie, 2019). Il existe deux types d'hormonothérapie : celle qui bloque la production d'hormone par le corps et celle qui interfère directement avec l'hormone. Ce traitement peut être utilisé comme thérapie principale, thérapie néo-adjuvante

avant l'ablation tumorale totale ou même comme thérapie adjuvante suite au traitement principal.

Aujourd'hui, le terme thérapie ciblée désigne principalement les thérapies émergentes utilisant les anticorps monoclonaux ou les petites molécules inhibitrices. Elles agissent spécifiquement en inhibant des voies de signalisation ou des protéines qui sont essentielles à la croissance et à la survie cellulaire. De cette manière, les cellules cibles (cellules cancéreuses ou cellules du μ E) sont détruites par apoptose (Scott *et al.*, 2012; Joo *et al.*, 2013; Hojjat-Farsangi, 2014). Les antigènes cibles sont définis comme largement surexprimés, mutés ou sélectivement exprimés dans les cellules tumorales en comparaison avec les tissus normaux. De ce fait, les thérapies ciblées sont considérées comme plus efficaces avec moins d'effets indésirables que les traitements conventionnels (Scott *et al.*, 2012).

Les anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux ciblent spécifiquement des antigènes exprimés à la surface des cellules cancéreuses. Leur efficacité et leur toxicité dépendent de la nature de l'antigène cible. Idéalement, l'antigène cible devrait être accessible et exprimé de manière abondante, homogène, constante et exclusive à la surface des cellules cancéreuses. La sécrétion de l'antigène devrait être faible voire nulle afin d'éviter sa liaison avec l'anticorps monoclonal dans la circulation sanguine (Scott *et al.*, 2012). Il existe de nombreux types d'antigènes cibles comme les récepteurs impliqués dans la croissance et la prolifération cellulaire ou des protéines présentes dans le μ E.

On distingue quatre types d'anticorps monoclonaux en fonction de l'origine des fragments qui les composent : les anticorps murins, chimériques, humanisés et humains (Figure 5).

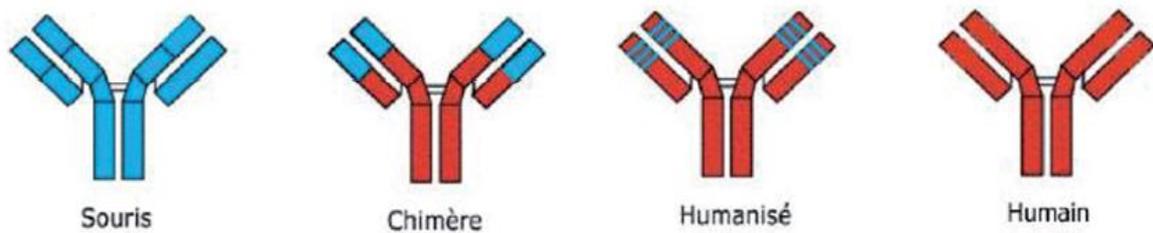


Figure 5 : Schémas des quatre types d'anticorps monoclonaux. Les zones en bleu correspondent aux parties murines et les zones en rouge, aux parties humaines (Scheen, 2009)

Les anticorps murins sont les premiers anticorps monoclonaux produits pour la thérapie. Cependant, ils ont une faible affinité pour les antigènes humains et induisent une forte toxicité chez l'homme. Ces anticorps induisent la formation d'anticorps appelés HAMA (Human Anti-Mouse Antibody) dirigés contre les anticorps monoclonaux murins. Cette immunisation conduit non seulement à la diminution de l'efficacité thérapeutique (anticorps monoclonaux neutralisés) mais aussi à des réactions allergiques.

Les anticorps chimériques correspondent à la fusion des gènes codant pour les régions variables d'un anticorps murin avec les gènes codant pour les régions constantes d'une immunoglobuline humaine. L'anticorps ne possède plus que 33 % de protéine murine. Cette construction leur permet de diminuer la réponse HAMA qui conduit à une meilleure tolérance des anticorps. Ainsi, ils ont une demi-vie plus longue passant de 20 heures pour les anticorps murins à plusieurs jours pour les anticorps chimériques. Leur spécificité et leur affinité reste, tout de même, identique à l'anticorps murin parental.

Les anticorps humanisés sont des immunoglobulines G (IgG) humaines dans lesquelles la région hypervariable humaine a été remplacée par celle de l'anticorps monoclonal murin. L'IgG humaine possède donc la même spécificité que l'anticorps de souris tout en diminuant la réponse immunitaire (HAMA). L'efficacité de l'anticorps humanisé n'est toujours pas optimale.

Les anticorps humains sont obtenus suite à la fusion des régions variables humaines d'intérêts aux régions constantes d'une IgG humaine ce qui augmente la spécificité de l'anticorps. Ces anticorps sont biocompatibles réduisant considérablement les risques d'une réponse HAMA (Scheen, 2009).

Tous les anticorps monoclonaux utilisés en cancérologie se terminent par le suffixe « mab » pour « monoclonal antibody » et une nomenclature internationale a été créée pour les différencier : « mo-mab » pour les anticorps murins, « xi-mab » pour les anticorps chimériques, « zu-mab » pour les anticorps humanisés et « mu-mab » pour les anticorps totalement humains (Tableau 1). En plus de leur suffixe, une syllabe qui le précède permet de connaître l'organe cible de l'anticorps monoclonal tel que « me(l) » pour le mélanome, « pr(o) » pour les tumeurs de la prostate et « tu(m) » pour les tumeurs diverses (Scheen, 2009).

Types d'anticorps	Suffixe	% humain	Antigénicité	Exemples
Murins	« momab »	0	+++	Muromomab Ibridomomab
Chimériques	« ximab »	60-70	+	Infliximab Rituximab
Humanisés	« zumab »	> 90	± 0	Trastuzumab Bévacizumab
Humains	« mumab »	100	± 0	Adalimumab

Tableau 1 : Nomenclature internationale des quatre types d'anticorps monoclonaux. Selon (Scheen, 2009)

Les anticorps monoclonaux possèdent plusieurs mécanismes d'action : ils peuvent avoir une action directe sur l'antigène (activité agoniste ou antagoniste de récepteurs, induction de l'apoptose), ils agissent également sur le système immunitaire (régulation de l'activité des lymphocytes T, cf. 1.2.1.) et sont également utilisés dans la délivrance spécifique de médicaments, de toxines ou d'agents cytotoxiques (Scott *et al.*, 2012). Dans le dernier cas, lorsque l'anticorps se lie de manière spécifique à l'antigène à la surface de la cellule cancéreuse, l'anticorps et l'agent cytotoxique qui lui est associé sont internalisés (Figure 6) (Adams & Weiner, 2005; Joo *et al.*, 2013; Oldham & Dillman, 2016).

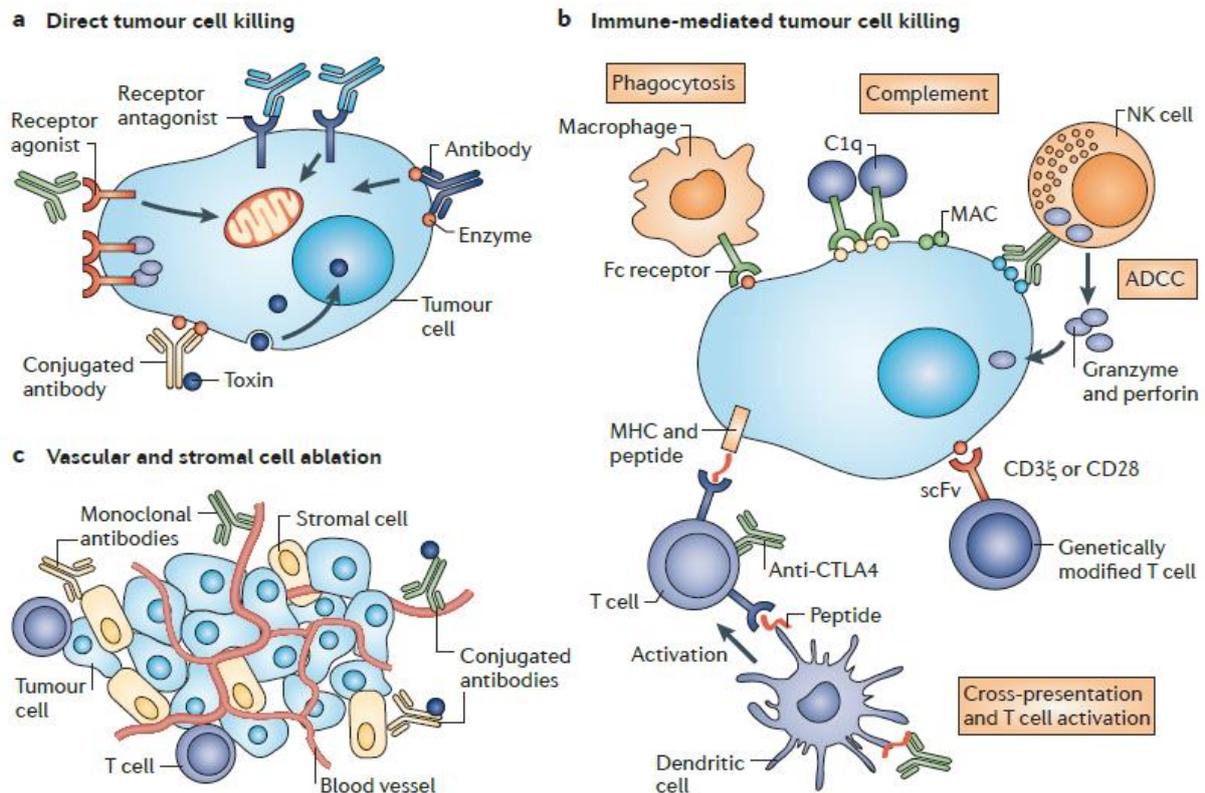


Figure 6 : Mécanismes de mort cellulaire induite par des anticorps monoclonaux. **A**- La mort directe des cellules tumorales peut être induite par une activité agoniste du récepteur, comme la liaison d'un anticorps sur un récepteur à la surface de la cellule cancéreuse et l'activation, conduisant à l'apoptose. Il peut aussi être induit par une activité antagoniste du récepteur en bloquant sa dimérisation, son activité kinase et la signalisation en aval et conduisant à la réduction de la prolifération et à l'apoptose. La liaison d'un anticorps sur une enzyme peut conduire à la neutralisation, l'inhibition de la signalisation et la mort de la cellule, et un anticorps conjugué peut apporter d'autres molécules (agent cytotoxique, ARN interférant ou radio-isotope) à la tumeur. **B** – La mort des cellules cancéreuses induite par le système immunitaire peut être effectuée par une induction de phagocytose, une activation du complément, une cytotoxicité dépendant de l'anticorps, des lymphocytes T génétiquement modifiés ciblant la tumeur par un fragment d'anticorps (scFv), les lymphocytes T activés, les cellules dendritiques à travers la liaison anticorps/antigène et l'inhibition des récepteurs inhibiteurs des lymphocytes T (CTLA4). **C** – L'ablation des cellules vasculaires et du μ E peut être induites par antagonisme des récepteurs vasculaires, inhibition des cellules du μ E, libération d'agents cytotoxiques dans les cellules du μ E ou de la vascularisation (Scott et al., 2012).

Comme pour les autres thérapies anti-tumorales, certains cancers échappent aux traitements par anticorps monoclonaux. Cet échappement peut être dû à diverses raisons : l'expression hétérogène de l'antigène cible par les cellules cancéreuses ou les propriétés physiques et pharmacocinétiques de l'anticorps monoclonal impactant sa diffusion dans le μ E. Des rechutes peuvent également avoir lieu à cause du développement de résistances comme des

mutations secondaires des antigènes cibles ou la compensation de la voie de signalisation cible (Scott *et al.*, 2012).

Les petites molécules inhibitrices

Les petites molécules inhibitrices ont des faibles poids moléculaires (moins de 800 daltons) et sont capables de pénétrer à travers la membrane cellulaire pour agir sur des molécules cytoplasmiques essentielles à la croissance et au fonctionnement des cellules tumorales (Joo *et al.*, 2013). Le nom de ces petites molécules possède le suffixe « ib » pour indiquer ses propriétés inhibitrices et la majorité d'entre elles sont des inhibiteurs des tyrosines kinases. Elles ont montré une amélioration de la survie des patients pour plusieurs cancers comme la leucémie myéloïde chronique (imatinib) (Druker *et al.*, 2006) ou le cancer du poumon non à petite cellules (gefitinib) (Maemondo *et al.*, 2010).

Ces inhibiteurs agissent sur les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs) ou les domaines tyrosine kinase (inhibiteur des tyrosines kinases = ITKs). Les tyrosines kinases sont des enzymes impliquées dans la phosphorylation d'autres protéines. Le mécanisme de phosphorylation est essentiel dans le fonctionnement d'une cellule. Les RTKs sont des récepteurs transmembranaires liés à des domaines tyrosines kinases intracellulaires. La dérégulation de leur activité représente un mécanisme majeur d'échappement d'une cellule normale vers une cellule cancéreuse. L'activation aberrante des RTKs est souvent due à la surexpression du récepteur, à l'amplification ou la mutation du gène ou à la faible expression des inhibiteurs de ce récepteur. Les RTKs sont, pour la plupart, faiblement ou pas activés dans les cellules normales alors qu'ils sont hyperactivés ou largement surexprimés à la surface des cellules tumorales. Les RTKs représentent donc une cible pharmacologique intéressante (Hojjat-Farsangi, 2014; Wu *et al.*, 2015).

Les ITKs agissent sur des protéines intracellulaires impliquées dans des voies de signalisation vitales. Ils ont également une action sur les domaines tyrosines kinases des RTKs. Les ITKs sont regroupés en trois groupes : le groupe I comprend les inhibiteurs compétitifs de l'ATP d'où provient le groupement phosphate à fixer. Les groupes II et III sont composés d'inhibiteurs non compétitifs de l'ATP et agissent sur le changement structural du domaine tyrosine kinase du RTKs afin qu'il perde son activité kinase (Hojjat-Farsangi, 2014).

L'acquisition de résistances est également observée lors de traitements avec les petites molécules inhibitrices. Elles sont généralement causées par une altération de la cible ou du médicament, l'augmentation du taux d'efflux, le changement du métabolisme ainsi que l'activation de voies de signalisation de survie qui compensent la voie ciblée. L'association d'un anticorps monoclonal avec une petite molécule inhibitrice inhibant à la fois la partie extracellulaire et la partie intracellulaire du RTKs est utilisée pour améliorer l'efficacité du traitement tout en limitant les risques de développer des résistances (Hojjat-Farsangi, 2014).

Ces thérapies innovantes ont considérablement amélioré la durée et la qualité de vie des patients. Toutefois, l'efficacité reste limitée à certains cancers et le risque de développer des résistances et d'échapper aux traitements est élevé.

2. Les thermothérapies

Les thermothérapies utilisent la variation de la température à des fins thérapeutiques. Elles possèdent de nombreux avantages qui font d'elles, des thérapies anticancéreuses très intéressantes : (1) les méthodes de variations de la température sont peu voire non invasives et elles peuvent être focalisées sur une zone cible ; (2) les cellules cancéreuses sont plus sensibles aux changements de température que les cellules saines ; (3) les caractéristiques physiologiques des tumeurs ont un faible impact sur l'efficacité des thermothérapies permettant de surpasser des résistances développées avec les autres thérapies ; (4) elles peuvent conduire à la mort des cellules cancéreuses de manière directe par ablation des tissus tumoraux ou de manière indirecte en améliorant des thérapies déjà existantes par potentialisation de leurs effets (hyperthermie magnétique et radiothérapie pour le traitement du glioblastome) et (5) elles peuvent induire la libération de manière contrôlée dans le temps et l'espace d'agents cytotoxiques encapsulés dans des nanoparticules thermosensibles afin de limiter les effets secondaires systémiques.

Parmi les thermothérapies, on différencie la thérapie par le froid de celle par le chaud.

2.1. La thérapie par le froid : la cryothérapie

2.1.1. Un peu d'histoire

La cryothérapie est une méthode de destruction locale des lésions tissulaires par des cycles de congélation/décongélation. Les premières études ont vu le jour en 1850 en Angleterre où James Arnott a utilisé des solutions de sel contenant de la glace pilée pour traiter localement des cancers dans des sites accessibles tel que le sein ou l'utérus. Les solutions salines atteignent des températures comprises entre - 18 et - 24 °C, idéales pour congeler des tumeurs conduisant à la diminution de leur taille et de la douleur. Plus tard, la compression et la liquéfaction des gaz de l'atmosphère à des températures très basses a beaucoup fait évoluer la cryothérapie. L'air liquide et la neige carbonique (dioxyde de carbone solide) ont rapidement pu être utilisés à des fins thérapeutiques dans l'ablation de zones malignes localisées. En 1950, Allington a utilisé un coton-tige trempé dans de l'azote liquide pour traiter une variété de maladies de la peau. Cependant, l'utilisation de la cryothérapie était restreinte à des zones peu profondes et accessibles. Pour y remédier, Allington a utilisé un disque cylindrique en cuivre plongé dans de l'azote liquide. La capacité calorifique et les caractéristiques d'échange thermique (conductivité, émissivité) du cuivre étant supérieures à celles du coton-tige, la profondeur d'action a pu être doublée passant de 1 - 2 mm à 4 - 5 mm (Theodorescu, 2004; Shah *et al.*, 2014).

2.1.2. Les différentes techniques de cryothérapie

Comme précédemment décrit, les premiers appareils de cryothérapie, créés en 1961 par Cooper et Lee, utilisaient uniquement l'azote liquide comme cryogène (Cooper & Lee, 1961). Malgré ses caractéristiques thermiques très intéressantes, l'azote liquide présente de nombreux inconvénients. Il requière une crysonde avec un large diamètre (supérieur à 3,5 mm) et le contrôle du processus de congélation (démarrage et arrêt) est lent. Le stockage de l'azote liquide est difficile car il s'évapore rapidement à température ambiante conduisant à la perte de matériel. L'équipement est également encombrant ce qui affecte sa mobilité et son stockage. En dépit de ses points faibles, l'azote liquide reste un cryogène très utilisé en clinique. Notamment dans le traitement du cancer de l'œsophage pour lequel la cryothérapie par pulvérisation d'azote liquide par voie endoscopique est utilisée. Des études cliniques ont montré

l'efficacité de cette technique sans effet secondaire grave (Cash *et al.*, 2007; Dumot *et al.*, 2009; Greenwald *et al.*, 2010; Tsai *et al.*, 2017).

L'utilisation des compresses d'argon offre de nombreux avantages par rapport à l'azote liquide. La température des deux cryogènes est proche (température argon liquide = - 186 °C ; température azote liquide = - 195 °C) mais l'utilisation de l'argon permet de démarrer et d'arrêter quasiment instantanément le cycle de congélation. La cryosonde est beaucoup plus petite, le stockage de l'argon est plus simple (sans évaporation) et l'appareil est facilement transportable.

Pour le traitement du cancer de la prostate, une troisième génération d'appareil de cryothérapie a été créée. Il utilise l'argon et l'hélium comme cryogène couplé à un système transrectal guidé par des ultrasons (transrectal ultrasounds = TRUS) avec des cathéters urétraux chauds pour préserver la paroi de l'urètre. Ce système utilise également une cryosonde dont le diamètre est proche d'une aiguille de 17-gauge permettant d'offrir plus de précision et également d'insérer plusieurs sondes si nécessaire (Figure 7) (Theodorescu, 2004; Cornelis *et al.*, 2013; Lian *et al.*, 2016).

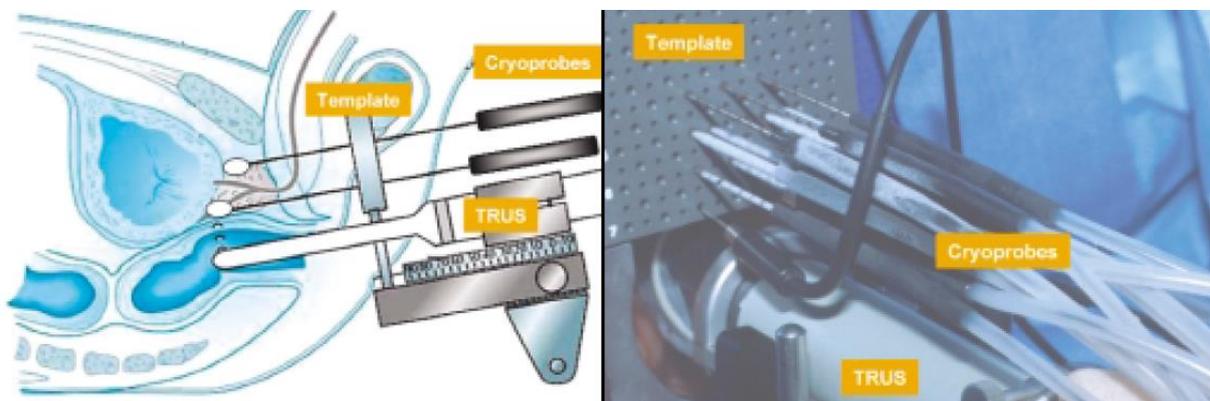


Figure 7 : Système de troisième génération pour le traitement du cancer de la prostate par cryothérapie. Un guidage avec une matrice placée contre le périnée (template) et un système d'ultrasons transrectal (TRUS). Une aiguille de 17-gauge (cryoprobes) est insérée à travers le périnée dans la prostate. L'argon circule à travers l'aiguille générant une forte diminution de la température et la formation de glace. Grâce au système d'ultrasons, le suivi de la zone traitée peut être réalisé (Theodorescu, 2004).

2.1.3. Les mécanismes d'action de la cryothérapie

Les effets destructeurs de la cryothérapie sont principalement dus aux atteintes cellulaires et aux atteintes vasculaires.

Les atteintes cellulaires sont immédiates et résultent des effets délétères des cycles de congélation/décongélation. Lorsque la température diminue, le métabolisme et les enzymes sont inhibés et les structures cellulaires sont endommagées. Pour des températures inférieures à 0 °C, l'eau cristallise dans l'espace extracellulaire ce qui concentre les solutés et conduit à un environnement hyperosmotique, toxique pour la cellule, jusqu'à atteindre la déshydratation cellulaire. La formation de cristaux de glaces intracellulaires a lieu pour des températures inférieures à - 40 °C et est responsable de dommages cellulaires sérieux comme la destruction de la membrane cellulaire et des organites (Figure 8).

Les atteintes vasculaires sont retardées et résultent des effets progressifs sur la microcirculation. La diminution de la température conduit à une vasoconstriction et une diminution du flux sanguin puis à un état d'hypoxie. Lors de l'étape de décongélation, une vasodilatation se produit et les atteintes endothéliales induisent une augmentation de la perméabilité de la paroi vasculaire, des œdèmes, une agrégation des plaquettes et la formation de micro-thrombus. Dans les heures qui suivent la décongélation, la circulation sanguine stagne, une thrombose totale des vaisseaux sanguins est observée conduisant à une nécrose du tissu (Figure 8) (Theodorescu, 2004; Yu *et al.*, 2014; Shah *et al.*, 2014).

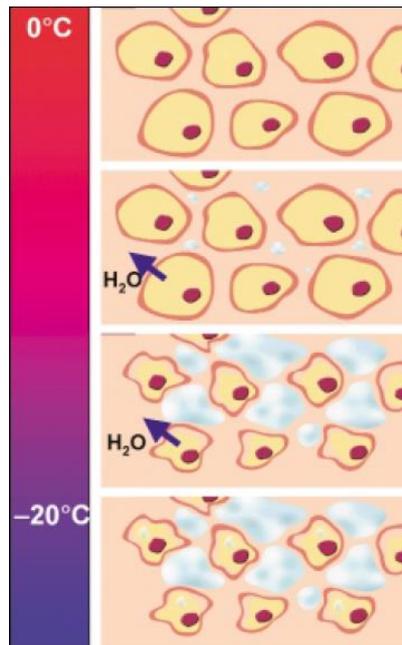


Figure 8 : Atteintes cellulaires induites par cryothérapie. Lorsque la température atteint 0 °C, l'eau cristallise. Les premiers cristaux de glace se forment dans le milieu extracellulaire ce qui crée un environnement extracellulaire hyperosmotique. L'eau des cellules sort induisant une déshydratation cellulaire puis la mort cellulaire à long terme (Theodorescu, 2004).

2.1.4. Les principaux paramètres de la cryothérapie

Il existe quatre points essentiels au traitement par cryothérapie :

- la température du tissu : Les atteintes cellulaires graves sont causées par les cristaux de glace intracellulaires qui se forment à des températures inférieures à - 40 °C. Lorsque les températures de traitement sont comprises entre - 40 et - 50 °C, le temps d'exposition n'a pas d'impact sur l'efficacité de la cryothérapie alors que pour des températures supérieures à - 40 °C, plus le temps d'exposition est long et plus les dommages tissulaires sont importants.
- le temps de congélation : Le temps nécessaire pour atteindre une température létale doit être le plus rapide possible afin d'induire le maximum de dommage.
- le temps de décongélation : La phase de décongélation doit être lente. La forte pression osmotique dans l'espace extracellulaire et la formation de cristaux de glace intracellulaires conduisent à la mort cellulaire. Plus le temps de décongélation est long et plus les atteintes tissulaires sont importantes.

- le nombre de répétition du cycle de congélation/décongélation : Les dommages tissulaires deviennent plus importants à chaque répétition du cycle de congélation/décongélation. Lors d'un second cycle, les changements physico-chimiques délétères pour la cellule sont additionnés à ceux déjà obtenus, le diamètre des cristaux de glace intracellulaires est plus grand, le refroidissement tissulaire est plus rapide et le volume de la zone traitée est plus large se rapprochant ainsi de la périphérie. La répétition des cycles de congélation/décongélation montre une augmentation du taux de nécrose cellulaire (Shah et al., 2014; Theodorescu, 2004).

2.2. La thérapie par la chaleur : l'hyperthermie

2.2.1. Un peu d'histoire

L'hyperthermie est définie par une augmentation de la température corporelle globale ou des tissus ciblés dans le but d'induire des effets thérapeutiques. Son utilisation en thérapie date de 3 000 ans avant J. C. où elle a été décrite en Egypte, en Inde et en Chine. Les Grecs et les Romains étudiaient aussi le contrôle de la température corporelle humaine dans la guérison de nombreuses maladies dont le cancer (Toraya-Brown & Fiering, 2014; Gas, 2017). Selon Hippocrate, « les maladies que la médecine ne peut soigner sont traitées avec un couteau. Celles qui ne peuvent être traitées avec un couteau sont traitées avec le feu. Celles qui ne peuvent être traitées avec le feu doivent être considérées comme incurables » (Glazer & Curley, 2011; Toraya-Brown & Fiering, 2014; Gas, 2017).

De nombreuses inventions ont été mises en place pour induire une hyperthermie locale ou globale, comme par exemple, entourer le patient d'un plastique et le baigner dans de la cire chaude ou le laisser dans une boîte ou une pièce chaude. Une autre méthode consistait à chauffer le sang prélevé du patient puis à lui réinjecter. En 1898, le docteur suédois, Frans J. E. Westermarck, a traité des cancers en faisant circuler de l'eau chaude (42 – 44 °C) dans un anneau en métal qu'il appliquait directement sur la tumeur. Avec le progrès technologique, de nouvelles méthodes physiques ont fait leur apparition. Ce fût le cas lors de l'invention de l'électricité où des médecins firent passer un courant électrique à travers des tumeurs pour les brûler. Le physicien et physiologiste français, Jacques-Arsene d'Arsonval, a quant à lui utilisé un courant de haute fréquence dans des électrodes pour traiter diverses maladies (Gas, 2017). Au début du XX^{ème} siècle, les procédures d'électrochirurgie ont permis de détruire les tissus cancéreux et les

nodules lymphatiques (Glazer and Curley, 2011). Les ultrasons ont également été utilisés et les premières publications ont été éditées en 1933. L'utilisation d'ultrasons comme thérapie en combinaison avec la radiothérapie et la chimiothérapie a respectivement été publiée en 1946 et 1967 (Kremkau, 1979). A la même période, les premiers essais d'hyperthermie magnétique, créée par la circulation d'un courant alternatif de haute fréquence dans une bobine appliquée à distance de la tumeur, ont été menés par une équipe de chirurgiens américains sur des ganglions lymphatiques de chiens. Ces travaux pionniers sont remarquables car les auteurs avaient déjà introduit les grandes problématiques non seulement sur le modèle biologique animal mais aussi sur les aspects chimiques et physiques (Gilchrist *et al.*, 1957).

2.2.2. Les différents types d'hyperthermie

Il existe trois principaux types d'hyperthermie : l'hyperthermie corps entier, l'hyperthermie régionale et l'hyperthermie locale. L'hyperthermie corps entier consiste à augmenter la température corporelle pour atteindre des températures comprises entre 39 °C et 41 °C afin de mimer une fièvre. Elle est principalement utilisée pour traiter des cancers métastatiques en association avec d'autres thérapies. L'hyperthermie régionale est appliquée sur une large partie du corps comme la cavité péritonéale ou la jambe contrairement à l'hyperthermie locale qui se focalise uniquement sur la tumeur. Elles sont toutes les deux utilisées pour le traitement des tumeurs locales. Les hyperthermies régionales et corps entiers sont des techniques anciennes, associées à des effets secondaires importants comme des maladies cardiaques, une thrombocytopénie et une perméabilisation des capillaires. Les techniques d'hyperthermie actuelles sont principalement des hyperthermies locales (Ortega & Pankhurst, 2012; Titsworth *et al.*, 2014; Toraya-Brown & Fiering, 2014; Périgo *et al.*, 2015).

Pour la suite de ce mémoire, nous nous intéresserons uniquement à l'hyperthermie locale permettant de cibler spécifiquement les tumeurs localisées (sans métastases).

2.2.3. La dose thermique

L'efficacité d'une hyperthermie locale dépend de la sensibilité des tissus à la chaleur, de la température atteinte et du temps d'exposition. La capacité à induire une mort cellulaire à des températures inférieures à 42 – 43 °C est nettement inférieure que pour des températures supérieures à 43 °C. La dose thermique est alors calculée grâce au CEM43°C (cumulative equivalent minutes at 43 °C) définie par Sapareto et Dewey en 1984:

$$CEM43^{\circ}C = \sum_{i=1}^n t_i \cdot R^{(43-T_i)}$$

R est une constante : $R = 1/4$ pour des températures inférieures à 43 °C et $R = 1/2$ pour des températures supérieures à 43 °C et T_i est la température moyenne pendant l'intervalle de temps t_i (Yarmolenko *et al.*, 2011; van Rhooon *et al.*, 2013 p.4). L'unité de la dose thermique est encore mal définie. Certains utilisent une unité de temps (la minute) (Nadobny *et al.*, 2015; Bojanac *et al.*, 2018) et d'autres l'unité « CEM₄₃ » (van Rhooon *et al.*, 2013; Juang *et al.*, 2014). L'unité de temps ne fait pas apparaître la notion de température, pourtant essentielle dans la dose thermique. Nous avons donc choisi d'exprimer les doses thermiques avec l'unité « CEM₄₃ ».

On distingue deux types d'hyperthermie. La thermoablation conduit directement à la mort des cellules cancéreuses par la chaleur et nécessite une dose thermique élevée (Figure 9). L'hyperthermie modérée est induite par une dose thermique faible et ne conduit pas directement à la mort des cellules tumorales (Figure 9). Elle est actuellement utilisée pour potentialiser l'effet d'autres thérapies anticancéreuses (chimiothérapie et radiothérapie). Elle commence à être mise en œuvre pour induire la libération contrôlée d'agents cytotoxiques encapsulés dans des nanoparticules thermosensibles (Mertz *et al.*, 2017) et a été proposée pour activer l'expression de gènes thermo-inductibles (cf. 2.2.6.). L'utilisation de la dose thermique semble être la valeur la plus pertinente pour discriminer les deux types d'hyperthermie. De nombreuses publications scientifiques n'intègrent pas ce concept et définissent une température charnière de 45 °C comme une transition entre les deux hyperthermies : les températures comprises entre 43 °C et 45 °C induisent une hyperthermie modérée et les températures supérieures à 45 °C conduisent à une thermoablation (Hildebrandt *et al.*, 2002; Tempel *et al.*, 2016). Il est clair que le temps d'application est un élément essentiel. A défaut d'utiliser la dose thermique, il est indispensable de préciser le temps d'application du traitement d'hyperthermie en même temps que la température atteinte dans le tissu cible.

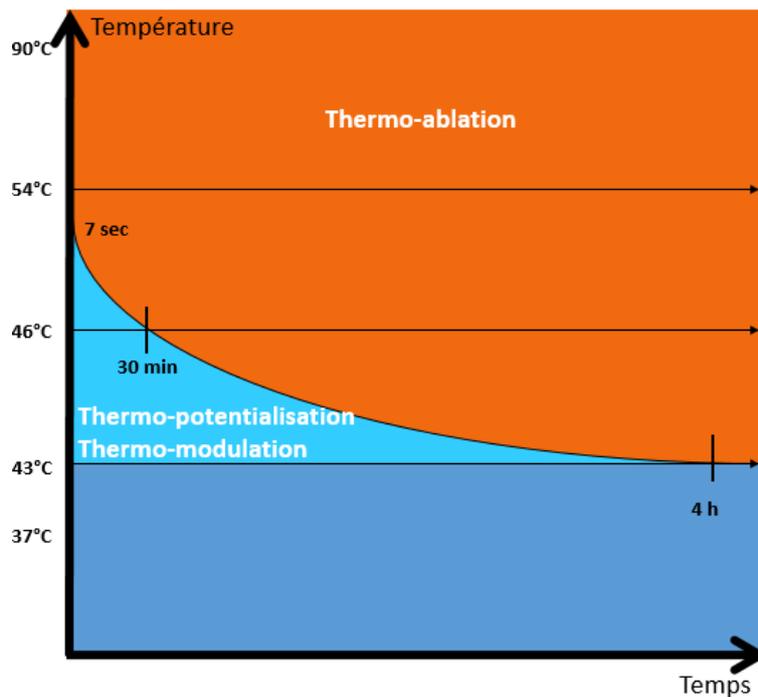


Figure 9 : Effets biologiques induits par hyperthermie en fonction de la dose thermique (M. Lepetit Coiffé, laboratoire IMF, Université de Bordeaux, 2010 d'après (Sapareto & Dewey, 1984)).

2.2.4. Les mécanismes de mort cellulaire induite par hyperthermie

Chaque type cellulaire possède une sensibilité différente à l'augmentation de la température. Les doses thermiques élevées conduisent directement à la mort des cellules cancéreuses par nécrose. Pour les doses thermiques plus faibles, la mort cellulaire est induite secondairement par l'altération de plusieurs processus physiologiques au niveau des cellules cancéreuses et des cellules du μ E (Figure 10). La localisation de la tumeur doit également être prise en compte. Lorsqu'elle se trouve dans les tissus profonds, la dose thermique est difficile à délivrer correctement pour certaines méthodes d'hyperthermie. Par ailleurs, pendant le traitement, des changements physiologiques ont lieu (changement de la pression sanguine et de la concentration en oxygène) ce qui rend la distribution homogène de la chaleur dans la tumeur plus difficile (Roti, 2008; Hilger, 2013; Tempel *et al.*, 2016).

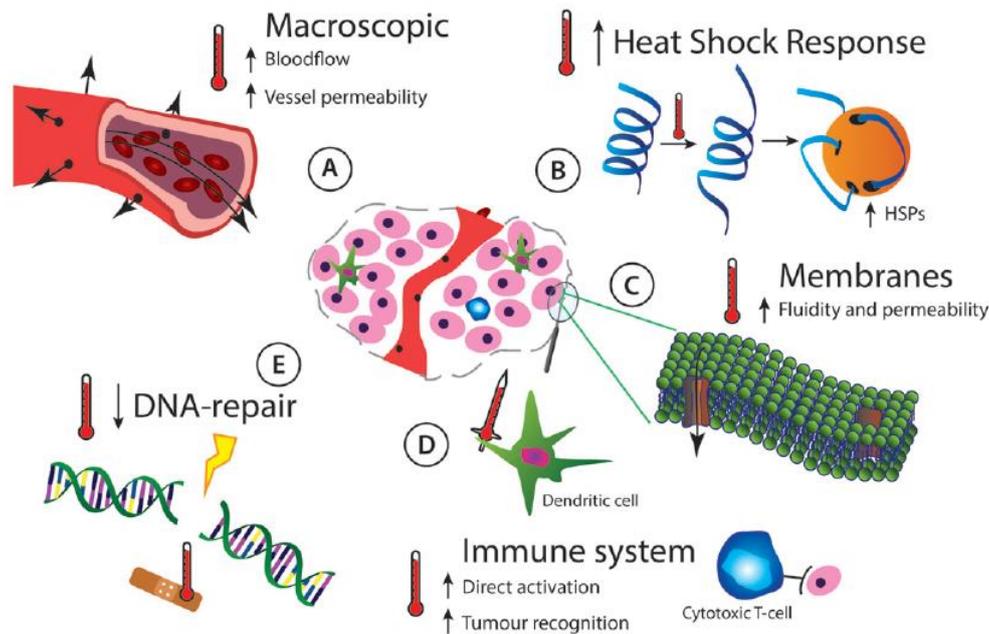


Figure 10 : Effets biologiques d’une hyperthermie modérée et locale dans une tumeur. La tumeur est représentée au centre et les différents effets physiologiques et moléculaires induits par l’hyperthermie sont (A) une atteinte de la vascularisation tumorale avec une augmentation du flux sanguin et de la perméabilité vasculaire, (B) une activation de la réponse des Heat Shock Protein (Hsp), (C) une augmentation de la fluidité et de la perméabilité de la membrane plasmique, (D) une activation du système immunitaire et (E) une atteinte de l’ADN (Tempel *et al.*, 2016).

Les effets biologiques d’une hyperthermie modérée et locale dans une tumeur sont multiples. Comme illustré dans la figure 10 (Tempel *et al.*, 2016), on peut distinguer :

Les atteintes vasculaires

Lors d’une hyperthermie modérée (dose thermique faible), les premiers effets biologiques observés sont une élévation du flux sanguin et une vasodilatation induisant une augmentation de la concentration en oxygène et de l’apport en nutriments dans la tumeur. Ces effets potentialisent ceux de la radiothérapie, qui dépendent du taux d’oxygène, et des chimiothérapies, en favorisant la pénétration des agents cytotoxiques dans la tumeur (Hildebrandt *et al.*, 2002; Tempel *et al.*, 2016).

L'activation de la réponse des Hsp

Les Heat Shock Protein (Hsp) sont surexprimées suite à un stress cellulaire qui peut être causé par une hyperthermie, un stress oxydatif, une infection virale/bactérienne ou une privation de nutriments. Les Hsp, initialement découvertes dans les glandes salivaires de la Drosophile (Ritossa, 1962), sont des chaperons moléculaires ubiquitaires et phylogénétiquement très conservés qui possèdent un rôle de cytoprotection. Elles sont classées selon leur poids moléculaire. Les protéines de hauts poids moléculaires (27 à 100 kDa) ont une activité dépendante de l'ATP et leur fonction est de lier et structurer les protéines naissantes. Les Hsp de petits poids moléculaires (15 à 43 kDa), dont l'activité est indépendante de l'ATP, sont impliquées dans le développement embryonnaire (formation d'organes respiratoires et cardiaques) et sont aussi utilisées comme biomarqueurs du développement tumoral (Morimoto, 1998; Kregel, 2002; Ikwegbue *et al.*, 2017; Calderwood, 2018).

Dans des conditions physiologiques, les Hsp sont liées aux Heat Shock Factors (Hsf) dans le cytoplasme (Figure 11). La liaison Hsp/Hsf inhibe la translocation des Hsf dans le noyau. Il existe 4 Hsf (1, 2, 3 et 4) : les Hsf 1 et 4 sont retrouvés dans les cellules eucaryotes adultes et participent à l'effet cytoprotecteur des Hsp ; le Hsf 2 est impliqué dans l'embryogenèse et le Hsf 3 a été retrouvé uniquement dans les cellules aviaires (Morimoto, 1998). Lors de conditions de stress cellulaire, les Hsp se lient aux protéines dénaturées et libèrent le Hsf qui migre vers le noyau, se phosphoryle et se trimérise (conformation active). Le trimère se lie ensuite aux Heat Shock promoter Element (Hse) situés dans le promoteur des Hsp permettant la transcription du gène. Les Hse sont composés de multiples répétitions adjacentes et inverses du motif pentanucléotidique 5'-nGAAn-3'. Ce système permet une production très rapide des Hsp afin de limiter rapidement les dommages cellulaires. Lorsque toutes les protéines dénaturées ont retrouvées leur conformation ou sont détruites, les Hsp se lient à nouveau aux Hsf ce qui stoppe la transcription (Morimoto, 1998; Hildebrandt *et al.*, 2002; Rome *et al.*, 2005).

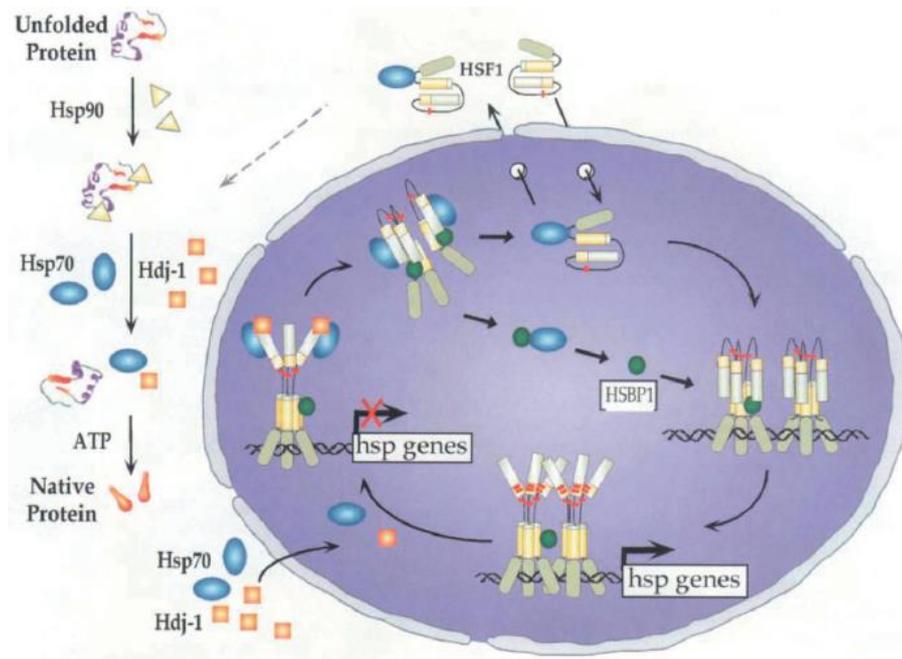


Figure 11 : Mécanisme d'activation de la synthèse des Hsp. L'activation de Hsf1 est liée à l'apparition de protéines mal conformées qui mobilisent les Hsp. L'effet chaperon des Hsp limite l'accumulation des protéines dénaturées et la détérioration des cellules. Hdj-1 = Hsp40 (Morimoto, 1998)

Dans les cellules cancéreuses, les Hsp sont surexprimées à cause de la production d'oncogènes (protéines mutées et mal-conformées) et du μE hostile (zone d'hypoxie). Comme dans une cellule saine, les Hsp ont majoritairement un rôle de cytoprotection et donc un effet pro-tumoral. Néanmoins, dans certains types de cancers, les Hsp peuvent avoir des propriétés anti-tumorales. C'est le cas de la Hsp70 dont l'expression est corrélée avec un mauvais pronostic dans les cancers du sein, de l'endomètre, de l'utérus et de la vessie. En revanche, elle est associée à un bon pronostic dans les cancers de l'œsophage, du pancréas, du rein et du mélanome grâce à sa capacité à activer le système immunitaire contre les cellules tumorales (cf. 2.2.4. l'activation du système immunitaire) (Ciocca & Calderwood, 2005).

L'augmentation de la fluidité et de la perméabilité des membranes

L'élévation de la température induit l'augmentation de la fluidité et de la perméabilité de la membrane plasmique et modifie aussi le comportement de certaines protéines comme les récepteurs (Tempel *et al.*, 2016).

L'activation du système immunitaire

L'hyperthermie modérée peut activer le système immunitaire dans la tumeur par différents moyens. La sécrétion des Hsp dans le milieu extracellulaire active le système immunitaire. Les Hsp se lient à des antigènes puis le complexe peptidique formé active les cellules présentatrices d'antigènes afin de stimuler la sécrétion de protéines pro-inflammatoires et d'entraîner une réponse immunitaire (activation des lymphocytes T). Les Hsp peuvent également augmenter le nombre de complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I à la surface des cellules tumorales permettant la reconnaissance par les lymphocytes T (Moros *et al.*, 2015; Tempel *et al.*, 2016). L'altération des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales par une hyperthermie peut conduire à l'activation des lymphocytes T contre les cellules tumorales. Enfin, l'augmentation du flux sanguin conduit à une meilleure distribution des cellules immunitaires dans la tumeur (Tempel *et al.*, 2016).

Les dommages à l'ADN

L'élévation de la température sensibilise les cellules cancéreuses à des agents qui interfèrent avec l'ADN et avec le métabolisme de l'ADN. Cependant, les mécanismes exacts sont encore mal connus. De nombreuses études montrent que l'hyperthermie a une action directe sur l'ADN conduisant à des aberrations chromosomiques et des ruptures de l'ADN. D'autres, en revanche, montrent une implication indirecte passant par la dénaturation des protéines impliquées dans la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN. Ces résultats sont cohérents avec ceux décrivant les cellules en phase S et M plus sensibles à un traitement d'hyperthermie que les cellules en phase G1 et G2 (Hildebrandt *et al.*, 2002; Roti, 2008; Tempel *et al.*, 2016).

2.2.5. Les différentes méthodes pour induire une hyperthermie locale

De nombreuses techniques physiques ont été développées pour élever localement la température: les ultrasons focalisés de haute intensité (High Intensity Focused Ultrasounds = HIFU), le champ magnétique (hyperthermie magnétique) ou les ondes électromagnétiques (micro-ondes, rayonnements lasers visibles ou infrarouges, radiofréquences). Aucune de ces

méthodes n'est optimale ou universelle mais chacune possède ses points forts et ses limites qui doivent être corrélés avec les diverses caractéristiques physiopathologiques des cancers.

Les ultrasons focalisés de haute intensité

Les ultrasons sont des ondes mécaniques opérant à une fréquence supérieure au spectre audible humain (environ 16 kHz). Dans le cadre des thérapies, la fréquence utilisée est de l'ordre du mégahertz (typiquement entre 0,8 et 3,5 MHz). En fonction de l'intensité acoustique et de la durée d'application, il est possible d'induire des effets biologiques thermiques (hyperthermie, thermo-coagulation) et/ou mécaniques (sonoporation, lithotripsie). Pour augmenter significativement l'intensité acoustique locale dans la région ciblée, un émetteur (transducteur) de forme concave est généralement utilisé. Il permet de faire converger le faisceau d'ultrasons émis par l'ensemble de la surface active du transducteur vers un point focal. Les dimensions de la tâche focale sont propres à chaque transducteur et dépendent de ses caractéristiques techniques (focale, ouverture et fréquence d'utilisation). Dans le cas d'un transducteur mono-élément, la distance focale est fixe. Pour s'affranchir de cette limitation, des transducteurs constitués de plusieurs éléments pilotables séparément ont été développés ce qui permet de contrôler la position du point focal (Figure 12) (Grenier *et al.*, 2008).

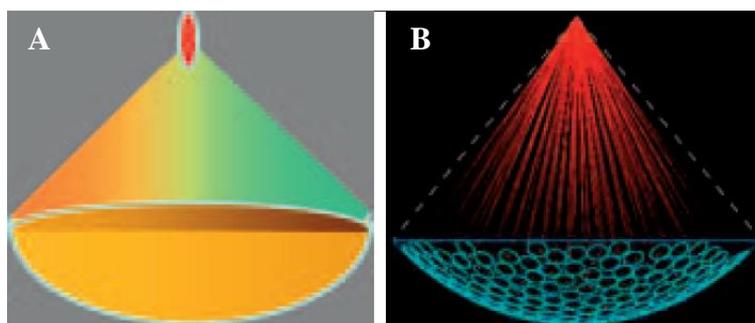


Figure 12 : Schémas de transducteurs à ultrasons focalisés. Ils peuvent être de type mono-élément (A) ou multiéléments (B) (Grenier *et al.*, 2008).

La technologie des HIFU est non invasive puisque le transducteur est placé à l'extérieur du corps (ou dans les voies naturelles pour le traitement de la prostate, par exemple) et le faisceau d'ultrasons est capable de pénétrer profondément dans les tissus mous. Ces caractéristiques font des HIFU une technique applicable à une large gamme de tumeurs. De

plus, lorsque le volume de la tumeur est supérieur à celui du point focal, plusieurs traitements doivent être appliqués successivement pour couvrir l'intégralité de la tumeur. Cette méthode possède néanmoins des limites. La propagation des HIFU diffère en fonction des caractéristiques du milieu biologique. L'hétérogénéité du milieu peut alors induire une distorsion du faisceau ultrasonore conduisant à l'inefficacité du traitement sur la zone ciblée et à la formation non désirée de points de chauffage secondaires dans les tissus sains, associé à des effets secondaires potentiellement délétères. L'absorption de l'énergie ultrasonore diffère également en fonction des tissus biologiques et de la fréquence des ultrasons. Par exemple, l'eau et le sang absorbent faiblement les ultrasons contrairement aux os qui présentent une forte absorption (Haar & Coussios, 2007; Grenier *et al.*, 2008; Ellis *et al.*, 2013; Napoli *et al.*, 2013a).

Suite à un traitement par HIFU, des effets thermiques et non-thermiques peuvent être observés et conduire à des dommages biologiques réversibles ou irréversibles. L'élévation de la température dans la zone ciblée résulte de l'absorption de l'énergie ultrasonore par le milieu (fonction de la composition du milieu et des caractéristiques des ultrasons) et de la dissipation de la chaleur principalement due à la vascularisation tumorale (Moonen, 2007). Les effets non-thermiques sont majoritairement dus au phénomène de cavitation (Figure 13). Lors de la propagation des HIFU dans le tissu, des cycles alternés de hautes (compression) et basses (raréfaction) pressions se succèdent. Pendant le cycle de raréfaction, des bulles peuvent se former et grossir jusqu'à atteindre un volume de rupture conduisant à l'éclatement des bulles responsable de dommages cellulaires par action mécanique. De manière générale, à l'échelle cellulaire, les HIFU induisent une lyse des cellules, des perturbations du cycle cellulaire et divers dommages au niveau des organites comme des atteintes mitochondriales, des altérations de la membrane lysosomale conduisant à la libération massive d'enzymes lysosomales dans le cytoplasme et une dilatation de la membrane du réticulum endoplasmique rugueux (Kennedy, 2005; Izadifar *et al.*, 2017).

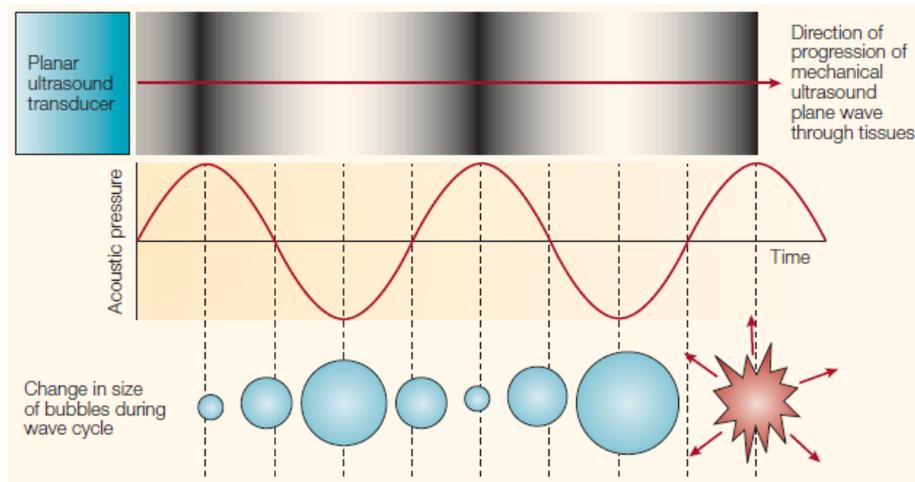


Figure 13 : Principe de la cavitation. Les ondes ultrasonores progressent à travers les tissus causant des cycles alternatifs d'élévation (compression) et de réduction (raréfaction) de pression. Suite à la formation de bulles dans le milieu, leurs tailles oscillent en fonction des changements de pression et peuvent finalement éclater causant une libération d'énergie et une augmentation locale de la température (Kennedy, 2005).

Plusieurs effets indésirables ont également été observés dont principalement des brûlures du second degré au niveau du point d'entrée des ultrasons. La cavitation peut également entraîner la rupture de vaisseaux sanguins ou le détachement de cellules cancéreuses de la tumeur primaire conduisant à leur libération dans la circulation sanguine et à la formation de métastases (Izadifar *et al.*, 2017).

L'hyperthermie magnétique

L'application d'un champ magnétique alternatif à haute fréquence (alternating magnetic field = AMF) sur des nanoparticules magnétiques (NPMs) conduit à une élévation de la température du milieu environnant, on parle alors d'hyperthermie magnétique. Les effets thérapeutiques de l'hyperthermie magnétique dépendent principalement des propriétés physiques des NPMs et des paramètres du champ magnétique appliqué (fréquence et amplitude).

Les nanoparticules magnétiques

Actuellement, de nombreux matériaux sont utilisés pour composer les NPMs (ferrites de cobalt, alliages intermétalliques) mais celles en oxyde de fer, telles que la maghémite (Fe_3O_4)

et la magnétite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), sont les plus couramment utilisées car elles sont superparamagnétiques (leur aimantation augmente rapidement sous l'application d'un champ magnétique mais elle revient à zéro en l'absence de champ magnétique appliqué), peu toxiques, biocompatibles et facilement dégradées et éliminées par le métabolisme du fer. Elle possèdent également les autorisations pour être utilisées chez l'homme comme agents de contraste pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM) en Europe et aux Etats-Unis (Ortega & Pankhurst, 2012). Deux types de NPMs d'oxyde de fer peuvent être distinguées : les NPMs ferro- (ou ferri-) magnétiques et les NPMs superparamagnétiques. Les NPMs ferro- (ou ferri-) magnétiques possèdent un moment magnétique résultant non nul en l'absence de champ magnétique extérieur. L'aimantation, appelée aimantation rémanente (M_r), peut être problématique en vue de la stabilisation des dispersions colloïdales des NPMs en milieu biologique. Bien qu'intéressantes pour leurs propriétés d'échauffement, les nanoparticules ferro- (ou ferri-) magnétiques sont donc difficilement utilisables pour des applications en nanomédecine. Lorsque la taille du matériau ferro- (ou ferri-) magnétiques est inférieure à la taille d'un domaine magnétique, les NPMs deviennent alors monodomaines c'est-à-dire que tous les moments magnétiques des atomes de fer qui les composent sont orientés dans la même direction. Au-delà d'une certaine température, appelée température de blocage (T_b), l'énergie thermique prend le pas sur l'énergie magnétique ce qui entraîne la relaxation des moments magnétiques dont la direction se met à fluctuer librement par rapport aux axes cristallographiques (dit « axes de facile aimantation »). On parle alors de superparamagnétisme car les NPMs s'aimantent sous un champ magnétique mais perdent leur aimantation à champ nul, au-delà d'une température de blocage. Pour les NPMs d'oxyde de fer sphéroïdes, la limite de taille superpara-ferromagnétique est de l'ordre de 18-20 nm, à température ambiante (Salas *et al.*, 2014). Les NPMs monocœurs et les NPMs multicœurs (nanofleurs) adoptent toutes les deux un comportement superparamagnétique, même si les dernières se situent très près de la transition de superpara à ferrimagnétique (Hugounenq *et al.*, 2012; Lartigue *et al.*, 2012).

Le pouvoir chauffant spécifique (appelé Specific Absorption Rate = SAR) des NPMs (exprimé en W/g) est défini par la quantité de chaleur délivrée par les NPMs par unité de masse et de temps sous l'application du champ magnétique alternatif. Plus le pouvoir chauffant des NPMs est élevé et plus les dommages cellulaires sont importants (Ortega & Pankhurst, 2012; Hilger, 2013). Selon la taille et la forme de la NPM, les propriétés magnétiques et thermogéniques diffèrent. Par exemple, une NPM multicœur (nanofleur) possède des propriétés thermiques plus importantes qu'une NPM monocœur de même taille. Ceci s'explique par le fait

que chaque nanocristal qui compose la NPM multicœur se comporte comme un monodomaine magnétique car tous les grains magnétiques qui la composent ont leur moment orienté dans la même orientation, ceci en vertu d'un mécanisme de formation dit par « attachement orienté » (Gavilán *et al.*, 2017; Wei *et al.*, 2018). Lors de l'application du champ magnétique, les moments magnétiques de chaque cœur sont couplés par interaction dite « d'échange » (due aux forces nucléaires faibles qui s'exercent à très courte distance). Les propriétés magnétiques coopératives, qui en résultent, confèrent aux NPMs multicœur des propriétés d'échauffement singulières, les rendant beaucoup plus efficaces que celles des NPMs monocores (Hugounenq *et al.*, 2012; Lartigue *et al.*, 2012; Kostopoulou *et al.*, 2014). Par ailleurs, les NPMs multicœurs ont montré des taux d'accumulation dans les cellules supérieurs à ceux des NPMs monocœurs, à la fois dans les expériences *in vitro* et *in vivo* (Hemery *et al.*, 2017a; Kostopoulou *et al.*, 2018).

Lors d'un traitement d'hyperthermie, l'accumulation des NPMs dans la tumeur est influencée par la voie d'administration. Les injections par voie intra-tumorale sont les plus utilisées car elles permettent de contrôler la quantité de NPMs dans la tumeur tout en limitant l'apport dans les tissus sains. Son principal inconvénient est l'accessibilité de la tumeur notamment pour des tumeurs profondes. L'administration par voie intraveineuse peut surmonter ce problème et cibler d'éventuelles métastases. Cependant, elle possède également plusieurs limites. La quantité de NPMs accumulées dans la tumeur est faible et n'est pas maîtrisée. De plus, les NPMs d'un diamètre supérieur à 5 nm subissent le phénomène d'opsonisation par lequel des protéines plasmatiques (en particulier les immunoglobulines) s'adsorbent à leur surface. Les NPMs sont ensuite captées par le système immunitaire comme les cellules de Kupffer (Owens & Peppas, 2006; Hilger, 2013). Pour limiter ce phénomène, les NPMs sont décorées avec des macromolécules polymères hydrophiles telles que le polyéthylène glycol (PEG) ou des polysaccharides. L'adsorption des protéines présentes dans la circulation sanguine est alors ralentie sous l'effet répulsif de la couronne polymère. Les NPMs présentent alors un caractère « furtif » et, en augmentant leur temps de circulation dans le sang, elles peuvent s'accumuler davantage dans les tumeurs par effet EPR (Owens & Peppas, 2006; Ortega & Pankhurst, 2012). Dans ce cas, l'internalisation des NPMs est non spécifique : c'est le ciblage passif (Figure 14). Afin d'améliorer la spécificité des NPMs pour les cellules tumorales, des ligands (peptides, acides nucléiques, petites molécules) sont liés à la surface des NPMs afin de reconnaître spécifiquement un antigène surexprimé à la surface des cellules cancéreuses. On parle alors de ciblage actif (Figure 14). Les NPMs internalisées provoquent des dommages intracellulaires plus importants que celles localisées dans le milieu

extracellulaire, tout en limitant les effets secondaires sur les tissus sains environnants. Comme pour les thérapies ciblées, il convient de choisir correctement le ligand pour éviter les effets « off-target » indésirables (Bertrand *et al.*, 2014; Danhier, 2016).

Le ciblage actif a déjà fait l'objet de plusieurs études *in vitro* montrant l'internalisation spécifique des NPMs dans les cellules cancéreuses puis leur accumulation dans les lysosomes. Dans ces conditions, l'application du champ magnétique conduit à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) suite à la réaction de Fenton. Les ROS peroxydent ensuite les lipides de la membrane lysosomale conduisant à sa perméabilisation puis à la libération d'enzymes lysosomales dans le cytoplasme, telles que la cathepsine B. Cette enzyme active ensuite une voie de mort cellulaire dépendante de la caspase 1 conduisant à environ 25 % de mort cellulaire (Domenech *et al.*, 2013; Clerc *et al.*, 2018).

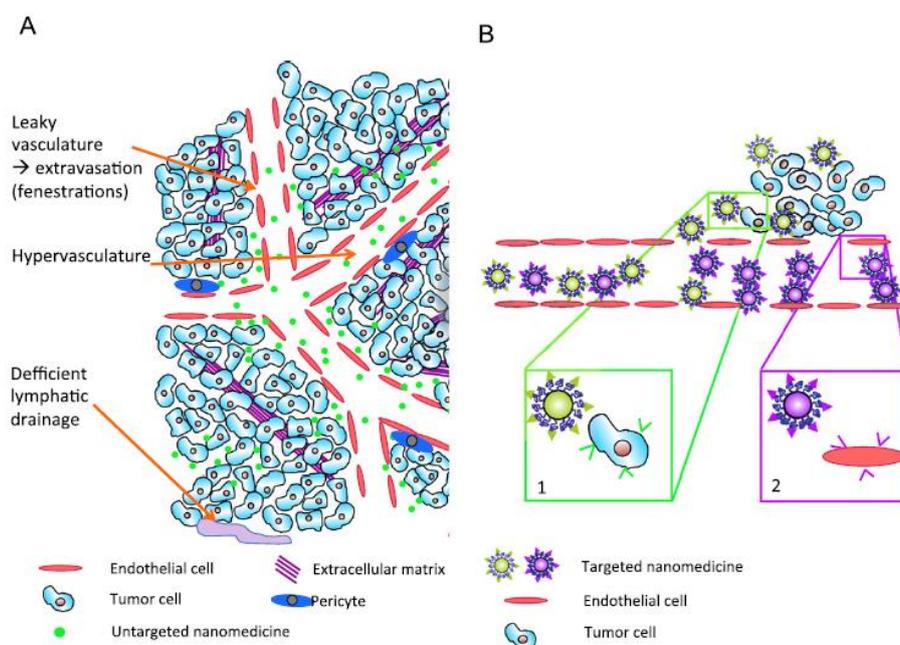


Figure 14 : Schéma du ciblage passif et actif des NPMs dans la tumeur. A- Ciblage passif des nanoparticules par l'effet EPR. **B –** Ciblage actif des nanoparticules décorées avec un peptide ou un anticorps pour une fixation spécifique à l'antigène surexprimé à la surface des cellules cancéreuses (1) ou des cellules épithéliales (2) (Danhier, 2016).

Malgré son potentiel, le ciblage actif n'est pas encore utilisé en clinique pour diverses raisons : (1) les conditions requises pour l'hyperthermie magnétique ne sont pas compatibles avec celles requises pour le ciblage actif. Par exemple, des NPMs avec un large diamètre ont un pouvoir chauffant élevé mais leur internalisation dans les cellules cibles est limitée ; (2)

l'efficacité du ciblage actif dépend de la physiologie de la tumeur telle que le degré de vascularisation, le niveau d'expression de l'antigène (PSMA dans le cancer de la prostate) ou d'un récepteur membranaire (HER2 dans le cancer du sein, CCKR2 dans celui du pancréas) et sa sélectivité par rapport aux cellules saines et (3) l'opsonisation des NPMs peut masquer le ligand de reconnaissance fixé à leur surface (Hilger, 2013).

La dégradation des NPMs fait l'objet de nombreuses études afin de déterminer leur devenir et éviter leur accumulation dans l'organisme. Les NPMs d'oxyde de fer sont rapidement dégradées (7 à 12 jours) grâce à la réaction de Fenton dans les lysosomes. Le métabolisme naturel du fer est ensuite impliqué avec l'intervention des ferritines (protéines de stockage du fer), des transferrines et des ferroportines (transporteurs qui évacuent le fer hors de la cellule). Le fer est également incorporé dans l'hème de l'hémoglobine pour le transport de l'oxygène par les érythrocytes. Au contraire, les nanoparticules d'or persistent dans l'organisme 1 an après l'injection. La chimie de surface joue également un rôle protecteur des NPMs. Les NPMs décorées avec des polymères ou recouvertes d'une couche d'or protectrice ont une vitesse de dégradation plus lente que les mêmes NPMs sans modification de surface. La dégradation des NPMs semble donc être très variable suivant leur composition ainsi que les molécules greffées à leur surface (Ortega & Pankhurst, 2012; Chifman *et al.*, 2014; Javed *et al.*, 2014; Kolosnjaj-Tabi *et al.*, 2015; Mazuel *et al.*, 2017; Kafina & Paw, 2017).

Le champ magnétique alternatif de haute fréquence

La chaleur générée lors d'une hyperthermie magnétique dépend de trois mécanismes physiques : les courants de Foucault liés à la conductivité électrique du milieu, la perte d'hystérèse de l'aimantation et les relaxations de Néel et de Brown des moments magnétiques des NPMs.

Les courants de Foucault sont des courants électromagnétiques induits, opposés au champ magnétique lorsque celui-ci pénètre dans un échantillon conducteur. Ils peuvent également se produire dans les tissus contenant de l'eau et des sels entraînant une élévation de la température de ces tissus. Par exemple en IRM, les séquences de radiofréquence appliquées ne doivent pas entraîner une élévation de la température du patient de plus de 1 °C (c'est la raison pour laquelle l'IRM est interdite aux patientes enceintes ou bien possédant des implants métalliques). Il est donc recommandé de toujours mesurer l'élévation de la température des

tampons dépourvus de NPMs dans les conditions de champ magnétique utilisées (Ortega & Pankhurst, 2012).

La perte d'hystérèse : la structure magnétique des matériaux ferromagnétiques est divisée en domaines appelés « domaines de Weiss ». Ce sont des régions regroupant des moments magnétiques de même orientation. Lorsque le matériau ferromagnétique est soumis à un champ magnétique statique d'abord positif puis négatif, l'aimantation a une réponse non-linéaire : c'est le cycle d'hystérèse (Figure 15). Il dépend de trois paramètres : (1) l'aimantation à saturation (M_s) qui est atteinte lorsque tous les moments magnétiques sont alignés avec le champ magnétique ; (2) l'aimantation rémanente (M_r) qui est l'aimantation résiduelle du champ nul et (3) le champ coercitif (H_c) qui correspond à l'intensité du champ magnétique nécessaire pour démagnétiser totalement l'échantillon (Figure 15). L'énergie thermique dissipée est alors proportionnelle au cycle d'hystérèse décrit par le moment magnétique sous l'action d'un champ magnétique alternatif (Ortega & Pankhurst, 2012).

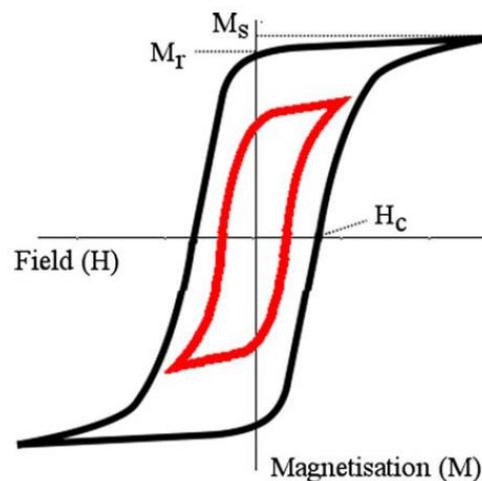


Figure 15 : Cycle d'hystérèse décrit lors de l'application d'un champ magnétique alternatif. Le cycle d'hystérèse saturé (noir) et le cycle mineur (rouge) de l'aimantation en fonction du champ magnétique appliqué avec l'indication des paramètres les plus représentatifs : aimantation à saturation (M_s), aimantation rémanente (M_r) et champ coercitif (H_c) (Ortega & Pankhurst, 2012).

Les relaxations de Néel et de Brown concernent uniquement les NPMs superparamagnétiques. Les pertes thermiques des NPMs en suspension dans un champ magnétique oscillant sont principalement dues à deux mécanismes de dissipation. Le premier implique un changement d'orientation de tous les moments magnétiques dans les NPMs et donc

de la direction du vecteur d'aimantation des NPMs par rapport aux directions de facile aimantation : c'est la relaxation de Néel. Ce basculement d'aimantation, qui « coûte » de l'énergie au système apporté par le champ magnétique extérieur, s'accompagne d'une dissipation de chaleur par effet Joule. Le second correspond à la rotation physique des NPMs de manière dépendante du volume hydrodynamique des NPMs et des paramètres de leur milieu (principalement la viscosité) : c'est la relaxation de Brown (Ortega & Pankhurst, 2012). Dans ce cas, ce sont les forces de frictions du solvant avec la surface de la NPM qui constituent la source de dissipation de chaleur. Ces deux types de dissipation coexistent généralement selon les conditions expérimentales (couples champ-fréquence, SAR, diamètre de la NPM, viscosité du milieu).

L'innocuité du champ magnétique seul sur les tissus sains a fait l'objet de plusieurs d'études, dont notamment, en 1988, Brezovich a appliqué un champ magnétique sur la main d'un volontaire sain à une fréquence (f) de 13,56 MHz et une amplitude (H) de 36,2 A/m. La personne a ressenti une sensation de chaleur mais était capable de résister au traitement pendant plus d'une heure sans inconfort majeur. Brezovich en a déduit que le produit $f \times H$ doit être inférieur à $4,85 \times 10^8 \text{ A.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$ pour limiter les effets délétères du champ magnétique sur l'organisme : ce sont les critères de Brezovich (Brezovich, 1988; Hergt & Dutz, 2007). Ces études peuvent être remises en question puisqu'elles se basent sur le ressenti de la chaleur qui est variable selon les individus. De plus, les progrès techniques ont permis d'améliorer des générateurs et les inducteurs de champ magnétique pour qu'ils génèrent des courants de Foucault moindres, qui sont responsables des stimulations nerveuses. Les critères de Brezovich ont alors été réévalués et aujourd'hui le produit $f \times H$ doit plutôt être inférieur à $5 \times 10^9 \text{ A.m}^{-1}.\text{s}^{-1}$ pour limiter les effets secondaires (Hergt & Dutz, 2007).

Les ondes électromagnétiques

Les micro-ondes

Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques dont la fréquence est comprise entre 1 et 300 GHz. Les dispositifs cliniques opèrent généralement à des fréquences autour de 1 GHz. Lors d'un traitement par hyperthermie, la propagation des micro-ondes dans la tumeur fait osciller les molécules dipolaires, principalement les molécules d'eau, à la fréquence de l'onde. Les oscillations entraînent une élévation de la température par friction qui conduit à la nécrose

du tissu par coagulation (Figure 16) (Simon *et al.*, 2005; Ward *et al.*, 2013). Le traitement d'hyperthermie utilisant des micro-ondes conduit à une élévation de la température plus rapide et plus élevée (160 à 180 °C) par rapport aux autres modalités d'hyperthermie (environ 100 °C pour les radiofréquences, par exemple) (Ward *et al.*, 2013; Ryan & Brace, 2017; Meloni *et al.*, 2017; Vogl *et al.*, 2017a).

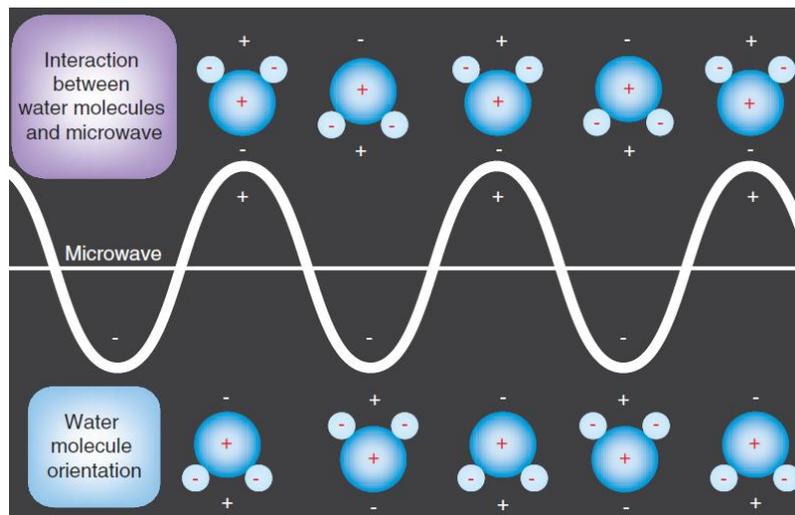


Figure 16 : Effet des micro-ondes sur les molécules d'eau. Les molécules d'eau sont des dipôles intrinsèques et l'application des micro-ondes conduit à une augmentation locale de la température par friction (Ward *et al.*, 2013).

Les micro-ondes sont conduites par une antenne insérée dans la zone à traiter et les ondes se répandent dans le tissu sur une zone de diamètre maximal de 5 cm autour de l'antenne. De nombreuses antennes de tailles et de formes différentes ont été conçues afin de s'adapter au mieux à la morphologie de la tumeur. Pour les tumeurs ayant un volume supérieur à la capacité de l'antenne, plusieurs antennes sont insérées afin d'atteindre toutes les cellules cancéreuses (Wright *et al.*, 2003; Harari *et al.*, 2015). Un système de refroidissement de l'antenne, avec de l'eau ou du gaz, est également mis en place pour limiter les dommages aux cellules saines environnantes, augmenter la quantité d'énergie déposée dans le tissu cible et faciliter la formation de grandes zones d'ablation (Meloni *et al.*, 2017; Vogl *et al.*, 2017b; Yang *et al.*, 2018).

De manière générale, l'utilisation de micro-ondes en hyperthermie est bien tolérée. Les effets indésirables décrits sont une fièvre (effet secondaire le plus courant), des brûlures cutanées et des hémorragies. Des atteintes plus spécifiques en fonction de l'organe traité ont été

rapportées, comme par exemple, une perforation du canal biliaire et des abcès lors du traitement du cancer du foie. Le retrait de l'antenne de micro-ondes peut également conduire à la propagation de cellules tumorales dans son trajet (Dou *et al.*, 2016).

Les radiofréquences

Les radiofréquences couvrent un spectre compris entre 3 kHz et 300 MHz. Les appareillages cliniques opèrent généralement autour de 0,5 MHz. Le principe de l'élévation de la température par radiofréquences est semblable à celui utilisant des micro-ondes. Cependant, le mécanisme est différent puisque l'élévation de la température résulte du champ électrique généré autour de l'applicateur (généralement une ou plusieurs aiguilles insérées par voie percutanée) dans la zone ciblée qui produit un courant électrique responsable de l'échauffement tissulaire. Une nécrose tissulaire par coagulation est alors observée (Zhang *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2016).

Plusieurs types d'électrodes sont disponibles avec ou sans refroidissement de la partie active et peuvent disposer d'une extrémité déployable dans la tumeur. Pour les tumeurs de diamètres supérieurs à 3 cm, plusieurs ablations successives sont généralement réalisées en déplaçant l'aiguille (Zhang *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2016).

Des effets secondaires ont été rapportés suite à un traitement utilisant les radiofréquences. Dans le traitement du cancer du foie, les complications majeures représentent 2,2 à 3 % des patients et sont, par exemples, des saignements, des abcès hépatiques, des perforations intestinales (Crocetti *et al.*, 2010). Dans le traitement du cancer du poumon, les complications majeures rapportées sont une inflammation de la plèvre, des pneumonies, des saignements et des pneumothorax (Kashima *et al.*, 2011).

Les radiofréquences représentent la méthode d'hyperthermie la plus utilisée en clinique notamment dans le traitement des tumeurs primaires et des métastases hépatiques ou pulmonaires. (Chen *et al.*, 2016; Rustagi & Chhoda, 2017; Palussière *et al.*, 2017). Pour le cancer du foie, la chirurgie est le traitement principalement utilisé. Toutefois, lorsqu'elle n'est pas possible (stade avancé du cancer, par exemple) les radiofréquences peuvent être utilisées. C'est une méthode moins invasive, plus reproductible et moins onéreuse. Des études cliniques ont comparées le taux de survie à 3 ans de patients traités par radiofréquences ou par injection percutanée d'éthanol (un autre traitement prescrit lorsque la chirurgie n'est pas possible).

Chaque étude montre que le taux de survie des patients traités par radiofréquences est supérieur à celui des patients ayant reçu une injection percutanée d'éthanol (Lin *et al.*, 2004, 2005; Shiina *et al.*, 2005; Brunello *et al.*, 2008; Crocetti *et al.*, 2010).

Les lasers

La thermothérapie interstitielle induite par laser (Laser-induced Interstitial Thermotherapy = LITT) conduit à une augmentation locale de la température grâce à un faisceau laser monochromatique inséré par voie percutanée jusqu'à la tumeur. Lors du traitement de thermothérapie, le faisceau lumineux est absorbé par le tissu puis son énergie est convertie en chaleur. L'élévation de la température conduit alors à la nécrose tissulaire. Les tissus brûlés diminuent la propagation des photons dans le tissu et donc l'efficacité du traitement. Afin de limiter cet effet, des applicateurs refroidis ont été développés. La production de chaleur dépend à la fois des caractéristiques du laser (longueur d'onde, énergie, puissance, temps d'application) et des propriétés physiques du tissu (niveau d'absorption du tissu). Le paramètre le plus important est la longueur d'onde du laser, qui est choisie en fonction de la localisation de la tumeur dans les tissus profonds ou de surface. Par exemple, les lasers avec une forte absorption par les tissus sont utilisés pour des tumeurs en surface. Ainsi, de nombreux lasers ont été développés (Figure 17). Le plus utilisé en LITT est le laser Nd:YAG (neodymium-doped yttrium aluminium garnet) avec une longueur d'onde dans l'infrarouge (1064 nm) et une pénétration optique élevée (1 à 10 cm) (Mensel *et al.*, 2006; Schena *et al.*, 2017).

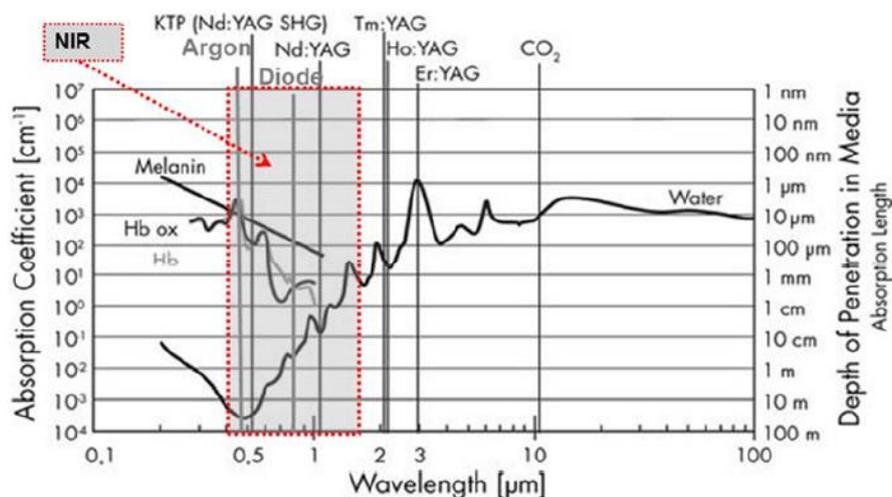


Figure 17 : Caractéristiques des lasers médicaux. Les spectres d'absorption de la mélanine, de l'hémoglobine et de l'eau sont également montrés. YAG = Yttrium Aluminium

Garnet ; Nd:YAG = Neodymium-doped:YAG ; Ho:YAG = holmium-doped:YAG; Tm:YAG = Thulium-doped:YAG ; Er:YAG = Erbium-doped:YAG ; KTP = potassium-titanyl-phosphate ; NIR = near infrared ; Hb = hémoglobine ; Hb ox = oxyhémoglobine (Sчена *et al.*, 2017).

La LITT est capable de traiter une zone de 5 cm de diamètre. Pour les tumeurs de diamètre supérieur, plusieurs lasers sont insérés simultanément (entre 2 et 5 applicateurs). Cette technique de thermoablation est rapide à effectuer et elle est de plus en plus utilisée, notamment pour les cancers du pancréas et du foie (Mensel *et al.*, 2006; Saccomandi *et al.*, 2014; Sचना *et al.*, 2017).

2.2.6. Applications de l'hyperthermie locale pour le traitement du cancer

La thermoablation induit la mort des cellules cancéreuses directement par la chaleur. Actuellement, les thérapies locales sont largement utilisées en clinique pour induire une thermoablation tumorale. Par exemple, l'utilisation des HIFU dans le traitement des cancers de la prostate, du sein, du foie et du rein ainsi que dans le traitement des métastases osseuses a montré une amélioration de la qualité de vie des patients avec une réduction des symptômes liés au cancer et une augmentation du taux de survie (Kennedy, 2005; Grenier *et al.*, 2008; Liberman *et al.*, 2009; Napoli *et al.*, 2013a; Hsiao *et al.*, 2016).

Lorsque la dose thermique appliquée est plus faible, on parle d'hyperthermie modérée. Dans ce cas, la température atteinte n'est pas suffisamment élevée pour induire la mort des cellules cancéreuses, deux effets sont alors décrits.

Le premier résulte de la combinaison de l'hyperthermie avec d'autres thérapies anticancéreuses (chimiothérapie ou radiothérapie) afin d'obtenir un effet synergique : c'est la thermo-potentialisation. Des études ont montré qu'une hyperthermie appliquée avant les rayons X augmente les effets de la radiothérapie grâce à l'élévation de la concentration en oxygène dans la tumeur (Datta *et al.*, 2015a; Janati Esfahani *et al.*, 2017). Des essais cliniques ont également été réalisés sur une variété de cancers tels que les cancers du sein, du poumon, de la prostate, de l'œsophage, le mélanome ou le glioblastome (Johannsen *et al.*, 2005, 2007b; Datta *et al.*, 2015b). La société MagForce a développé la thérapie NanoTherm™ basée sur l'hyperthermie magnétique pour le traitement du glioblastome. L'hyperthermie a été combinée avec la radiothérapie afin d'augmenter le taux de survie des patients, allant de 14,6 mois à

22,2 mois. La combinaison des traitement d'hyperthermie et de radiothérapie a reçu les autorisations européennes pour son utilisation dans le traitement du glioblastome (Maier-Hauff *et al.*, 2007, 2007). Les effets des chimiothérapies sont également améliorés par l'hyperthermie notamment grâce à une augmentation du flux sanguin dans la tumeur, à la vasodilatation et à la perméabilisation des membranes cellulaires (Hildebrandt *et al.*, 2002; Hilger, 2013). L'effet synergique n'est toutefois pas observé pour tous les agents de chimiothérapie. L'hyperthermie n'a aucun effet sur le 5-fluorouracil, la méthotrexate et les taxanes alors qu'elle améliore les effets de la doxorubicine et de la gemcitabine (El Hajj Diab *et al.*, 2018). Des essais cliniques menés sur les cancers de la vessie, du poumon et de l'œsophage et sur des sarcomes des tissus mous ont tous montré une amélioration du taux de survie et de la qualité de vie des patients ayant reçu un traitement combiné (Datta *et al.*, 2015b).

Une hyperthermie induite avec une dose thermique faible permet également d'induire une libération contrôlée de médicament à partir de nanoparticules thermosensibles ou une expression thermo-induite de gènes : c'est la thermo-modulation. L'encapsulation de médicaments dans des nanoparticules thermosensibles permet à la fois de limiter les effets secondaires systémiques induits par les agents cytotoxiques mais aussi de les protéger de la dégradation par l'organisme ou de modifier leur biodistribution (Grüll & Langereis, 2012; Bertrand *et al.*, 2014; Farr *et al.*, 2017; Guisasola *et al.*, 2018). De ce fait, ils sont transportés directement à la tumeur grâce aux mécanismes de transports passifs et actifs (cf. 2.2.5.). Une étude préclinique utilisant des NPMs contenant de la doxorubicine a montré que les souris traitées avec les NPMs contenant l'agent cytotoxique ont un volume tumoral stable pendant 5 jours alors que les souris des groupes contrôles (doxorubicine seule, NPMs vides soumises ou non au champ magnétique) ont toutes des volumes tumoraux croissants 5 jours après traitement (Guisasola *et al.*, 2018). Une autre étude a utilisé des liposomes thermosensibles contenant de la doxorubicine pour cibler les cellules de gliome C6 dans un modèle murin. Ils ont montré qu'après une injection intraveineuse des liposomes et une hyperthermie par radiofréquences, la concentration en doxorubicine dans le cerveau est 3,7 fois plus importante que pour des liposomes non-thermosensibles et 6,4 fois plus élevée qu'une injection de doxorubicine seule (Aoki *et al.*, 2004). L'hyperthermie peut également être utilisée pour la délivrance de médicament directement au niveau de la tumeur. Une approche consiste à utiliser l'augmentation de la température pour ouvrir la barrière hémato-encéphalique afin d'améliorer la distribution du médicament dans le cerveau. La combinaison de traitement d'hyperthermie aux ultrasons focalisés et de chimiothérapie a réduit le volume tumoral et a augmenté la survie

des animaux (Titsworth *et al.*, 2014). Enfin, l'hyperthermie modérée permet une activation thermo-induite de l'expression d'un gène et a fait l'objet de nombreuses études. La majorité a montré l'activation du promoteur Hsp70 par diverses méthodes comme l'expression d'un gène d'imagerie sous le contrôle de ce promoteur : la GFP dans la tumeur (Guilhon *et al.*, 2003), la Luciferase firefly dans la tumeur (Deckers *et al.*, 2009; Sandre *et al.*, 2017), dans les TAMs (Fortin *et al.*, 2015). D'autres études ont étudié l'expression du gène Hsp70 par qRT-PCR (Moros *et al.*, 2015) ou par l'expression de miRNA sous le contrôle du promoteur Hsp70 et dirigés contre un gène d'imagerie (Pinel *et al.*, 2018).

3. Le voir pour le croire : l'apport de l'imagerie en thérapie

Depuis les travaux pionniers de Röntgen (Röntgen, 1898), l'imagerie a pris une place essentielle en médecine y compris en oncologie. L'imagerie intervient tout au long de la prise en charge de la maladie notamment lors du dépistage, de l'évaluation de la réponse thérapeutique et du suivi de la maladie. Elle est également utilisée pour guider les gestes des praticiens lors de biopsies ou d'ablation tumorale. L'imagerie moléculaire ambitionne d'aller encore plus loin en fournissant aux cliniciens des images attestant de la présence de différentes populations cellulaires, protéines, activités enzymatiques au niveau de la tumeur et d'en déterminer les concentrations locales. Il existe actuellement de nombreuses modalités d'imagerie médicale avec des caractéristiques spécifiques mais complémentaires. Ainsi, on différencie les méthodes résolutive (la résolution spatiale est une mesure de la finesse des détails d'une image pour une dimension donnée), comme l'IRM, l'échographie et la tomodensitométrie X, des méthodes très sensibles (la sensibilité est la quantité minimale détectable), comme l'imagerie nucléaire et l'imagerie optique (Figure 18).

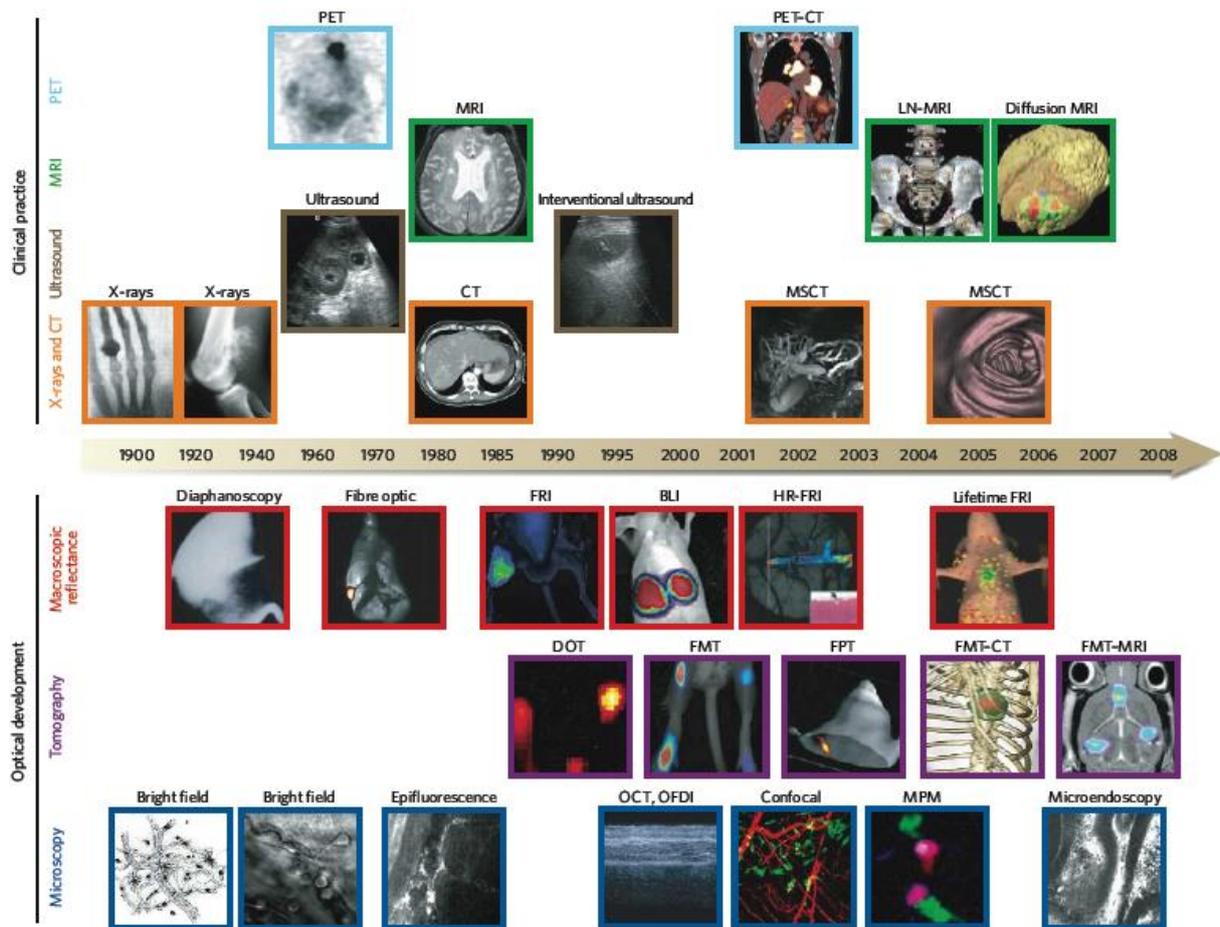


Figure 18 : Modalités d'imagerie utilisées en oncologie (Weissleder & Pittet, 2008)

Aucune méthode d'imagerie n'est à la fois résolutive et sensible. Il est souvent nécessaire de coupler les modalités. Par exemple, la tomographie par émission de positons (TEP) extrêmement sensible est systématiquement associée à une imagerie anatomique (généralement la tomodensitométrie X). Le choix de la modalité d'imagerie varie en fonction de la taille de l'être vivant imagé. Chez l'homme et les grands mammifères, les modalités résolutives utilisées sont essentiellement l'IRM, la tomodensitométrie X et l'échographie et la sensibilité est obtenue par imagerie nucléaire. Chez la souris, les modalités d'imageries résolutives utilisées sont les mêmes que chez l'homme mais avec des appareils adaptés (IRM à haut champ magnétique et tunnel de petit diamètre, micro-scanner, sonde échographique à fréquence élevée). Pour la sensibilité, les équipements d'imagerie radioactive (micro-TEP et micro-SPECT) sont rares, leur résolution est insuffisante au regard de la taille de la souris et leur usage est très onéreux. De ce fait, l'imagerie optique (bioluminescence, fluorescence) est largement utilisée (Tableau 2) (Weissleder & Pittet, 2008).

	Anglais		Français		Caractéristiques		
	Sigle	Nom complet	Sigle	Nom complet	Résolution	Profondeur	Utilisation clinique et/ou préclinique
Imageries résolutives	MRI	Magnetic Resonance Imaging	IRM	Imagerie de Résonance Magnétique	0,5 à 2 mm	Sans limite	Clinique et préclinique
	US	Ultrasounds	US	Ultrasons	50 µm	Quelques centimètres	Clinique et préclinique
	X-ray / CT	Radiography / Computerized tomography	Rayons X / TDM	Radiographie (2D) / Tomodensitométrie X (3D)	50 µm	Sans limite	Clinique et préclinique
Imageries sensibles	PET	Positron-emission tomography	TEP	Tomographie par émission de positons	1 à 2 mm	Sans limite	Principalement en clinique, rare en préclinique
	SPECT	Single photon emission computerized tomography	TEMP	Tomographie d'émission monophotonique	1 à 2 mm	Sans limite	Principalement en clinique, rare en préclinique
	BLI	Bioluminescence imaging	BLI	Imagerie de bioluminescence	Plusieurs millimètres	< 10 cm	Préclinique
	FRI	Fluorescence reflectance imaging	FRI	Imagerie de fluorescence par réflexion	2 à 3 mm	< 1 cm	Rare en clinique, principalement en préclinique
	FMT	Fluorescence-mediated tomography	FMT	Tomographie de fluorescence	1 mm	< 10 cm	Préclinique

Tableau 2 : Modalités d'imageries principalement utilisées en clinique et lors des études précliniques (selon (Weissleder & Pittet, 2008)).

L'ambition de l'imagerie est non seulement de fournir des images relatives à la pathologie mais aussi de l'ensemble des paramètres nécessaires à la thérapie. Dans le contexte de cette thèse dédiée aux thermothérapies, l'imagerie a été utilisée pour localiser la tumeur et l'effectuer la thermothérapie (point focal des ultrasons, localisation des NPMs), suivre l'évolution de l'hyperthermie, déterminer ses effets sur la viabilité de la tumeur et la réaction du μE . L'inventaire exhaustif des modalités d'imagerie disponibles et potentiellement utilisables en oncologie dépasse le contexte de ce mémoire mais ce chapitre détaille les modalités d'imagerie dans le cadre de ce projet de thèse (l'IRM et l'imagerie optique).

3.1. L'imagerie par résonance magnétique

L'IRM est basée sur le principe de la résonance magnétique nucléaire (RMN). Dans les systèmes biologiques, l'atome d'hydrogène (proton) présent dans la molécule d'eau est le plus abondant. Le principe de la RMN est caractérisé par trois étapes : la polarisation, l'excitation et la relaxation. La polarisation résulte d'une orientation préférentielle des moments magnétiques des protons lorsqu'ils sont soumis à une induction magnétique (appelée B_0) qui est statique, homogène et suffisamment intense (0,5 à 15 Tesla) pour aimanter légèrement le système de spins nucléaires (c'est-à-dire que la population de spins orientés dans le sens du champ B_0 est légèrement supérieure à celle dans le sens opposé). L'excitation correspond à la perturbation de

cet état d'équilibre magnétique par un champ magnétique B_1 (perpendiculaire à B_0) qui oscille à une fréquence particulière, appelée « fréquence de résonance », et varie avec le champ magnétique (par exemple, 63,9 MHz pour un champ B_0 de 1,5 T comme sur les IRM médicaux les plus couramment utilisés en clinique). Cette impulsion radiofréquence permet de faire basculer l'aimantation initiale vers une nouvelle direction (d'angle et de direction ajustables). La relaxation a lieu après l'arrêt de l'impulsion de champ magnétique B_1 . L'aimantation relaxe alors vers son état d'équilibre initial suivant un mouvement hélicoïdal (appelé déclin de précession libre) suivant deux temps de relaxation différents (T_1 pour la composante de l'aimantation alignée suivant B_0 et T_2 ou T_2^* pour la composante située dans le plan transverse à B_0) (Figure 19), Seule l'aimantation transverse est détectable à l'aide d'une ou plusieurs antennes de réception. Ce signal temporel enregistré et numérisé est le signal RMN.

Après transformation de Fourier de ce signal, un spectre est obtenu dont chaque pic reflète la quantité de métabolites présents dans le tissu. En utilisant des gradients de champ magnétique additionnels suivant 3 axes orthogonaux, il est possible de forcer les aimantations à osciller à des fréquences différentes en fonction de leur position. La transformée de Fourier permet alors de créer un spectre dont les composantes fréquentielles représentent les quantités de signal à chaque position. Suivant les séquences d'acquisition utilisées, il est ainsi possible de réaliser un profil (1D), une image (2D) ou un volume (3D), avec une position et une orientation ajustables. Les contrastes observés sur les images produites dépendent des paramètres de ces séquences (temps d'échos TE, temps de lecture TR et angle de bascule) et des caractéristiques intrinsèques du tissu imagé (T_1 , T_2 , quantité d'eau et de lipides).

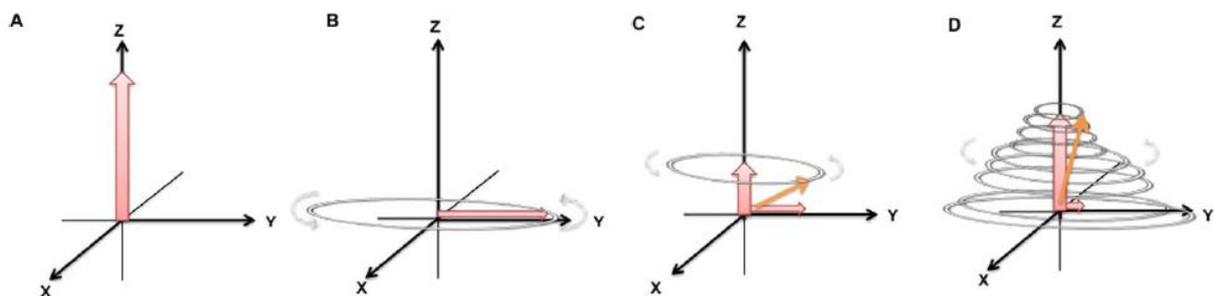


Figure 19 : Représentation de l'aimantation des noyaux après l'application du champ magnétique B_1 . **A-** La polarisation : les moments magnétiques sont alignés avec une impulsion magnétique constante (B_0). **B-** L'excitation : lors de l'application du champ magnétique oscillant B_1 , l'aimantation bascule autour de B_1 ce qui se traduit par une réduction de l'aimantation longitudinale et une augmentation de l'aimantation transverse. **C-** La relaxation : A l'arrêt du champ magnétique B_1 , l'aimantation transversale diminue et l'aimantation longitudinale se rétablit. **D-** La récupération de l'aimantation longitudinale est

appelée temps de relaxation T_1 ou « temps de relaxation spin-réseau » et la perte de l'aimantation transversale est appelée temps de relaxation T_2 ou « temps de relaxation spin-spin ». Selon (Currie *et al.*, 2013).

L'IRM est une méthode non invasive et non ionisante. Elle possède une excellente résolution spatiale (0,5 – 2 mm), une très bonne sensibilité de contraste pour les tissus mous et n'a pas de limite de profondeur. Dans ce projet, l'IRM anatomique a été utilisée pour localiser la tumeur et l'IRM de température pour positionner le point focal des ultrasons au centre de la tumeur et contrôler le dépôt de température. L'IRM de température peut être couplée à l'ensemble des thérapies précédemment décrites, excepté l'hyperthermie magnétique. En effet, l'utilisation de NPMs en grandes concentrations altère le signal IRM à cause de leur caractère superparamagnétique qui perturbe fortement les lignes de champ magnétique, ce qui rend difficile l'obtention d'une image de bonne qualité.

L'IRM de température permet de mesurer les variations de la température d'un tissu à partir d'une température corporelle de base. Ces variations peuvent être mesurées par différentes méthodes, toutefois, la mesure des modifications de la phase du signal RMN est plus fiable, précise et reproductible que les autres méthodes (Figure 20). Cette méthode est basée sur les changements de la fréquence de résonance des protons de l'eau (méthode PRF pour Proton Resonance Frequency), ce qui se traduit par une variation temporelle de la phase du signal IRM en chaque pixel soumis à une variation de température. Les variations de la PRF sont proportionnelles à la variation de la température et pratiquement indépendantes de la nature du tissu. Pour cartographier par IRM la température locale atteinte pendant le traitement, on réalise une acquisition continue et répétitive d'images de la même région. Les variations de phase en chaque pixel sont converties en temps réel en cartes de températures qui sont superposées aux images anatomiques et visualisées dans un logiciel d'affichage. Ceci permet de monitorer l'évolution de la température dans la région ciblée au cours du temps. A partir de ces cartes de température, il est également possible de calculer en chaque pixel de l'image la dose thermique cumulée en intégrant l'évolution de la température au cours du temps. De plus, cette thermométrie en temps réel permet d'ajuster automatiquement la puissance de chauffage délivrée au tissu à l'aide d'une boucle de rétroaction dynamique. L'utilisateur définit au préalable une courbe temps-température souhaitée et un algorithme ajuste en temps réel la puissance émise à partir des images de température obtenues pour forcer la température dans la région cible à suivre la consigne. En fonction de la dose thermique résultante, il est possible

d'induire une thermoablation irréversible correspondant à une dose thermique élevée ou une hyperthermie modérée non destructive en sélectionnant une dose thermique plus faible (Grenier *et al.*, 2008; Saccomandi *et al.*, 2014; Wang, 2017).

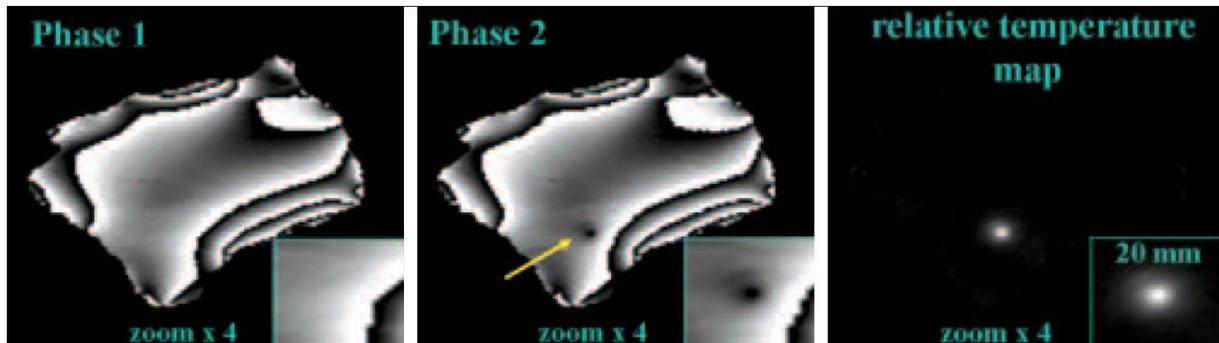


Figure 20 : Images de phase d'une IRM de température. La cartographie de phase à l'état basal se modifie après application d'un tir ultrasonore dans la zone chauffée. La carte de température relative (image de droite) est obtenue par la soustraction entre les deux images de phase (Phase 2 – Phase 1) et multipliée par un facteur qui intègre la variation de fréquence du signal IRM avec la température (Grenier *et al.*, 2008).

3.2. L'imagerie de fluorescence

L'imagerie de fluorescence est très utilisée lors des études précliniques chez la souris. Dans notre projet, elle a été utilisée pour suivre *in vitro* et *in vivo* la distribution des NPMs de manière non invasive pendant toute la durée du traitement. La fluorescence est un processus dynamique basé sur l'excitation de molécules (fluorophores) qui, pour revenir à leur état d'énergie initial, libèrent des photons (émission de fluorescence). C'est une technique très sensible, peu coûteuse, facile à mettre en œuvre et qui permet des mesures répétées. Par contre, elle souffre de limitations majeures liées à l'absorption et la diffusion des photons et à l'auto-fluorescence des tissus. Lorsque le fluorophore se situe dans les tissus profonds (quelques millimètres), l'absorption de la lumière, en particulier par l'hémoglobine et la mélanine, limite la pénétration des photons et affecte à la fois l'excitation du fluorophore et l'émission. Lors des études *in vivo*, l'absorption peut être réduite en utilisant des fluorophores dont les longueurs d'onde d'émission et d'excitation sont comprises entre 650 et 900 nm (fenêtre du proche infrarouge) et des animaux albinos (sans mélanine) et dépilés (Figure 21). La diffusion des photons est à l'origine d'un flou dès que l'épaisseur de l'échantillon augmente, ce phénomène est à l'origine de la faible résolution de l'imagerie de fluorescence. Enfin, de nombreux composés de l'organisme (pelage, mitochondries, lysosomes) sont fluorescents et sont à

l'origine d'un important bruit de fond (auto-fluorescence). L'auto-fluorescence est moindre dans la fenêtre du proche infrarouge (Graves *et al.*, 2004; Zelmer & Ward, 2013).

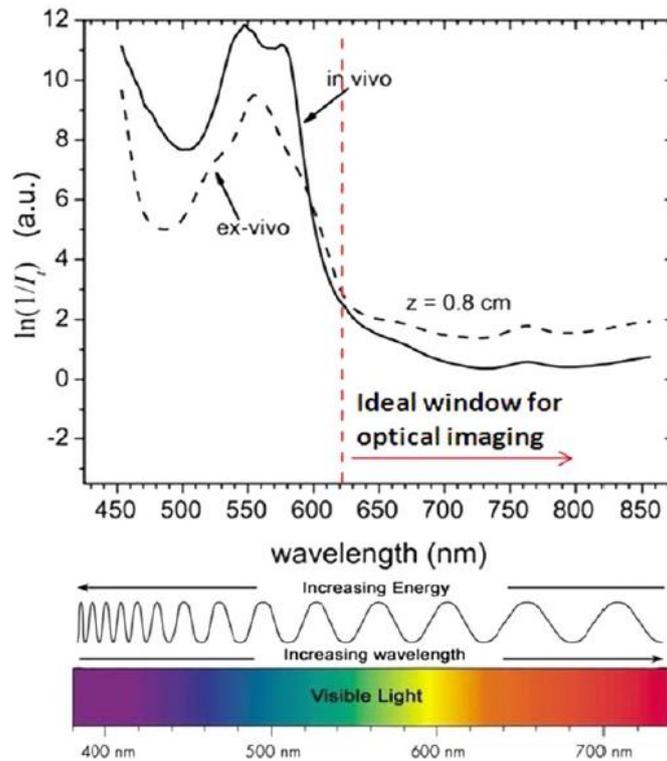


Figure 21 : Spectre d'atténuation de la lumière transmise à travers les tissus de la souris le long de l'axe dorso-ventral (Zelmer & Ward, 2013).

L'imagerie de fluorescence par réflexion (FRI) permet d'imager un échantillon en 2 dimensions. Dans la majorité des systèmes, la source lumineuse et l'appareil de détection se situent du même côté par rapport à l'échantillon : on parle d'épi-illumination. Lors de la mesure de la fluorescence, l'échantillon est éclairé par la source lumineuse dont le spectre est spécifique à l'excitation du fluorophore d'intérêt. La source lumineuse peut être un laser d'une longueur d'onde spécifique ou une source lumineuse à large spectre soumise à un filtre de bandes passantes afin d'obtenir le spectre de longueur d'onde approprié. Les photons d'excitation pénètrent ensuite dans l'échantillon générant ainsi des photons d'émission qui se propagent à la surface de l'échantillon selon les propriétés d'absorption et de diffusion du tissu. Un filtre situé devant la caméra de détection permet de laisser passer uniquement les photons dont la longueur d'onde correspond à celle du spectre d'émission du fluorophore (Figure 22) (Graves *et al.*, 2004; Zelmer & Ward, 2013).

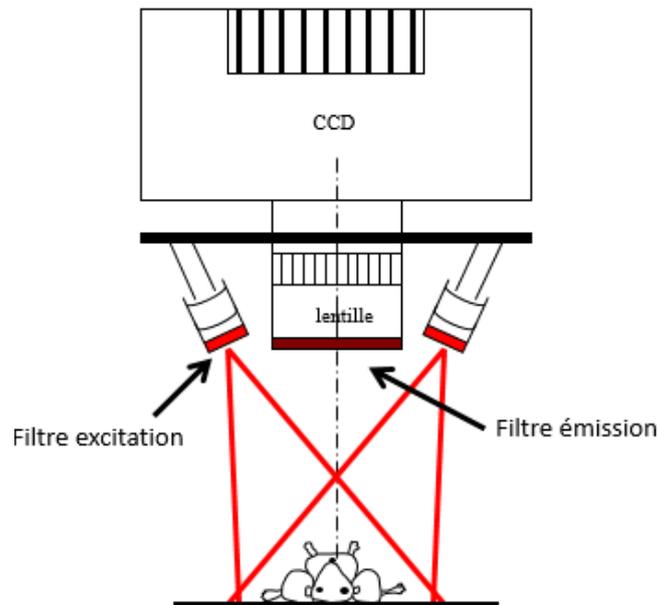


Figure 22 : Configuration d'un système d'imagerie de fluorescence par réflexion. L'échantillon est éclairé par une source lumineuse dont le spectre est spécifique du fluorophore d'intérêt. Les photons émis par le fluorophore excité dans l'échantillon sont ensuite mesurés avec une caméra focalisée sur la surface du sujet, en utilisant un filtre spectral correspondant aux longueurs d'onde d'émission du fluorophore d'intérêt.

La FRI est dite semi-quantitative. Elle permet de quantifier et de comparer les signaux de fluorescence obtenus dans des conditions de mesure identiques (profondeur du fluorophore, géométrie de la mesure).

3.3. L'imagerie infrarouge

Une caméra infrarouge, thermique ou pyromètre capte un rayonnement infrarouge et le converti en signal électronique. En fonction de la température, le rayonnement infrarouge varie. Le signal électronique est ensuite converti en une image de fausses couleurs en fonction de l'intensité du rayonnement infrarouge, qui est converti en température moyennant une hypothèse sur le coefficient d'émissivité thermique du matériau. La caméra infrarouge est moins utilisée que les autres modalités d'imagerie. Toutefois, c'est la seule méthode d'imagerie adaptée à la mesure non invasive de la température lors d'une hyperthermie magnétique. Elle est capable de mesurer la température sans contact avec la zone chauffée et peut donc être placée au-dessus de la bobine en dehors du champ magnétique. Cependant, elle possède une forte

limitation en profondeur (1 à 2 μm) et peut donc être utilisée uniquement pour détecter les températures de surface.

3.4. L'imagerie de bioluminescence

La bioluminescence est définie comme une production et une émission de photons par un être vivant. Dans la nature, de nombreux organismes vivants, tels que les bactéries, les insectes, les mollusques, les vers et les champignons utilisent ce phénomène pour attirer leurs proies, comme mécanisme de défense ou moyen de communication. La bioluminescence est une réaction enzymatique qui génère des photons par oxydation catalytique d'un substrat (luciférine) par une enzyme (luciférase). Il existe de nombreux couples luciférase/luciférine dans la nature et quelques-uns ont été adapté à l'imagerie de bioluminescence (BLI) (Tableau 3).

luciférase	organisme	substrat	cofacteur(s)	taille (kDa)	longueur d'onde d'émission (nm)
North American Firefly (FLuc)	<i>Photinus pyralis</i>	D-luciférine	ATP and Mg	61	560
Click Beetle	<i>Pyrophorus plagiophthalmus</i>	D-luciférine	ATP and Mg	64	~600
Renilla (RLuc)	<i>Renilla reniformis</i>	Coelenterazine	N/A	36	480
Renilla Mutant (RLuc8)	<i>Renilla reniformis</i>	Coelenterazine	N/A	36	535
Gussia (GLuc)	<i>Gussia princeps</i>	Coelenterazine	N/A	20	470
OLuc	<i>Oplophorus gracilirostris</i>	Coelenterazine	N/A	19	460
NanoLuc (NLuc)	<i>Oplophorus gracilirostris</i>	Furimazine	N/A	19	460

Tableau 3 : Les luciférases. Nom des luciférases communes avec leur origine, leur substrat, leurs cofacteurs, leur taille et la longueur d'onde maximale d'émission (England *et al.*, 2016)

Les cellules ou les animaux sont génétiquement modifiés pour exprimer la luciférase. Lors de l'imagerie, le substrat est ajouté dans le milieu ou injecté à l'animal. Pour la mesure du signal BLI, l'échantillon est placé dans une boîte noire étanche à la lumière et la mesure est effectuée à l'aide d'une caméra CCD placée au-dessus de l'échantillon (Figure 23). Son intensité dépend de nombreux facteurs tels que le niveau d'expression de l'enzyme, la profondeur ainsi que la présence et la quantité du substrat, de l'ATP, de l'oxygène et des cofacteurs. Comme pour la FRI, le signal BLI est affecté par l'absorption et la diffusion des photons (profondeur), par contre, l'auto-bioluminescence est nulle ce qui génère un excellent rapport signal sur bruit et donc une très grande sensibilité. La quantification est également relative en BLI (Close *et al.*, 2011; Paley & Prescher, 2014; Yao *et al.*, 2018).

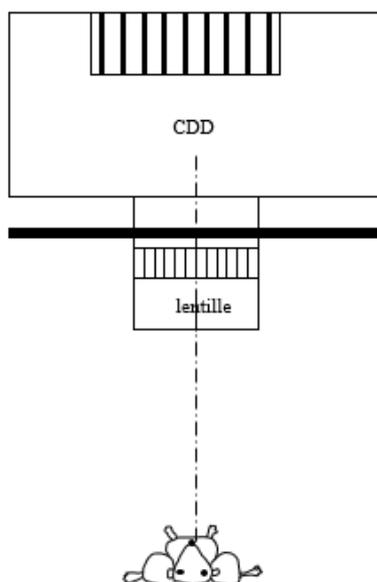


Figure 23 : Configuration d'un système d'imagerie de bioluminescence. Les photons émis par l'échantillon bioluminescent sont captés par une caméra située au-dessus de l'échantillon et focalisée sur la surface du sujet.

Les applications de BLI sont nombreuses. Dans ce projet, elle a été utilisée à la fois comme témoin de viabilité et comme témoin d'hyperthermie modérée.

Le signal BLI global dépend de nombreux critères tels que (1) le nombre de cellules, (2) la viabilité cellulaire qui joue un rôle sur la biosynthèse de l'enzyme (transcription et traduction) et donc sur le niveau d'expression de la luciférase et (3) l'activité enzymatique qui elle-même dépend de la quantité de substrat, d'oxygène et de différents cofacteurs. Certaines luciférases, comme la luciférase firefly, ont également besoin d'ATP pour oxyder la luciférine. Lors de la croissance tumorale, le signal BLI augmente avec la prolifération cellulaire alors qu'une diminution brutale indique une diminution de la viabilité (Rehemtulla *et al.*, 2000).

En plaçant l'expression de la luciférase sous le contrôle du promoteur thermo-inductible Hsp70, le signal BLI devient un marqueur de l'hyperthermie modérée. L'expression est induite par un choc thermique aussi bien *in vitro* sur des cultures cellulaires (Eker *et al.*, 2011) qu'*in vivo* chez l'animal (Deckers *et al.*, 2009) ou dans les tumeurs (Pinel *et al.*, 2018). Si la dose thermique déposée est insuffisante, le promoteur thermosensible n'est pas activé et aucun signal BLI n'est détecté. Pour des chauffages intermédiaires, l'expression de la luciférase ne débute qu'à des températures supérieures à 42 °C et est corrélée linéairement avec la dose thermique (Deckers *et al.*, 2012; Sandre *et al.*, 2017). Enfin, si la dose thermique est trop importante, elle induit la mort cellulaire et donc entraîne une absence de signal.

OBJECTIF DE LA THESE

Les thérapies anticancéreuses ont beaucoup évolué ces dernières années et leur mise en œuvre a permis d'augmenter significativement la qualité et la durée de vie des patients. Cependant, pour certains cancers comme le glioblastome et le cancer du pancréas, les options thérapeutiques sont inefficaces et le taux de survie des patients est très faible (moins de 5 % à 5 ans) et l'espérance de vie très courte (14 à 18 mois pour le glioblastome). Pour d'autres cancers, les thérapies actuelles bien qu'efficaces, doivent encore être améliorées notamment pour limiter les récurrences et le développement de métastases. Dans la perspective d'une amélioration constante des traitements anticancéreux, de nouveaux traitements ou de nouvelles cibles doivent et continuent d'être développés. Par ailleurs, l'efficacité des traitements actuels peut probablement être améliorée en particulier en augmentant la dose thérapeutique délivrée au niveau de la tumeur tout en réduisant les effets secondaires. Dans ce contexte, les thérapies peuvent contribuer à l'amélioration des traitements anticancéreux. L'objectif de cette thèse est de montrer que la thermoablation tumorale peut être combinée à une hyperthermie modérée du μE compatible avec la libération locale de médicament à partir de nanoparticules thermosensibles ou l'induction thermo-induite de gènes suicides, de protéines d'intérêt ou de mi-RNA. Notre travail de thèse vise à établir, par imagerie moléculaire sur des cellules en culture *in vitro* et sur des modèles murins *in vivo*, la preuve de concept de cette stratégie en utilisant comme outil de chauffage l'hyperthermie magnétique ou les ultrasons focalisés de haute intensité (HIFU) guidés par IRM (MRgHIFU).

Pour la partie hyperthermie magnétique, l'efficacité de trois NPMs possédant des caractéristiques physico-chimiques différentes est évaluée afin de déterminer les conditions idéales pour induire la mort des cellules cancéreuses lorsque les NPMs ont une localisation intracellulaire ou lorsqu'elles ont une localisation extracellulaire. L'hyperthermie magnétique est déjà utilisée en clinique pour le traitement du glioblastome en combinaison avec de la radiothérapie (Maier-Hauff *et al.*, 2007, 2011). Lors de ce traitement, les NPMs sont injectées par voie intratumorale, leur localisation est majoritairement extracellulaire. Ce travail de thèse permet d'apporter des indications pour améliorer ce traitement notamment avec l'utilisation de NPMs possédant un pouvoir chauffant plus élevé que celui des NPMs utilisées en clinique afin d'induire la mort des cellules cancéreuses directement par la chaleur (thermoablation) au lieu de potentialiser l'effet de la radiothérapie (hyperthermie modérée). L'hyperthermie magnétique induite par des NPMs intracellulaires possède des avantages par rapport à celle induite par des

NPMs extracellulaires, comme la possibilité de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses grâce au ciblage actif tout en limitant les effets secondaires.

Concernant les MRgHIFU, cette technique est utilisée en clinique pour le traitement du fibrome utérin et des tremblements essentiels. En cancérologie, elle permet également de traiter les métastases osseuses douloureuses. Cependant, le potentiel de cette technique n'est pas encore totalement mis à profit pour la thérapie anticancéreuse. La possibilité d'utiliser une IRM de température pour réguler la dose thermique délivrée au niveau de la tumeur est un avantage considérable. De plus, cette technique est totalement non invasive contrairement aux autres modalités de thermothérapie. Ce travail de thèse consiste à apporter de nouvelles connaissances sur cette technique pour l'induction d'une thermoablation tumorale, d'une hyperthermie modérée tumorale et la combinaison d'une thermoablation tumorale et d'une hyperthermie modérée du μE .

L'efficacité de ces méthodes de thermothérapie est évaluée par BLI grâce à l'expression constitutive d'une luciférase pour déterminer la viabilité cellulaire ou à l'expression thermo-inductible d'une luciférase pour évaluer l'hyperthermie modérée. La BLI peut être transposée des études *in vitro* vers les études *in vivo* donc des systèmes biologiques identiques ont été utilisés dans l'ensemble des études.

MATERIELS ET METHODES

1. Synthèses des nanoparticules magnétiques

1.1. IONPs-Tat et IONPs-PEG

1.1.1. Réactifs et produits

Dénomination	Formule chimie / Abréviation	Fournisseur
Chlorure ferreux tétra-hydraté	FeCl ₂ ·4H ₂ O	Sigma Aldrich
Chlorure ferrique hexa-hydraté	FeCl ₃ ·6H ₂ O	
Ammoniaque	NH ₄ OH	
Acide nitrique	HNO ₃	
Acide 2-aminoéthylphosphonique	AEP	
Thio-PEG	mPEG-SH	
Diméthylsulfoxyde	DMSO	
Acétate d'éthyle	C ₄ H ₈ O ₂	
Nitrate de fer (III) nano-hydraté	Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	
Diéthylène glycol	DEG	
Hydroxyde de sodium	NaOH	
Acétone	C ₃ H ₆ O	VWR chemicals
Ethanol	C ₂ H ₅ OH	
4-maléimidobutyrate de N-Succinimidyle	GMBS	TCI
Membrane de dialyse (3,5 kDa)	/	Spectrum
Dihydrogénophosphate de potassium	KH ₂ PO ₄	Prolabo
Tris(hydroxyméthyl)-méthylamine	Tris	Trizma
Dy700-NHS ester	Dy700	Dyomics

Tableau 4 : Réactifs et produits nécessaires à la synthèse des IONPs-Tat et IONPs-PEG

1.1.2. Synthèse des IONPs

Les IONPs (iron oxide nanoparticles) ont été synthétisées selon le protocole modifié de D. Caruntu (Caruntu *et al.*, 2004). Une masse de 1,082 g (4 mmol) de chlorure ferrique hexahydraté et une masse de 0,398 g (2 mmol) de chlorure ferreux tétra-hydraté sont dissous dans 80 mL de DEG préalablement dégazé. Séparément, 0,64 g (16 mmol) d'hydroxyde de sodium sont dissous dans 40 mL de DEG préalablement dégazé. Après dissolution, les deux solutions sont mélangées, 1 mL d'eau MilliQ™ (conductivité de 18 MΩ/cm) est ajouté avant de chauffer à 220 °C sous reflux ce qui entraîne un changement de couleur du vert au noir. Après 2 heures, la dispersion obtenue est refroidie à température ambiante et sédimentée magnétiquement. Les nanoparticules sont lavées trois fois avec un mélange d'éthanol et d'acétate d'éthyle (1 :1, v/v), puis lavées avec une solution d'acide nitrique à 10 %. Elles sont ensuite oxydées à 80 °C pendant 45 minutes avec 8,25 g de nitrate de fer (III) nano-hydraté et lavées à nouveau avec une solution d'acide nitrique à 10 %, suivi de deux lavages à l'acétone et deux lavages à l'éther diéthylique avant d'être re-suspendues dans de l'eau MilliQ™.

1.1.3. Modification du PEG-6000kD-SH avec l'ancre phosphonate

L'AEP réagi avec du GMBS dans une solution de tampon de phosphate à pH 7. La température de la solution est maintenue basse avec un bain de glace afin d'éviter l'hydrolyse trop rapide de l'ester. Après 24 heures, le mPEG-SH (dont les ponts disulfures éventuels ont été préalablement réduits) est introduit et laissé à incuber 24 heures. Le processus de nettoyage consiste à dialyser la solution avec une membrane qui autorise le passage des protéines d'une taille inférieure à 1 kDa pendant 12 heures et dans 3,5 L d'eau pure. La solution est ensuite lyophilisée. Par cette méthode, 56 mg de PEG modifiés avec un groupe d'ancrage acide phosphonique sont obtenus (rendement de 93 %).

1.1.4. Post modification de l'ELP₄₀₋₆₀-Tat avec l'ancre phosphonate

L'AEP est dissout dans 40 mL de tampon phosphaté à pH 7 dans un ballon à trois cols, refroidi avec un bain de glace. Le tampon est d'abord dégazé pendant 30 minutes avant dissolution de l'AEP sous agitation magnétique. Le dégazage et l'agitation sont maintenus pendant toute la réaction. Le GMBS préalablement dissous dans 0,5 mL de DMSO est ajouté

pour réagir pendant 24 heures. L'ELP est ensuite ajouté et laissé à réagir pendant 24 heures. La solution est purifiée par dialyse sur une membrane de 3,5 kDa contre 5 L d'eau déionisée changée trois fois toutes les 12 heures.

1.1.5. Fonctionnalisation du fluorophore proche infrarouge Dy700 avec l'ancre phosphonate

Via sa fonction amine, 1,5 équivalent d'AEP est mis à réagir avec 1 équivalent d'ester de N-hydroxysuccinimide (NHS) du fluorophore Dy700 pendant 24 heures dans le DMSO (1 g/L).

1.1.6. Greffage sur les IONPs du fluorophore proche infrarouge et des molécules préalablement fonctionnalisées avec l'ancre phosphonate

Une fois l'ancre phosphonate introduite en bout de chaîne du Dy700, du PEG ou de l'ELP, leur greffage sur l'oxyde de fer est effectué de manière analogue, par incubation des molécules avec les NPMs acides (pH~2,5). Le Dy700-AEP en solution dans le DMSO est introduit en premier (0,45 mL à 1 g/L) dans 2 mL de suspension acide d'IONPs (35 g/L en oxyde de fer) correspondant à 20 molécules/NPM. Après application d'ultrasons pendant 5 minutes pour maintenir les NPMs dispersées, la suspension est laissée sous agitation pendant 1 heure. Les macromolécules (PEG-AEP ou Tat-AEP) sont ensuite introduites dans la dispersion (2,8 mL à 10 g/L) goutte à goutte et sous ultrasons (sur un bain de glace pour éviter l'évaporation). Après 2 heures d'incubation, le pH est neutralisé par ajout d'ammoniaque dilué. La suspension est alors répartie en deux tubes qui sont centrifugés deux fois 30 minutes à 8 500 rpm pour laver les molécules non greffées. Les culots sont redispersés dans un tampon Tris 50 mM à pH 7, soniqués puis les suspensions sont caractérisées par différentes méthodes pour s'assurer du greffage (diffusion dynamique de la lumière, spectroscopie UV, visible et infrarouge, thermogravimétrie, fluorimétrie...).

Les NPMs obtenues grâce à cette synthèse seront nommées pour la suite de ce manuscrit IONPs-PEG, pour les IONPs greffées avec du PEG et du Dy700, et IONPs-Tat, pour les IONPs greffées avec l'ELP₄₀₋₆₀-Tat (Figure 24) et du Dy700.

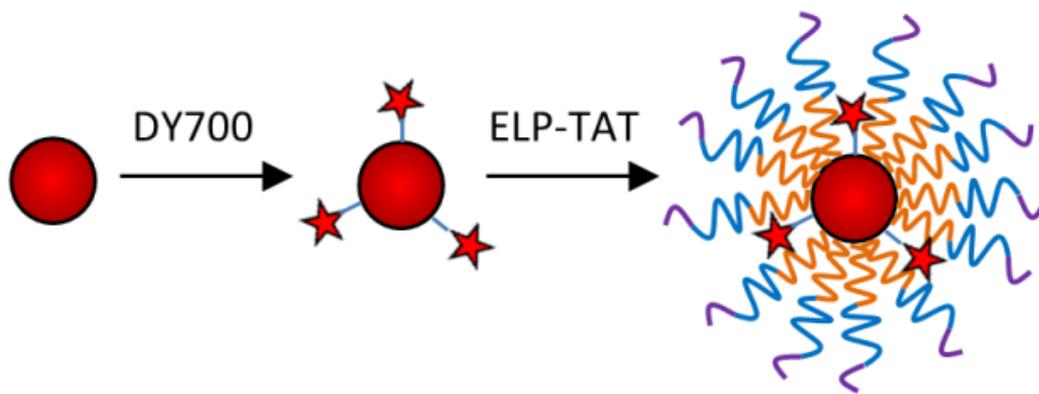


Figure 24 : Schéma des nanoparticules IONPs-Tat. Elles sont composées d'un cœur d'oxyde de fer puis décorées avec un fluorophore, le Dy700 pour permettre leur détection lors des études *in vitro* et *in vivo*, et le peptide ELP₄₀₋₆₀-Tat, permettant d'améliorer l'internalisation des IONPs-Tat dans les cellules.

1.2. SPC et SPC-protamine

1.2.1. Réactifs et produits

Dénomination	Formule chimie / Abréviation	Fournisseur
Chlorure ferrique hexa-hydraté	FeCl ₃ ·6H ₂ O	Sigma Aldrich
Chlorure ferreux tétra-hydraté	FeCl ₂ ·4H ₂ O	
Acétone	C ₃ H ₆ O	
Acide stéarique	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	
Orthosilicate de tétraéthyle	TEOS	
Sodium dodécylsulfate	SDS	
(3-mercaptopropyl)triéthoxysilane	MPS	
Protamine	/	
Acide chlorhydrique	HCl	Scharlau
Ammoniaque	NH ₄ OH	
Acide nitrique	HNO ₃	
Nitrate de fer	Fe(NO ₃) ₃	
Ethanol	C ₂ H ₅ OH	
Cyclohexane	C ₆ H ₁₂	
Diméthylsulfoxyde anhydre	DMSO	Thermo Fisher
Cyanine 3-maléimide	Cy 3	Lumiprobe
Cyanine 7.5-maléimide	Cy 7.5	

Tableau 5 : Réactifs et produits nécessaires à la synthèse des SPC et SPC-protamine

1.2.2. Synthèse des particules de maghémite

Dans un bêcher de 5 L, une masse de 85,4 g de chlorure ferrique hexa-hydraté (0,316 mol) est dissoute dans 3,5 L d'eau. Après dissolution, 31,41 g de chlorure ferreux tétra-hydraté (0,158 mol) dissous dans 170 mL d'acide chlorhydrique à 1,5 M sont ajoutés (rapport stœchiométrique initial Fe²⁺/Fe³⁺ = 0,5). Sous forte agitation mécanique, 300 mL d'une solution d'ammoniaque (28-30 %, m/m) sont ajoutés rapidement puis le milieu réactionnel est laissé

pendant 15 minutes sous agitation. Le flocculat de particules de magnétite est décanté grâce à un aimant pour éliminer le surnageant. Après 2 lavages à l'eau, 200 mL d'acide nitrique à 2 M sont ajoutés et laissés sous agitation pendant 15 minutes afin d'oxyder la surface des particules. Après décantation magnétique, le surnageant est éliminé puis 600 mL d'une solution de nitrate de fer à 0,33 M sont ajoutés pour oxyder en maghémite le cœur des particules. Le milieu réactionnel est porté à ébullition pendant 30 minutes. Le surnageant est de nouveau retiré après décantation des flocculats magnétiques et 200 mL d'acide nitrique à 2 M sont alors ajoutés. Les flocculats de particules sont lavés 3 fois par décantation magnétique avec 400 mL d'acétone pour retirer l'excès d'acide. Le flocculat est peptisé (dispersion stable des particules dans l'eau) par addition de 200 mL d'eau ultrapure (18 M Ω). Après élimination de l'excès d'acétone à l'évaporateur rotatif, le volume de particules est ramené à 1 L avec de l'eau.

1.2.3. Modification de surface des particules de maghémite avec de l'acide stéarique

Une solution d'ammoniaque concentrée (30 % m/m) est ajoutée goutte à goutte dans 250 mL de particules ($C_m = 26,4$ g/L en maghémite) jusqu'à la déstabilisation du sol. Après élimination du surnageant, les particules sont lavées 2 fois à l'eau puis 200 mL d'eau et 36,5 g d'acide stéarique, préalablement fondus à 80 °C, sont ajoutés. Sous agitation à 80 °C, des gouttelettes de particules hydrophobes se forment en quelques minutes. Après 20 minutes d'agitation, les deux phases sont séparées magnétiquement et la phase aqueuse est éliminée. Quatre lavages à 80 °C sont effectués avec de l'éthanol pour retirer l'excès d'acide stéarique. Un lavage à l'acétone est réalisé puis les particules sont séchées sous flux d'azote. Les particules sont peptisées dans 25 mL de cyclohexane.

1.2.4. Formation des supraparticules magnétiques

Dans une cellule de rosette, 5 mL de particules de maghémite (50 g/L) sont ajoutés à 20 mL de SDS à 50 mM. Le mélange est émulsifié avec un sonicateur Vibra-cell™ 75042 (Bioblock Scientific) ($t = 20$ minutes; amplitude : 40 %, pulse : ON 2 secondes, OFF 3 secondes). La sonication est effectuée dans un bain de glace afin d'éviter l'évaporation du cyclohexane. La solution est ensuite transférée dans un ballon bicol. Le ballon est immergé

dans un bain d'huile à 75 °C avec un léger flux d'azote sur la surface de la solution pendant 2 heures, de sorte à évacuer le cyclohexane vaporisé. A la fin de cette étape, les particules de maghémite se retrouvent sous la forme de clusters auto-assemblés appelés les supraparticules magnétiques.

1.2.5. Formation d'une pré-couche de silice en milieu aqueux

Un volume de 30 mL d'eau est ajouté à 250 mg (en Fe₂O₃) de supraparticules puis 2,5 mL d'ammoniaque (30% m/m) et 250 µL de TEOS sont ajoutés. La solution est laissée à réagir toute une nuit à température ambiante. Les supraparticules sont ensuite lavées et homogénéisées par centrifugations : 500 g pendant 15 minutes pour retirer les supraparticules de plus gros diamètres et 10 000 g pendant 15 minutes pour retirer celles de petits diamètres.

1.2.6. Formation d'une couche de silice bi-fluorescente

Les fluorophores utilisés sont la Cy 3, pour la détection des nanoparticules lors des études *in vitro*, et la Cy 7.5, pour la détection des nanoparticules lors des études *in vivo*.

Un volume de 100 µL d'une solution de Cy 7.5 à 2,5 mg/mL dans du DMSO anhydre (3,1 mM ; 1 eq) est ajouté à 250 µL d'éthanol absolu contenant 0,18 µL de MPS à 80 % ($1,24 \cdot 10^{-6}$ mol ; 4 eq). Le mélange est incubé 2 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière.

En parallèle, un volume de 100 µL d'une solution de Cy 3 à 2,1 mg/mL dans du DMSO anhydre (3,1 mM ; 1 eq) est ajouté à 250 µL d'éthanol absolu contenant 0,18 µL de MPS à 80 % ($1,24 \cdot 10^{-6}$ mol ; 4 eq). Le mélange est incubé 2 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Une solution 1 est constituée de 350 µL total de chaque solution fluorescente (2 x 175 µL), 5,4 mL d'éthanol absolu et 50 µL de TEOS. Une solution 2 est composée de 14,6 mL d'éthanol absolu, 2,66 mL d'eau et de 1,24 mL d'ammoniaque (30 % m/m). Un volume de 2 mL de supraparticules consolidées avec la pré-couche de silice est ajouté goutte à goutte dans la solution 2 qui est soniquée pendant 5 minutes.

La solution 1 est ensuite versée dans la solution 2 sous agitation magnétique à l'abri de la lumière à température ambiante et laissée à réagir toute une nuit. Les nanoparticules obtenues sont nommées SPC.

1.2.7. Adsorption de la protamine à la surface des SPC

Une solution de protamine à 10 mg/mL est préparée dans de l'eau milliQ. En tenant compte de la taille des SPC (70 nm de diamètre) et de leur surface développée (15 400 nm²/SPC), dans une plaque 96 puits, des concentrations croissantes (de 0 à 1,96 protamines/nm² de SPC, équivalent à 0 à 26,9 nmol de protamines) de la solution de protamine sont ajoutées à la solution de SPC (8,25 cm²/puits soit 300 µg d'oxyde de fer / puits) dans un volume final de 200 µL. La turbidité de chaque puits est ensuite mesurée par spectrophotométrie à 800 nm, en utilisant le spectromètre UV Visible Biochrom™ (Thermo Fisher Scientific), à 0, 24, 48 et 72 heures après ajout de la solution de protamine.

Les NPMs obtenues lors de cette synthèse seront nommées dans la suite du manuscrit SPC et SPC-protamine, pour les SPC greffées avec la protamine (Figure 25).

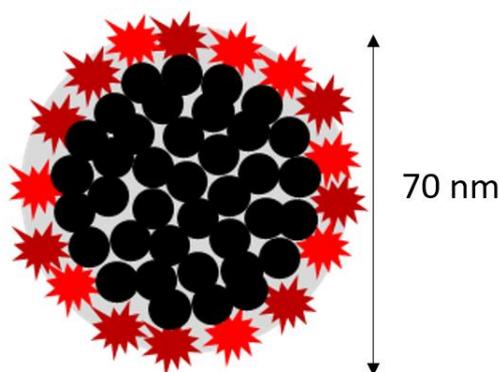


Figure 25 : Schéma des nanoparticules SPC-protamine. Elles sont composées d'un cluster de particules d'oxyde de fer d'un diamètre de 7 – 8 nm. Le cluster est consolidé avec une pré-couche de silice. Une couche de silice bi-fluorescente, contenant deux fluorophores la Cy 3 et la Cy 7.5, est ensuite ajoutée permettant la détection des SPC-protamines lors des études *in vitro* et *in vivo*, respectivement.

1.3. NF-Q

1.3.1. Réactifs et produits

Dénomination	Formule chimique ou Abréviation	Fournisseur
Chlorure ferreux tétra-hydraté	FeCl ₂ .4H ₂ O	Sigma Aldrich
Chlorure ferrique hexa-hydraté	FeCl ₃ .6H ₂ O	
Diéthylène glycol	DEG	
Hydroxyde de sodium	NaOH	
Acétate d'éthyle	C ₄ H ₈ O ₂	
Acétone	C ₃ H ₆ O	
Acide citrique	C ₆ H ₈ O ₇	
(3-mercaptopropyl)triéthoxysilane	MPS	
Orthosilicate de tétraéthyle	TEOS	
N-[3-(triméthoxysilyl)propyl]éthylènediamine	EDPS	
Glycérol	C ₃ H ₈ O ₃	
Acide acétique	CH ₃ COOH	
Iodométhane	CH ₃ I	
Nitrate d'argent	AgNO ₃	
N-méthyl-diéthanolamine	NMDEA	Acros Organic
Ethanol absolu	C ₂ H ₅ OH	Scharlau
Acide nitrique	HNO ₃	
Nitrate de fer (III) nano-hydraté	Fe ₃ (NO ₃) ₃ .9H ₂ O	
Ammoniaque	NH ₄ OH	
Méthanol	CH ₃ OH	
Ether diéthylique	(C ₂ H ₅) ₂ O	VWR
Triéthylamine	C ₆ H ₁₅ N	
Cyanine 7.5-maléimide	Cy 7.5	Lumiprobe
Cyanine 3-maléimide	Cy 3	
Diméthylsulfoxyde anhydre	DMSO anhydre	Thermo Fisher
Filtre 300 kDa	/	Millipore

Tableau 6 : Réactifs et produits nécessaires à la synthèse des NF-Q

1.3.2. Synthèse des nanofleurs NF@SiO₂:DF

Une masse de 1,082 g de chlorure ferreux tétra-hydraté (5,44 mmol) et une masse de 0,398 g de chlorure ferrique hexa-hydraté (1,47 mmol) sont dissoutes dans 80 g d'un mélange de DEG et de NMDEA (ratio 1:1, v/v). Cette solution est mélangée 1 heure sous flux d'azote sous agitation jusqu'à dissolution complète des précurseurs. Une masse de 0,64 g d'hydroxyde de sodium (16 mmol) est dissoute dans 40 g d'un mélange NMDEA/DEG (1:1, v/v) sous flux d'azote. La solution d'hydroxyde de sodium est ajoutée à la solution contenant les précurseurs et le mélange est chauffé à 220 °C, avec une rampe de 2 °C/min, pendant 4 heures. Les nanoparticules obtenues sont sédimentées magnétiquement et lavées avec un mélange éthanol / acétate d'éthyle (1:1, v/v) trois fois pour éliminer les impuretés organiques et inorganiques. Un lavage à l'acide nitrique 10 % est réalisé. Une masse de 8,25 g de nitrate de fer (III) nano-hydraté (20,4 mmol) est solubilisée dans 20 mL d'eau et la solution est ajoutée aux nanoparticules. La dispersion de nanoparticules est chauffée à 80 °C pendant 45 minutes pour obtenir de la maghémite (γ -Fe₂O₃). Après décantation et élimination du surnageant, les nanoparticules sont lavées à l'acide nitrique 10 %, puis à l'acétone et finalement à l'éther diéthylique. Au final, les nanoparticules sont redispersées dans l'eau.

1.3.3. Encapsulation des NF par une couche de silice bi-fluorescente

Modification de surface des NF avec l'acide citrique pour les stabiliser en milieu hydro-alcoolique basique

Dans un erlenmeyer de 250 mL, un volume de 30 mL d'une dispersion de NF dans l'eau (15 g/L en γ -Fe₂O₃, surface développée = 36,3 m²) et de 70 mL d'une solution d'acide citrique (14 g/L) sont ajoutés. Après 5 minutes d'agitation, les nanoparticules sont décantées magnétiquement et lavées à deux reprises avec de l'eau ultrapure (18 mΩ). Au final, les NF modifiées en surface avec des citrates sont redispersées dans 30 mL d'eau ultrapure et peptisées en ajoutant 20 μL d'ammoniaque (30 % v/v). A l'issue de cette modification de surface, les NF sont stables en milieu hydro-alcoolique basique.

Synthèse des organosilanes fluorescents avec la Cy 3 et la Cy 7.5

Les fluorophores utilisés sont la Cy 3, pour la détection des nanoparticules lors des études *in vitro*, et la Cy 7.5, pour la détection des nanoparticules lors des études *in vivo*.

Dans un tube de 5 mL, un volume de 100 μ L d'une solution à 2,1 mg/mL de Cy 3 dissous dans du DMSO anhydre (3,1 μ mol ; 1eq) est ajouté à 2,5 mL d'éthanol absolu. Un volume de 1,8 μ L de MPS (12,4 μ mol ; 4 eq) est ajouté à la solution contenant le fluorophore. Le mélange est incubé 2 heures à température ambiante au tourniquet et à l'abri de la lumière sous atmosphère inerte.

Dans un second tube de 5 mL, un volume de 100 μ L d'une solution à 2,5 mg/mL de Cy 7.5 dissous dans du DMSO anhydre (3,1 μ mol ; 1 eq) est ajouté à 2,5 mL d'éthanol absolu. Un volume de 1,8 μ L de MPS (12,4 μ mol ; 4 eq) est ajouté à la solution contenant le fluorophore. Le mélange est incubé 2 heures à température ambiante au tourniquet et à l'abri de la lumière sous atmosphère inerte.

Encapsulation des NF dans une couche de silice bi-fluorescente

Dans un ballon de 250 mL, un volume de 10,7 mL d'une dispersion de NF (C γ -Fe₂O₃ =15,7 g/L) modifiées citrate est ajouté dans une solution contenant 150 mL d'éthanol, 40 mL d'eau et 3,2 mL d'ammoniaque (30 % m/m). La dispersion est passée au bain à ultrasons pour bien homogénéiser les nanoparticules. Les deux organosilanes fluorescents sont mélangés avec 10 mL d'éthanol puis un volume de 350 μ L de TEOS est ajouté directement dans le milieu réactionnel. La réaction est laissée sous agitation mécanique, une nuit, à l'abri de la lumière et à température ambiante. Une couche de silice protectrice autour de la couche de silice fluorescente est formée autour des NF pour protéger les fluorophores de la dégradation, en ajoutant 400 μ L de TEOS dans le milieu réactionnel. Après une nuit sous agitation mécanique, les nanofleurs enrobées d'une couche de silice fluorescente nommées NF@SiO₂:DF sont obtenues.

1.3.4. Modifications de surface des NF@SiO₂:DF

Modification de surface des NF@SiO₂:DF avec l'EDPS

Un volume de 200 mL d'éthanol est ajouté à 200 mL d'une dispersion de NF@SiO₂:DF dans l'eau, représentant une surface de 120 m². Sous agitation, un volume de 3,89 ml d'EDPS (18 mmol) est ajouté au milieu réactionnel. Lors de l'ajout de l'EDPS, les nanoparticules flocculent. L'ensemble est laissé sous agitation durant 12 heures, puis 100 mL de glycérol sont ajoutés. L'éthanol ainsi que l'eau sont éliminés par évaporation sous pression réduite. Les nanoparticules dispersées dans le glycérol sont alors chauffées à 100 °C durant 2 heures sous vide. Après le traitement sous vide, 100 mL d'éthanol sont ajoutés puis l'ensemble est lavé à l'éthanol par ultrafiltration tangentielle à l'aide d'un filtre de 300 kDa. Après deux lavages, quelques gouttes d'acide acétique sont ajoutées afin de protoner les amines de surface. Trois autres lavages dans l'éthanol sont réalisés afin d'éliminer les traces de silane non greffé ainsi que l'excès d'acide acétique. Au final, un dernier lavage dans le méthanol est réalisé. Les nanoparticules nommées NF@SiO₂:DF-NH₃⁺ sont stockées dans le méthanol.

Modification de surface des NF@SiO₂:DF-NH₃⁺ avec des ammoniums quaternaires

Un volume de 319 µL d'iodométhane et 171 µL de triéthylamine sont ajoutés à 10 mL d'une dispersion de NF@SiO₂:DF-NH₃⁺ (surface développée = 20,5 m²) dispersées dans l'éthanol absolu. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 12 heures. La dispersion est ensuite chauffée au reflux à 70 °C pendant 30 minutes. Les nanoparticules sont lavées à l'éthanol trois fois par centrifugation ou par ultrafiltration tangentielle puis les nanoparticules sont lavées à l'eau trois fois. L'ion iodure est éliminé par échange ionique en ajoutant du nitrate d'argent. Le précipité d'iodure d'argent (AgI) formé est retiré par centrifugation et les NF sont lavées à l'eau. Au final, les nanoparticules sont redispersées dans l'eau milliQ. Ces nanoparticules seront appelées NF-Q (Figure 26) dans le reste du manuscrit.

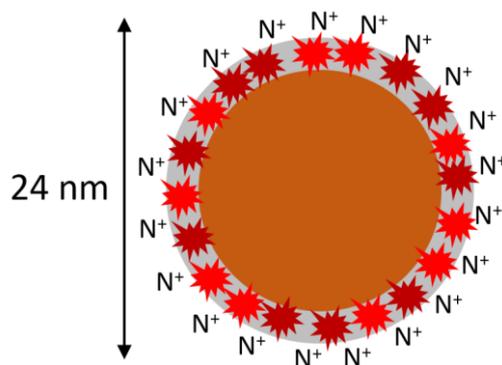


Figure 26 : Schéma des nanoparticules NF-Q. Elles sont composées d'une nanofleur d'oxyde de fer d'un diamètre de 16 nm entourée d'une couche de silice bi-fluorescente, contenant deux fluorophores, la Cy 3 et la Cy 7.5, permettant la détection des NF-Q lors des études *in vitro* et *in vivo*, respectivement. Les nanofleurs sont ensuite décorées avec des groupements d'ammonium quaternaire leur conférant une charge positive en conditions physiologiques.

1.4. Caractérisation des NPMs

La taille physique et la morphologie des NPMs ont été déterminées par microscopie électronique à transmission (MET). Pour l'analyse des IONPs, les échantillons ont été préparés par pulvérisation de la suspension de NPMs à une concentration de 0,1 g/L sur des grilles Cu 300 HD (Pacific Grids) séchées à température ambiante. Les images ont été acquises à l'aide d'un microscope Hitachi H7650 couplé à une caméra ORIUS SC1000 11 MPx. Pour les SPC et les NF-Q, l'analyse a été effectuée sur un échantillon de 200 NPMs à l'aide du logiciel Image J. Le MET utilisé est le CM120 opérant à 120 kV (Philips, Amsterdam, Pays-Bas).

Le rayon hydrodynamique des nanoparticules est déterminé par diffusion dynamique de la lumière (DLS) en utilisant un appareil Cordouan Vasco composé d'un laser de longueur d'onde de 658 nm à un angle de détection de 135°.

Le potentiel zêta des nanoparticules est déterminé avec l'appareil WALLIS (Cordouan Technologies).

1.5. Caractérisation des NPMs soumises au champ magnétique

Les NPMs en suspension (SPC-protamine à une concentration de 77 g/L et NF-Q à une concentration de 8,85 g/L) dans un tube sont soumises au champ magnétique pendant 5 minutes (NF-Q) ou 25 minutes (SPC-protamine). La température de la suspension de NPMs est mesurée

en temps réel pendant l'application du champ magnétique avec une sonde optique (Opsen™, Québec, Canada).

2. Systèmes biologiques

2.1. Bactéries

Les bactéries utilisées appartiennent à la souche *Escherichia coli* (Invitrogen, Carlsbad, Californie, USA) et sont chimiocompétentes (One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. Coli*) ou électrocompétentes (One Shot® TOP10 Electrocomp™ Competent *E. Coli*). Elles appartiennent au groupe 1, classe 1 de risques et ont été manipulées en confinement L1 sous PSM.

2.2. Lignées cellulaires

2.2.1. Lignées natives

La lignée cellulaire U87-MG est une lignée de glioblastome humain commerciale (American Tissue Culture Collection). Elle est adhérente en culture et permet la formation de tumeurs chez la souris immunodéficiente.

La lignée cellulaire RM1 est une lignée du cancer de la prostate murin obtenue par le Dr. T. C. Thompson (Baylor College of Medicine, Houston, USA). Elle est adhérente en culture et permet la formation de tumeur chez la souris immunocompétente.

2.2.2. Lignées génétiquement modifiées : U87-FRT et RM1-FRT

Les lignées U87-MG et RM1 natives ont été génétiquement modifiées de façon à posséder dans leur génome un ou plusieurs sites de recombinaison FRT (FLP recombination Target). Cette insertion est aléatoire et est réalisée grâce au système Flp-In™ (Invitrogen). Cette transfection aléatoire apporte également un gène de résistance à la zéocine. Après sélection par antibiotique, la lignée FRT obtenue est polyclonale. Elle peut faire l'objet d'une sélection clonale où le nombre de site FRT est déterminé par Southern Blot pour chaque clone. Les

lignées FRT sont ensuite co-transfectées avec le plasmide de type pcDNA5-FRT contenant le gène d'intérêt et le plasmide pOG44 codant la Flp recombinase. Cette enzyme catalyse la recombinaison homologue entre le site FRT du plasmide et celui présent dans le génome de la cellule. Le plasmide pcDNA5-FRT apporte également le gène de résistance à l'hygromycine qui se place entre le gène de la zéocine et son promoteur. Ainsi, les cellules qui possèdent le gène d'intérêt deviennent résistantes à l'hygromycine et sensibles à la zéocine.

2.2.3. Lignées cellulaires génétiquement modifiées

Nom des lignées	Cellules transformées	Plasmides	Méthodes de transfection	Antibiotiques de sélection	Références
U87-CMV-LucF	Cellules U87-FRT	pcDNA5-FRT-CMV-LucF	Système FRT/Flp	Hygromycine (50 µg/mL)	(Fortin <i>et al.</i> , 2012)
U87-Hsp70-LucF	Cellules U87-FRT	pcDNA5-FRT-Hsp-LucF	Système FRT/Flp	Hygromycine (50 µg/mL)	Non publiée
RM1-CMV-LucF	Cellules RM1	pcDNA6.2-CMV-LucF	Transfection aléatoire	Blasticidine (10 µg/mL)	(Adumeau <i>et al.</i> , 2017)
RM1-Hsp70-LucF	Cellules RM1	pcDNA3.1-Hsp-LucF	Transfection aléatoire	Néomycine (750 µg/mL)	Non publiée
RM1-CMV-iRFP-ires-Nluc	Cellules RM1-FRT	pcDNA5-FRT-CMV-iRFP-ires-Nluc	Système FRT-Flp	Hygromycine (700 µg/mL)	Non publiée

Tableau 7 : Lignées cellulaires génétiquement modifiées et caractérisées *in vitro* et *in vivo*

Le promoteur Hsp utilisé dans les lignées cellulaires est le promoteur humain thermosensible Hsp70B.

2.3. Animaux

2.3.1. Souris C57bl6 albinos

Les souris C57bl6 albinos (B6(C)/Rj-Tyrc/c) sont des souris immunocompétentes au pelage blanc. Il s'agit d'une souris congénique sur fond C57BL/6RNj porteuse de la mutation albinos. Elles sont achetées au laboratoire Janvier à l'âge adulte (6 semaines) et sont hébergées à l'animalerie conventionnelle A1 de l'université de Bordeaux.

2.3.2. Souris NSG

Les souris NSG (NOD/SCID/IL-2R γ null) sont des souris immunodéficientes au pelage blanc. Elles sont déficientes en lymphocytes B et T et en cellules NK et sont altérées pour les macrophages et les cellules dendritiques. Elles sont élevées à l'animalerie A2 de l'université de Bordeaux jusqu'à l'âge adulte (6 semaines) afin de limiter le développement d'infections puis sont transférées à l'animalerie conventionnelle A1 lors des besoins expérimentaux.

2.3.3. Souris thermosensibles

Les souris « thermosensibles » sont des souris immunocompétentes au pelage blanc (souris C57bl6 albinos) génétiquement modifiées pour exprimer la luciférase firefly et la protéine fluorescente mPlum sous le contrôle du promoteur murin thermosensible Hspa1b qui est un promoteur thermosensible des Hsp70. Ces souris sont issues de croisements entre la souris Hspa1b-LucF (+/+) (Christians *et al.*, 1995 p.1), la souris Hspa1b-mPlum (+/-) (de la Rosa *et al.*, 2013) et de la souris C57bl6 albinos. Le résultat de ces croisements est l'obtention, après plusieurs générations, de la souris thermosensible et homozygote Hspa1b-LucF (+/+) – Hspa1b-mPlum (+/+) sur fond blanc. Elles sont élevées à l'animalerie conventionnelle A1 et sont utilisées dès l'âge adulte (6 semaines).

3. Méthodes de biologie moléculaire

3.1. Tampons et milieux

Dénominations	Noms	Compositions	Fournisseurs
LB	Luria-Bertani Lennox Agar	10 g/L tryptone ; 5 g/L extrait de levure ; 5 g/L NaCl ; 2.2 g/L agents de liaison inertes	Euromedex
LB-Agar	LB Broth	10 g peptone 140 ; 5 g extrait de levure ; 5 g NaCl ; 12 g agar	Euromedex
S.O.C.	Super Optimal Broth	2 % tryptone ; 0,5 % extrait de levure ; 10 mM NaCl ; 2,5 mM KCl ; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄ ; 20 mM glucose	Invitrogen
TAE	Tris-acetate EDTA (50X)	Solution 1X : 40 mM Tris-acetate ; 1 mM EDTA, pH 8.3	Euromedex
TEN	Tris EDTA NaCl	Pour une solution 1X : 10 mM Tris ; 0,2 M NaCl ; 1 mM EDTA	Bio-Rad

Tableau 8 : Nom et composition des tampons et milieux utilisés en biologie moléculaire

3.2. Digestion enzymatique

Les enzymes de restrictions (Promega) sont utilisées selon les recommandations du fournisseur. Un microgramme d'ADN est digérée par 5 unités d'enzyme de restriction en présence du tampon adéquat, de BSA (0,1 mg/mL) et d'eau. La digestion est effectuée à 37 °C pendant 4 heures.

3.3. Blunt du vecteur obtenu

Cette méthode permet de combler les extrémités obtenues après une digestion enzymatique afin d'obtenir des bords francs. Cette réaction est réalisée grâce à l'ajout de 100

μM de dNTP et de 5 unités par μg d'ADN de l'enzyme T4 DNA polymerase (Promega). La réaction s'effectue à 37 °C pendant 15 minutes puis la polymérase est inactivée par chauffage (10 min à 75°C).

3.4. Séparation électrophorétique

Les échantillons sont séparés sur un gel d'agarose à température ambiante à un voltage de 100 volts pendant 30 minutes dans une cuve horizontale. La concentration d'agarose est déterminée en fonction de la taille du fragment d'acide nucléique d'intérêt (0,8 à 2 %). L'agarose est dissous dans du tampon TAE puis l'intercalant Gel-Red™ Nucleic Acid Gel Stain 1X (Interchim) est ajouté. Les échantillons sont mélangés à du tampon de charge 6X (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 0,03% (v/v) bleu de bromophénol, 0,03% (v/v) xylène cyanol FF, 60% (v/v) glycérol et 60 mM EDTA) (Thermo Fisher, Illkirch, France) et du tampon TAE 1X puis déposés dans les puits. Les fragments d'ADN sont ensuite visualisés sous éclairage ultraviolet (365 nm) et leur taille est déterminée par comparaison avec un marqueur de taille moléculaire (GeneRuler 1 kb Ladder, Invitrogen). Les gels sont photographiés et analysés à l'aide de l'appareil Gel doc 2000 (Bio-Rad) et du logiciel Quantity One (Bio-Rad).

3.5. Extraction et purification des acides nucléiques

3.5.1. Extraction et purification de l'ADN du gel d'agarose

L'extraction de l'ADN est effectuée à partir du kit « Wizard® SV gel and PCR Clean-up » (Promega). Dans un premier temps, le gel d'agarose contenant le fragment d'ADN à extraire est dissous dans de la Membrane Binding Solution (10 μL de solution pour 10 mg de gel) à 60 °C jusqu'à dissolution complète (10 minutes environ). La solution dissoute est déposée sur une colonne puis centrifugée 1 minute à 14 000 rpm. La colonne est ensuite lavée deux fois avec de la Membrane Wash Solution puis centrifugée 1 minute à 14 000 rpm. Après le dernier lavage, une seconde centrifugation à 14 000 rpm pendant 10 minutes est effectuée pour sécher la colonne qui est ensuite transférée sur un tube Eppendorf de 1,5 mL propre. Dans la colonne, 50 μL de Nuclease-free water sont ajoutés. Après une incubation de 1 minute à température ambiante, la colonne est centrifugée à 14 000 rpm pendant 1 minute. L'acide nucléique est récupéré dans l'éluât et conservé à - 20 °C.

3.5.2. Extraction et purification de l'ADN plasmidique des bactéries

L'extraction de l'ADN plasmique est effectuée à partir du kit « PureYield™ Plasmid Midiprep System » (Promega).

Après avoir été cultivée toute la nuit à 37 °C sous agitation (225 rpm) dans 150 mL de milieu LB supplémenté avec l'antibiotique adéquat, la suspension bactérienne est centrifugée pendant 10 minutes à 5 000 g. Le culot bactérien est re-suspendu dans 3 mL de Cell Resuspension Solution et la suspension est transférée dans un tube Falcon de 14 mL. Les bactéries sont ensuite lysées par addition de 3 mL de Cell Lysis Solution. Après une incubation de 3 minutes à température ambiante, 5 mL d'une solution de neutralisation sont ajoutés. Le mélange est incubé 30 minutes à 1 heure à température ambiante puis centrifugé à 8 000 g pendant 10 minutes.

La purification de l'ADN plasmidique est ensuite réalisée sous vide. Une première colonne (Clean Column) est emboîtée dans une seconde colonne (Binding Column). Le lysat bactérien est ajouté dans la première colonne puis incubé 2 à 3 minutes à température ambiante avant d'appliquer le vide jusqu'à ce que la totalité du lysat soit filtré. La Clean Column est ensuite jetée puis 5 mL d'Endotoxin Removal Wash sont ajoutés dans la Binding Column. Après application du vide, 20 mL de la solution Column Wash sont ajoutés. Le vide est appliqué pendant 1 à 2 minutes afin de sécher la membrane de toutes traces d'éthanol. L'ADN plasmidique est ensuite élué avec 600 µL d'eau Nuclease-free.

3.5.3. Purification et précipitation de l'ADN

La précipitation de l'ADN est effectuée à l'aide du kit « SureClean » (Bioline).

Le réactif est mélangé à l'ADN selon un ratio volume/volume égal puis vortexé et incubé 10 minutes à température ambiante. Le mélange est centrifugé 10 minutes à 14 000 g. L'ADN est ensuite lavé dans de l'éthanol 70° dont le volume est deux fois celui de l'échantillon d'ADN, vortexé et centrifugé 10 minutes à 14 000 g. Le culot est ensuite séché à l'air libre dans des conditions stériles puis repris dans de l'eau Nuclease-free ou dans le solvant adéquat.

3.6. Quantification des acides nucléiques par spectrofluorimétrie

L'ADN en solution est quantifié par spectrofluorimétrie à l'aide du fluorophore Hoechst 33258 (Fluorescent DNA Quantitation Kit, Bio-RAD). Ce fluorophore est un agent intercalant de l'ADN avec une longueur d'onde d'excitation à 360 nm et une longueur d'onde d'émission à 460 nm. L'intensité de fluorescence de l'échantillon est proportionnelle à la quantité d'ADN qu'il contient. La fluorescence est quantifiée à l'aide d'un spectrofluorimètre (Versafluor, Bio-RAD) étalonné grâce à une solution standard d'ADN (1 µg). La sensibilité est de l'ordre de 20 ng d'ADN.

La mesure est effectuée dans une cuve contenant 2 mL de tampon complet (tampon TEN 1X et du Hoechst 33258 à 0,1 µg/mL). Le zéro est effectuée sur du tampon complet seul et la calibration à 1 µg est effectuée en ajoutant 1 µL de la solution standard d'ADN. Les échantillons sont quantifiés en ajoutant 1 µL de la solution d'acide nucléique dans le tampon complet.

3.7. Quantification de l'ADN sur gel d'agarose

L'ADN extrait suite à une migration sur gel d'agarose ne peut pas être quantifié par spectrofluorimétrie. Cette incapacité est due à la présence de l'intercalant GelRed qui interfère avec la quantification au Versafluor, malgré la purification sur colonne de l'ADN. Dans ce cas, la quantification de l'ADN est effectuée après une migration sur gel d'agarose. Cette quantification est réalisée par comparaison entre l'intensité de la bande de l'échantillon avec celles du marqueur de taille « High DNA Mass Ladder » (Invitrogen). A chaque bande de ce marqueur est référencée une quantité d'ADN

3.8. Ligation de l'insert dans le vecteur

La ligation permet l'insertion du gène d'intérêt dans le plasmide. Elle est effectuée selon un ratio molaire 3/1 (insert/vecteur) avec une quantité d'ADN finale de 300 ng. La ligation est réalisée en présence d'un tampon, de 1,5 unité de T4 DNA ligase (Promega) et d'eau. Le mélange est incubé à 14 °C toute une nuit.

3.9. Amplification par réaction de polymérisation en chaîne

La réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction = PCR) est une méthode d'amplification enzymatique d'un fragment d'ADN compris entre deux amorces oligonucléotides *in vitro*.

Le produit de ligation (0,4 µL) ou les cultures bactériennes (1,5 µL) est ajouté à 25 µL de mélange réactionnel. Pour un échantillon, le mélange réactionnel est composé de la Dream Taq Buffer 1X (Fermentas), des dNTP (0,2 mM), les amorces-D et amorces-R (0,2 µM) (Tableau 9), de la Dream Taq (5 unités/µL) (Fermentas) et d'eau (qsp 25 µL). Un témoin négatif est composé du mélange réactionnel uniquement. Le protocole de PCR comprend une étape initiale de dénaturation (3 minutes à 95 °C), 35 cycles et une étape finale d'élongation (5 minutes à 72 °C) et l'ensemble de ces étapes est gérée par le thermocycleur T. gradient (Biometra). Chaque cycle comprend une phase de dénaturation (30 secondes à 95 °C), une phase d'hybridation (30 secondes à la température imposée par la température de demi-dénaturation des amorces (T_m) comprise entre 40 °C et 70 °C) et une phase d'élongation (durée proportionnelle à la taille de l'amplifiât : 1 minute/1 Kb à 72 °C).

Amorces	Séquences de 5' à 3'	Sens	Cible
LucF-5D	GAGCACGGAAAGACGATGACG	D	5' ADNc de la LucF
BGH-R	TAGAAGGCACAGTCGAGG	R	3' ADNc vecteur pcDNA5

Tableau 9 : Séquences des amorces d'oligonucléotides utilisées en PCR

La synthèse des amorces a été confiée à un prestataire de service (Eurogentec). Les amorces utilisées dans ce projet ont été dessinées par nos soins. Il s'agit d'amorces de 21 paires de bases dont le T_m est de 60 °C environ. Les extrémités sont préférentiellement finies par une base G ou C. Dans la mesure du possible, les amorces sont choisies de part et d'autre d'un site de ligation afin de distinguer les amplifications issues de l'ADNc de celles issues de l'ADN génomique.

3.10. Amplification d'un vecteur par transformation bactérienne

L'amplification des vecteurs est effectuée par des bactéries. La transformation bactérienne se fait par choc thermique ou électrique.

Les bactéries chimiocompétentes (25 μL) sont mélangées avec 1 μL du plasmide d'intérêt et incubées 30 minutes dans de la glace. Le choc thermique est réalisé à 42 °C pendant 30 secondes puis les bactéries sont incubées 2 minutes dans de la glace. Les bactéries électrocompétentes (25 μL) sont mélangées avec 0,5 μL de plasmide. Le choc thermique est ensuite réalisé dans une cuve de 1 mm (1 250 V, 5 ms, 1 pulse). Après choc thermique ou électrique, 125 μL de milieu S.O.C. sont ajoutés aux bactéries à température ambiante puis les bactéries sont incubées 1 heure à 37 °C sous agitation (225 rpm). Les bactéries sont ensuite étalées sur un milieu solide LB-Agar supplémenté de l'antibiotique de sélection (ampicilline : 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ou streptomycine : 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) puis incubées à 37 °C toute la nuit. Les colonies isolées sont ensuite repiquées et amplifiées dans du milieu LB supplémenté de l'antibiotique adéquat à 37 °C sous agitation (225 rpm).

4. Méthodes de biologie cellulaire et biochimie

4.1. Tampons, milieux et sérum

Dénominations	Noms	Compositions	Fournisseurs
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium	GlutaMAX™ I contenant 4,5 g/L de D-Glucose et du pyruvate	Gibco
DMEM sans rouge de phénol	Dulbecco's modified Eagle's medium	4,5 g/L de glucose, de la L-Glutamine, du pyruvate de sodium et 3,7 g/L de NaHCO ₃	PAN Biotech
SVF décomplémenté	Sérum de veau fœtal décomplémenté	Sérum de veau fœtal décomplémenté par la chaleur (56°C pendant 30 minutes) permettant la destruction du complément	Gibco
PSA	Pénicilline – Streptomycine – Amphotéricine	10 000 unités/mL de pénicilline 10 000 µg/mL de streptomycine 25µg/mL d'amphotéricine B	Gibco
MEM NE AA	Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids	10mM de : Glycine, L-Alanine, L-Asparagine, L-Acide Aspartique, L-Acide Glutamique, L-Proline, L-Serine	Gibco
PBS	Phosphate-Buffered Salines	PBS pH 7.4 contenant 144 mg/L de phosphate de monopotassium, 9 g/L de chlorure de sodium et 795 mg/L d'hydrogénophosphate de sodium	Gibco
Trypsine	0.05% - Trypsine - EDTA	0.05% de trypsine et EDTA	Gibco
Opti-MEM	Opti-MEM® I Reduced Serum Medium, GlutaMAX™	Formulation complete confidentielle	Gibco

Tableau 10 : Nom et composition des milieux de culture, tampons et sérum utilisés en culture cellulaire

4.2. Maintien des lignées

L'entretien des cellules est effectué dans des conditions stériles sous un PSM de type II situé dans une salle de culture cellulaire de niveau 2 (L2). Les lignées cellulaires sont cultivées

dans du milieu de culture complet DMEM supplémenté de 10 % (v/v) de SVF décomplémenté et de 1 % (v/v) de PSA. Pour les cellules U87, le milieu contient également 1 % (v/v) de MEM NE AA. Pour les lignées génétiquement modifiées, l'antibiotique de sélection correspondant est ajouté au milieu de culture complet. Les cellules sont conservées dans une étuve à 37 °C dans une atmosphère saturée en humidité et contenant 5 % de CO₂.

Lorsque les cellules atteignent une confluence de 80 %, elles sont passées afin de les maintenir dans une phase exponentielle de croissance. Pour cela, elles sont lavées avec du PBS puis incubées 5 minutes à 37 °C dans de la trypsine. L'ajout de milieu de culture complet (10 fois le volume de trypsine) permet d'arrêter l'action de la trypsine puisque le SVF contient des inhibiteurs de cette enzyme. Le culot cellulaire est récupéré suite à une centrifugation à 300 g pendant 5 minutes, re-suspendu et dilué dans du milieu de culture complet.

4.3. Dénombrement cellulaire

Le dénombrement cellulaire est effectué à l'aide d'une cellule de Malassez. Pour cela, les cellules sont diluées au 1/10^{ème} dans un mélange de PBS et de bleu Trypan permettant de différencier les cellules mortes des cellules vivantes. Le mélange est ensuite mis entre une lamelle et la cellule de Malassez. Le comptage des cellules vivantes permet de déterminer la concentration cellulaire de la suspension.

4.4. Transfection stable

La transfection stable consiste à intégrer de manière permanente le gène d'intérêt dans le génome des cellules. Ce dernier est conservé lors des divisions cellulaires contrairement à la transfection transitoire.

4.4.1. Système Flp-In

Le système Flp permet l'insertion de la séquence d'intérêt par recombinaison homologue au site FRT présent dans le génome des lignées cellulaires U87-FRT et RM1-FRT. La recombinase Flp qui catalyse la réaction est codée par le plasmide pOG44 (cf. 2.2.2.).

Les cellules sontensemencées dans une plaque 24 puits à raison de 25 000 cellules/puits dans un volume de 500 μL de milieu DMEM complet puis incubées 48 heures à 37 °C. L'ADN plasmidique, contenant la séquence FRT, est co-transfecté avec le plasmide pOG44 suivant différents ratios molaires. La suite du protocole de transfection varie en fonction de la lignée à transfecter.

Les cellules RM1-FRT sont transfectées avec 2 μg d'ADN et le transfectant utilisé est la lipofectamine® 2000 (Invitrogen) selon un ratio de 2 $\mu\text{L}/\mu\text{g}$ d'ADN. L'ADN est d'abord purifié, précipité (cf. 3.4.3.) puis dilué dans 50 μL de milieu Opti-MEM. Séparément, la lipofectamine est diluée dans 50 μL milieu Opti-MEM. Après une incubation de 5 minutes à température ambiante, les deux préparations sont mélangées puis incubées 20 minutes à température ambiante. Un volume de 100 μL de milieu de culture est retiré de chaque puits et 100 μL de la préparation ADN/lipofectamine sont ajoutés aux cellules.

Les cellules U87-FRT sont transfectées avec 250 ng d'ADN et le transfectant utilisé est du TransFast (Promega). L'ADN purifié et précipité est repris dans 200 μL de milieu Opti-MEM et additionné de TransFast (Promega) selon un ratio de 3 $\mu\text{L}/\mu\text{g}$ d'ADN. Le mélange est incubé 15 minutes à température ambiante. Après un rinçage au PBS, les cellules à transfecter sont mises en présence du mélange contenant l'ADN (200 μL) et incubées 30 minutes à 37 °C. Une fois la transfection réalisée, le mélange précédent est remplacé par du milieu complet (500 μL) et les cellules sont replacées dans l'incubateur.

Après 48 heures d'incubation, la sélection par l'antibiotique de résistance débute jusqu'à la formation des colonies.

4.4.2. Transfection aléatoire

La transfection aléatoire stable permet l'insertion aléatoire du gène d'intérêt dans le génome de la cellule. Le plasmide utilisé est de type pcDNA6.2 ou pcDNA3.1 contenant le gène d'intérêt et un gène codant pour un antibiotique de résistance, la blasticidine (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Euromedex) ou la néomycine (750 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Euromedex), respectivement. Le protocole de la transfection aléatoire est identique à celui de la transfection avec le système Flp-In sauf que le plasmide pOG44 n'est pas ajouté car il n'y a pas de site FRT dans le génome cellulaire et plasmidique.

4.5. Traitement des cellules avec les nanoparticules magnétiques

Les études *in vitro* sont effectuées dans des plaques 48 puits ou des barrettes 16 puits Nunc™ LabTeck® (Thermo Fisher, Waltham, USA) avec un fond en verre. Les barrettes sont utilisées uniquement lors des études de thermométrie *in vitro* car leur taille est adaptée à la taille de la bobine du champ magnétique (système DM3 ; cf. 8.2.1.). Les cellules sontensemencées à raison de 50 000 cellules/puits dans un volume de 250 µL pour les plaques 48 puits ou à raison de 10 000 cellules/puits dans un volume de 100 µL pour les barrettes. Le milieu de culture utilisé est du milieu DMEM complet sans rouge de phénol car il agit comme filtre lors des mesures du signal BLI. Après une incubation de 24 heures à 37 °C, les NPMs sont ajoutées directement dans le milieu de culture à la concentration souhaitée (entre 0 et 500 µg d'oxyde de fer/mL). Les cellules et les NPMs sont incubées à 37 °C (4, 18, 24, 48 ou 72 heures). Les cellules sont ensuite lavées 2 fois avec du PBS stérile pour retirer toutes les NPMs qui ne sont pas internalisées puis 100 µL de milieu de culture complet sans rouge de phénol sont ajoutés dans le puits.

4.6. Evaluation de la cytotoxicité et de l'internalisation des NPMs

Dans un premier temps, la viabilité cellulaire est étudiée par BLI (cf. 6.1.2.) ce qui permet de déduire la cytotoxicité des NPMs. La BLI dépend de la quantité d'enzyme produite (transcription et traduction), de la quantité de substrat, de la quantité de cofacteurs et du nombre de cellule. Pour une même quantité de substrat, la mesure du signal BLI permet de visualiser une prolifération cellulaire lorsque le signal BLI augmente ou une mortalité cellulaire lorsque le signal BLI diminue. De plus, certaines enzymes, comme la Luciférase firefly, nécessitent de l'ATP comme cofacteur mettant, d'autant plus, en évidence la viabilité cellulaire.

La quantification de l'internalisation des NPMs dans les cellules est ensuite effectuée par cytométrie en flux. La cytométrie en flux permet une analyse de la taille, de la forme et de l'intensité de fluorescence des cellules en suspension. Pour cela, la suspension cellulaire est aspirée à travers un système de fluidique et les cellules passent les unes après les autres devant un laser qui excite le ou les fluorophores présents dans les cellules et les photons émis sont récupérés par un détecteur.

Le cytomètre en flux utilisé dans cette étude est le cytomètre BD LSR Fortessa™ (BD Biosciences). L'intensité de fluorescence dans la cellule rend compte de la quantité de NPMs internalisées. Les cellules sont lavées puis trypsinées. La suspension cellulaire est ensuite centrifugée à 300 g pendant 5 minutes. Le culot cellulaire est lavé dans 900 µL de PBS. Après une centrifugation à 300 g pendant 5 minutes, le culot cellulaire est repris dans 300 µL de PBS supplémenté d'EDTA (2 mM) et de SVF (0,5 %, v/v) puis conservé à 4 °C jusqu'à analyse au cytomètre en flux. Les cellules sont analysées (10 000 cellules par condition) en utilisant le laser d'excitation de 560 nm et le filtre d'émission de 580 nm (PE) afin d'observer la Cy 3 ($\lambda_{exc} = 555$ nm, $\lambda_{emis} = 570$ nm). Les résultats de cytométrie en flux sont ensuite analysés grâce au logiciel FACSDiva (BD Biosciences).

4.7. Quantification du fer dans les cellules

La quantification du fer dans les cellules est une autre méthode permettant de déterminer la quantité de NPMs internalisées. Pour cela, les cellules sont trypsinées et le culot cellulaire est lavé 4 fois au PBS. Le culot cellulaire est re-suspendu dans 1 mL d'acide chlorhydrique 5 M et incubé pendant 1 heure à 60 °C permettant la dégradation des NPMs en fer. Le fer donne une coloration jaune à la solution dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de fer. Les échantillons sont alors analysés par spectrométrie à une absorbance de 350 nm. La quantité de fer dans les cellules est déterminée grâce à une gamme d'étalonnage préalablement réalisée et identique pour les trois types de NPMs étudiés (Rad *et al.*, 2007).

4.8. Mesure de l'activité luciférase sur lysat cellulaire

Les activités de la luciférase firefly (LucF) et de la nanoluciférase (Nluc) sont mesurées à partir d'un lysat cellulaire à l'aide d'un luminomètre (Lumat LB850, Berthold). Cet appareil mesure les photons émis par la réaction enzymatique. Les mesures sont exprimées en RLU (Relative Light Unit).

La mesure de l'activité de la LucF est réalisée avec le kit «Luciferase Assay System » (Promega). Les cellules sont lysées dans du Cell Culture Lysis Reagent pendant 10 minutes sous agitation et à température ambiante. La mesure est ensuite réalisée à partir de 5 µL de lysat additionnés de 50 µL de LAS (Luciferase Assay Substrate) contenant la D-Luciférine et les

cofacteurs nécessaires à l'activité enzymatique (ATP, Mg²⁺). L'acquisition (10 secondes) des photons émis est réalisée 10 secondes après l'ajout du LAS.

La mesure de l'activité de la Nluc est réalisée avec le kit Nano-Glo® Luciferase Assay System (Promega). Les cellules sont incubées dans 100 µL de Nano-Glo® Luciferase Assay Reagent pendant 3 minutes à température ambiante. Ce réactif permet à la fois la lyse des cellules et la réaction enzymatique en apportant la furimazine et les co-facteurs nécessaires. L'acquisition (10 secondes) des photons émis est effectuée sur la totalité du lysat.

5. Méthodes d'expérimentation animale

L'ensemble des procédures d'expérimentation animales ont été réalisées selon les directives européennes et ont été approuvées par le comité d'éthique local CEEA50 et le ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation sous les numéros APAFIS # 11359 et 11434.

5.1. Hébergements

Les souris ont été hébergées à l'animalerie conventionnelle A1 (responsable Mme. Laetitia Medan) ou à l'animalerie A2 (responsable Dr. Benoit Rousseau) de l'Université de Bordeaux. Les souris sont maintenues selon un cycle jour/nuit de 12 heures avec un apport illimité d'eau et de nourriture.

5.2. Anesthésie

Les souris sont anesthésiées par inhalation d'isoflurane (Belamont, Nicholas Piramal Limited, Londres, R.U.) qui est un agent halogéné permettant une induction rapide de l'anesthésie des animaux ainsi qu'une récupération dès l'arrêt de l'exposition. Lors de l'induction, l'animal est placé dans une boîte hermétique traversée par le flux d'air (1 L/min) contenant 5 % d'isoflurane. Une fois anesthésié, le museau de l'animal est placé dans un masque avec un flux d'air (0,3 L/min) contenant 2 % d'isoflurane, tout le long de l'expérience. L'air expiré contenant de l'isoflurane est ensuite piégé sur des filtres à charbon actif.

5.3. Préparation des animaux

Les souris anesthésiées sont rasées avec une tondeuse puis épilées à la crème dépilatoire (Veet® peaux sensibles). Elles sont ensuite rincées à l'eau tiède. Le rasage des souris permet une meilleure propagation des photons en imagerie et des ultrasons lors de l'hyperthermie. Il permet également de s'affranchir de l'auto-fluorescence du pelage.

5.4. Génération de xénogreffes sous-cutanées

La génération de tumeurs est réalisée par implantation sous-cutanée de cellules tumorales en suspension ($2 \cdot 10^6$ cellules/100 μ L de PBS stérile) au niveau des pattes arrières ou du flanc sur les souris anesthésiées. Des tumeurs générées sont obtenues dès 6 semaines pour les cellules U87 (5 mm) ou 3 jours pour les cellules RM1 (7 - 8 mm).

5.5. Injection des NPMs

Les NPMs sont injectées de trois manières différentes selon l'étude. Elles peuvent être injectées en même temps que les cellules tumorales lors de la formation de xénogreffes sous-cutanées avec des cellules contenant des NPMs. Dans d'autres études, elles peuvent être injectées par voie intra-tumorale à une concentration de 1,3 ou 0,6 mg d'oxyde de fer/tumeur dans un volume de 40 μ L pour les tumeurs RM1 ou un volume de 10 μ L pour les tumeurs U87. Enfin, elles peuvent être injectées par voie intraveineuse dans la veine de la queue à une concentration de 750 μ g d'oxyde de fer dans 100 μ L de PBS.

5.6. Analgésie

Lors des traitements d'hyperthermie, les souris reçoivent une injection par voie intra-péritonéale de buprénorphine (2,5 μ g pour une souris de 25 g dilués dans 100 μ L de PBS) dès la fin du traitement en prévention de la douleur. L'injection est répétée si nécessaire.

5.7. Prélèvement des tumeurs

Le prélèvement des tumeurs est effectué après euthanasie des souris par dislocation cervicale sous anesthésie. Chaque prélèvement est rincé dans du PBS puis conservé dans une capsule en gélatine (Electron Microscopy Sciences) et immergé dans une matrice d'incorporation (OCT, CellPath). La matrice est rapidement solidifiée en plongeant, sans immersion, la capsule dans de l'isopentane refroidi par de l'azote liquide. Les capsules sont ensuite conservées à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pour l'histologie (cf. 7).

6. Méthodes d'imagerie

6.1. Imagerie de bioluminescence et de fluorescence

6.1.1. Appareillage

Les images de BLI et FRI *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées avec le Lumina LT (Perkin Elmer, Boston, USA) (Figure 27-A). Il est composé d'une boîte noire hermétique aux photons extérieurs pour éviter les interférences de la lumière ambiante et d'un plateau thermostaté à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, mobile et autorisant 4 champs de vue. Un masque d'anesthésie à l'isoflurane est installé pour les études *in vivo*. Le système de détection est une caméra CCD noir/blanc de haute sensibilité (1024 x 1024 pixels de $13 \times 13\text{ }\mu\text{m}$) refroidie à $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$. Les pixels peuvent être couplés électroniquement (binning) pour augmenter la sensibilité de la détection. Pour la fluorescence, le système est équipé d'une source de lumière blanche filtrée pour l'excitation (10 filtres d'excitation avec des bande-passantes de 30 nm) et de 4 filtres d'émission positionnés devant la caméra (Figure 27-B).

Le contrôle du Lumina LT et l'analyse des données obtenues sont effectués par le logiciel Living Image (Perkin Elmer). Les images de fluorescence ou de bioluminescence sont converties en utilisant une échelle de fausse-couleurs. Les images représentant la distribution spatiale des photons émis sont superposées à la photographie de l'échantillon. La quantification des signaux est réalisée en plaçant manuellement une région d'intérêt (region of interest = ROI) sur la zone à quantifier. L'intensité lumineuse dans la ROI est exprimée en photons par seconde par cm^2 en tenant compte de l'angle solide (en stéradian) ($\text{photons}/\text{sec}/\text{cm}^2/\text{sr}$).

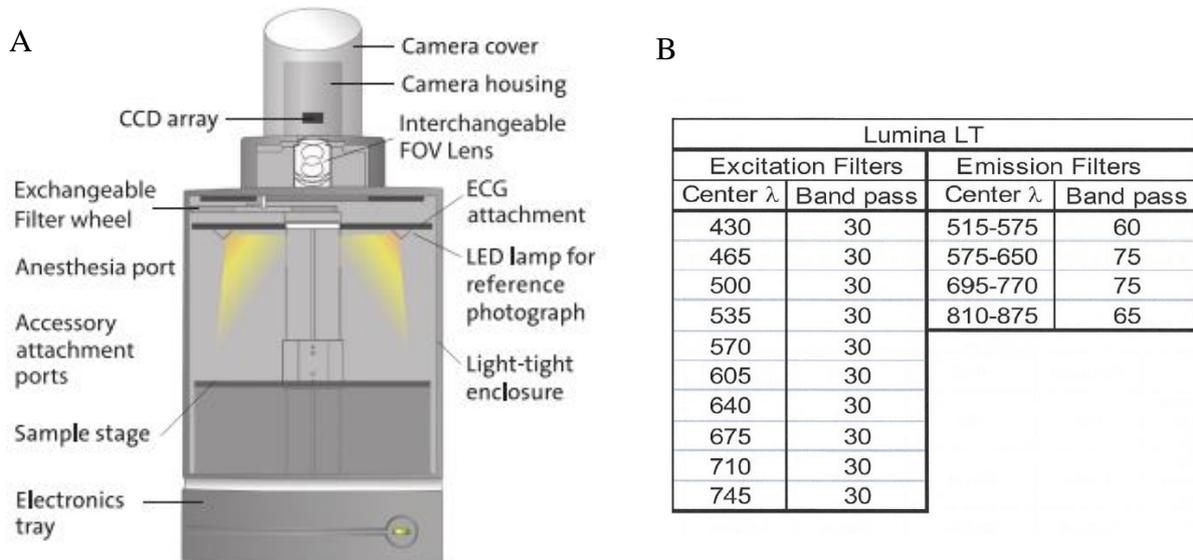


Figure 27 : Système d'imagerie Lumina LT. (A) Schéma détaillé du système d'imagerie Lumina LT. (B) Filtres d'excitation et d'émission disponibles sur le Lumina LT.

6.1.2. Imagerie de bioluminescence

Les luciférases

La luciférase Firefly (LucF), dont le substrat est la D-Luciférine, vient de *Photinus pyralis*, une luciole d'Amérique du Nord. La LucF catalyse l'oxydation de la luciférine réduite en présence d'oxygène (O_2), d'adénosine triphosphate (ATP) et de magnésium (Mg^{2+}) pour donner de l'oxyluciférine, du dioxyde de carbone (CO_2), de l'adénosine monophosphate (AMP), du diphosphate (PPi) et des photons d'une longueur d'onde de 562 nm (Figure 28) (Close *et al.*, 2011; Paley & Prescher, 2014).

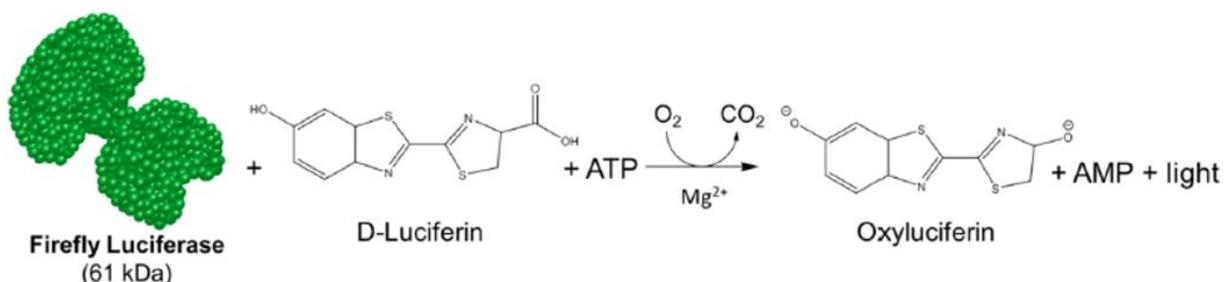


Figure 28 : Réaction enzymatique de la Luciférase firefly. La luciférase firefly catalyse la D-Luciférase en présence d'ATP, d' O_2 et de Mg^{2+} en oxyluciférase, AMP, PPi, CO_2 et photons (England *et al.*, 2016).

La nanoluciférase (Nluc) est une petite luciférase de 19,1 kDa dont le substrat est la furimazine. Elle est extraite de la luciférase produite par *Oplophorus gracilirostris*, une crevette de mer, composée de deux sous-unités de 35 et 19 kDa. Les propriétés de bioluminescence de cette luciférase sont contenues dans la petite sous-unité. Bien qu'elle soit instable, l'optimisation structurale et l'ajout d'un nouveau substrat ont permis de créer un système de bioluminescence très efficace. La Nluc catalyse l'oxydation de la furimazine réduite en présence d'oxygène pour donner de la furimamide, du dioxyde de carbone et de la lumière (Figure 29) (England *et al.*, 2016; Yao *et al.*, 2018).

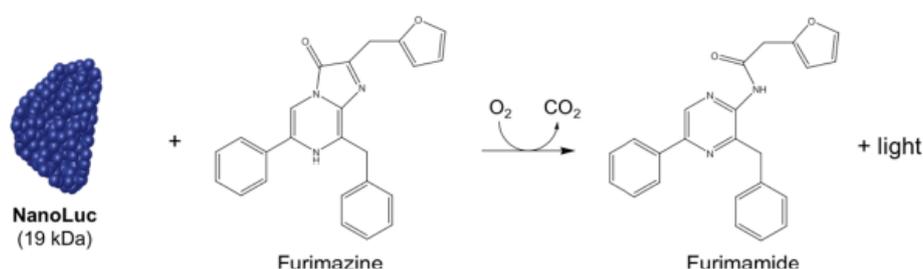


Figure 29 : Réaction enzymatique de la Nanoluciférase. La Nluc catalyse la furimazine en présence d'O₂ pour donner de la furimamide, du CO₂ et de la lumière (England *et al.*, 2016).

Protocole

Pour l'imagerie de bioluminescence de la LucF des cellules en culture, la D-Luciférine (Promega, Madison, USA) est directement ajoutée dans le milieu de culture DMEM complet sans rouge de phénol à une concentration de 0,6 mM. Quatre minutes après l'ajout du substrat, la plaque est placée sur le plateau thermostaté et le signal BLI est mesuré 5 minutes après l'ajout du substrat.

Pour les études *in vivo*, les souris reçoivent une injection intrapéritonéale de D-Luciférine (2,9 mg dans 100 µL de PBS) ou de la furimazine (20 µg dans 100 µL de PBS ; Promega) pour l'imagerie de la LucF ou de la Nluc, respectivement. Après 5 minutes, l'animal est anesthésié puis placé sur le plateau thermostaté et l'acquisition est déclenchée 8 minutes après l'injection. Les acquisitions d'une photographie (100 ms) et de l'image de BLI (1 minute avec un binning 4x4) sont réalisées successivement. Le délai entre la mesure du signal BLI de la LucF et de la Nluc sur un même animal est au minimum de 4 heures.

6.1.3. Imagerie de fluorescence par réflexion

Les fluorophores

Le Dy700 (Dyomics, Allemagne) est utilisé pour suivre les NPMs lors des études *in vitro* et des études *in vivo*. Il possède une longueur d'onde d'excitation de 707 nm et une longueur d'onde d'émission de 730 nm (Figure 30-A). Les longueurs d'ondes se situent à la limite du spectre visible et du spectre du proche infrarouge ce qui permet d'utiliser ce fluorophore autant dans les études *in vitro* que dans les études *in vivo*.

Sur un autre type de NPMs, la cyanine 3 (Cy 3) et la cyanine 7.5 (Cy 7.5) (Lumiprobe) sont utilisées en combinaison pour le suivi des NPMs dans les études *in vitro* et *in vivo*. La Cy 3 a une longueur d'onde d'excitation de 555 nm et une longueur d'onde d'émission à 570 nm (Figure 30-B). Elle est utilisée pour les études *in vitro*, la microscopie confocale et la cytométrie en flux. La Cy 7.5 possède une longueur d'onde d'excitation à 788 nm et une longueur d'onde d'émission à 808 nm (Figure 30-C). Elle est utilisée uniquement pour les études *in vivo*. La combinaison des deux cyanines permet de réaliser des études optimales *in vitro* et *in vivo* sans les contraintes techniques associées, comme l'absence des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission dans l'infrarouge sur les microscopes confocaux ou l'absorption et la diffusion des photons émis à des longueurs d'ondes inférieures à 600 nm dans les études *in vivo*.

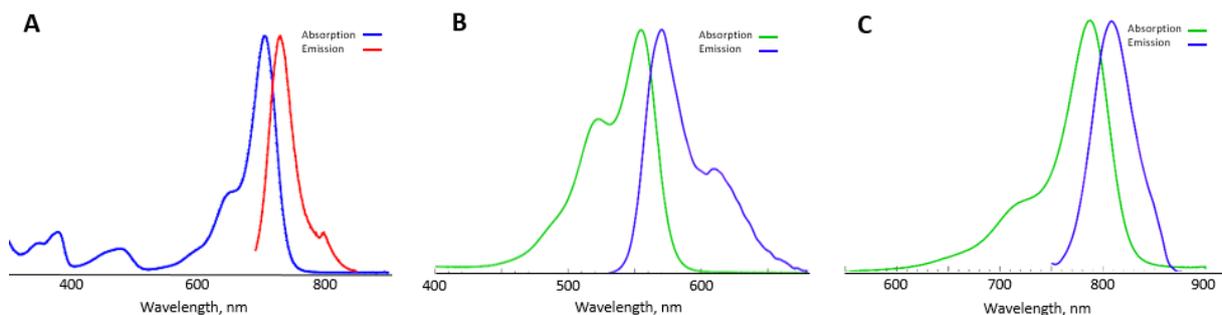


Figure 30 : Spectres d'excitation et d'émission des fluorophores. Spectres d'excitation et d'émission des fluorophores Dy700 (A), Cy 3 (B) et Cy 7.5 (C).

Protocole

Les animaux anesthésiés sont placés sur le plateau chauffant. La séquence d'acquisition comprend une photographie en noir et blanc de l'animal (100 ms) puis la mesure de la

fluorescence. Pour la détection du fluorophore Cy 7.5, le filtre d'excitation à 745 nm +/- 30 nm et le filtre d'émission à 810 – 875 nm sont utilisés. Pour la détection du fluorophore Dy700, le filtre d'excitation à 640 nm +/- 30 nm et le filtre d'émission à 695 – 770 nm sont utilisés (1 seconde ; binning 4 x 4).

6.2. Imagerie infrarouge

Le suivi de la température tumorale lors d'une hyperthermie magnétique a été effectué à l'aide d'une caméra thermique PI 200/230 (Optris, Allemagne) fixée sur un bras amovible au-dessus de la bobine (système DM3 ; cf. 8.2.1.). Cette caméra thermique contient une caméra infrarouge et une caméra visible permettant de superposer les deux types d'images. La caméra dispose d'une plage de températures larges allant de -20 °C à 900 °C. Le contrôle de la caméra et l'analyse des données obtenues sont réalisés grâce au logiciel Optris PIX Connect (Optris).

7. Histologie

7.1. Obtention des coupes de tissus et des cellules fixées

Les tumeurs congelées dans de l'OCT sont coupées au cryostat (Leica, Allemagne). Les coupes, d'une épaisseur de 10 µm, sont déposées sur une lame de microscopie IHC (Dako). Les coupes et les cellules cultivées sur des lamelles sont fixées avec du paraformaldéhyde (PFA) à 4 % (v/v) (Electron Microscopy Sciences) pendant 15 minutes à température ambiante. Les échantillons sont rincés 4 fois au PBS pendant 10 minutes à température ambiante avant d'être utilisés.

7.2. Immunohistochimie

7.2.1. Cellules vivantes

Les cellules contenant des NPMs sont dans un premier temps colorées avec la sonde fluorescente nucléaire bleue, le Hoechst 33342 (Thermo Fisher) à une concentration de 2 µg/mL dans du PBS pendant 5 minutes à 37 °C. La sonde fluorescente verte, le LysoTracker™ (Thermo

Fischer), a ensuite été utilisée à une concentration de 100 nM dans du PBS pendant 1 minute à température ambiante permettant de colorer les vésicules acides telles que les lysosomes. Les cellules sont ensuite trypsinées, lavées au PBS et le culot cellulaire est re-suspendu dans du PBS supplémenté de 2 mM d'EDTA et 0,5 % (v/v) de SVF. Les images ont été acquises sur les cellules en suspension à l'aide d'un microscope confocal SP5 (Leica). Le fluorophore Dy700, présent à la surface des NPMs, est excité par le laser Hélium-Néon à 633 nm et l'émission a été mesurée pour des longueurs d'ondes comprises entre 640 et 770 nm. Le Hoechst 33342 est excité par la diode laser à 405 nm et l'émission est mesurée pour des longueurs d'ondes comprises entre 410 et 510 nm. Le LysoTracker™ est excité par le laser DPSS à 561 nm et l'émission est mesurée pour des longueurs d'ondes comprises entre 570 et 650 nm. Les images sont analysées avec le logiciel Image J.

7.2.2. Cellules et coupes de tumeurs fixées

Les échantillons sont incubés dans tampon de blocage (tampon de lavage supplémenté de 1 % (m/v) de BSA et 5 % (v/v) de SVF) pendant 1 heure à température ambiante en chambre humide. L'immunomarquage est ensuite effectué en utilisant un anticorps monoclonal de souris dirigé contre la protéine Lamp-1 (lysosomal-associated membrane protein 1) (Santa Cruz Biotechnology) à une concentration de 2 µg/mL pendant une nuit à 4 °C. Après plusieurs lavages avec du tampon de lavage (PBS stérile supplémenté de 0,05 % (v/v) de triton), l'anticorps de chèvre dirigé contre les anticorps de souris et couplé au fluorophore Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher) est incubé à une concentration de 8 µg/mL pendant 1 heure à température ambiante. Le marquage nucléaire au DAPI (Invitrogen) est ensuite réalisé à une concentration de 0,286 µM pendant 15 minutes à température ambiante. Après lavages, les cellules sur lamelle et les coupes de tumeur sur lame sont protégées avec du milieu de montage fluoromount-G™ (Electron Microscopy Sciences). Les analyses sont ensuite réalisées sur un microscope confocal SP5 (Leica). La détection du fluorophore Cy 3, présent à la surface des NPMs, est effectuée par excitation au laser Hélium-Néon à 543 nm et l'émission est mesurée pour des longueurs d'ondes comprises entre 548 et 630 nm. Le fluorophore Alexa Fluor 488 est excité par le laser Argon à 488 nm et l'émission est mesurée pour des longueurs d'ondes comprises entre 493 et 540 nm. Le DAPI est excité par une diode laser à 405 nm et l'émission est mesurée pour des longueurs d'ondes comprises entre 410 et 480 nm. Les images sont analysées avec le logiciel Image J.

7.3. Coloration au bleu de Prusse

La coloration au bleu de Prusse permet de colorer le fer présent dans les cellules en bleu foncé et les noyaux en rose. La coloration au bleu de Prusse est effectuée sur cellules et tissus fixés avec le kit « Irons Stain Kit » (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) selon les instructions du fabricant. La solution de coloration du fer est préparée extemporanément en mélangeant un volume égal de la solution de potassium ferrocyanide et de la solution d'acide hydrochlorique. Les échantillons sont incubés avec la solution de coloration de fer pendant 1 heure à température ambiante. Après plusieurs lavages au PBS, ils sont incubés avec la solution de parasosaniline pendant 5 minutes à température ambiante. Après coloration, les coupes de tumeurs uniquement sont rapidement déshydratées par des bains d'alcool à concentrations croissantes puis avec du xylène. Les échantillons sont recouverts d'un milieu de montage DPX (Leica) et d'une lamelle. Les analyses sont effectuées à l'aide d'un microscope à lumière blanche inversée (Leica) doté d'une caméra Nikon.

7.4. Coloration HES

La coloration HES (hématoxyline, éosine, safran) permet de mettre en évidence des atteintes cellulaires et tissulaires. L'hématoxyline colore les noyaux en bleu foncé, l'éosine colore le cytoplasme en rose et le safran les fibres de collagène en orange.

La coloration est réalisée sur des lames de tissus fixés. Les lames sont plongées dans une solution d'hématoxyline prête à l'emploi (RAL Diagnostics, Martillac, France) préalablement filtrée pendant 2 minutes. Elles sont ensuite lavées successivement avec de l'eau distillée (30 secondes), de l'eau contenant 1 % d'acide chlorhydrique (10 secondes) et de l'eau du robinet (1 min). Les lames sont ensuite plongées dans une solution aqueuse d'érythrosine 239 (10 g /L ; RAL Diagnostics) pendant 1 minute. Elles sont lavées à l'eau du robinet puis rapidement déshydratées dans des bains successifs d'alcool de 80°, 95° et 100°. Pour finir, les lames sont plongées dans une solution de safran naturel (10 g/L d'alcool absolu, RAL Diagnostics) pendant 15 secondes et sont rapidement lavées dans deux bains d'alcool absolu puis un bain de toluène. Les lames sont recouvertes de milieu de montage DPX et d'une lamelle. Les analyses sont effectuées à l'aide d'un microscope à lumière blanche inversée (Leica) doté d'une caméra Nikon.

7.5. Microscopie électronique à transmission sur cellules fixées

Les NPMs sont ajoutées directement dans le milieu de culture (IONPs-Tat et IONPs-PEG = 100 µg/mL et NF-Q = 250 µg/mL) pendant 24 heures. Après 2 lavages au PBS, les cellules sont fixées avec 1,6 % de paraformaldéhyde et 2 % de glutaraldéhyde dans un tampon de cacodylate à 0,08 M (pH 7,4) pendant 30 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite lavées avec un tampon cacodylate à 0,1 M (pH 7,4) et incubées dans un mélange de 1 % de tétraoxyde d'osmium et 1 % de ferricyanure de potassium dans un tampon de cacodylate à 0,1 M pendant 2 heures sur de la glace à l'abri de la lumière. Après des lavages à l'eau, les échantillons sont colorés dans un bloc d'une solution aqueuse d'acétate d'uranyle à 0,05 % pendant 30 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. Succinctement, les cellules sont lavées à l'eau, déshydratées à l'éthanol puis incluses dans un mélange 50/50 d'éthanol pur et de résine époxy (Epon 812 ; Delta Microscopies, Toulouse) pendant 2 heures puis dans la résine à 100 % toute la nuit à température ambiante. La polymérisation de la résine est effectuée à 60 °C pendant 24 à 48 heures. Les échantillons sont ensuite sectionnés avec un couteau à diamant (Diatome, Biel-Bienne, Suisse) sur un ultra-microtome (EM UCT, Leica). Les sections ultrafines (65 nm) sont placées sur une grille de cuivre et colorées avec de l'Uranyle (contraste positif) (Delta Microscopies, Toulouse) et du citrate de plomb afin de renforcer le contraste. La MET a été effectuée sur le microscope Hitachi H7650 couplé à une caméra ORIUS SC1000 11 MPx.

8. Méthodes d'hyperthermie

8.1. Chauffage au bain-marie

8.1.1. Etudes *in vitro*

Afin d'optimiser le chauffage, le milieu de culture est remplacé par du milieu de culture préalablement chauffé. La plaque est ensuite placée sur l'eau à la température souhaitée (températures comprises entre 42 °C et 45 °C pendant 2 ; 5 ; 8 ou 10 minutes). Les cellules sont ensuite remises à l'incubateur pendant 6 heures.

8.1.2. Etudes *in vivo*

Les souris anesthésiées sont placées sur une plaque de plexiglass au-dessus du bain-marie et leur patte portant la tumeur est plongée dans l'eau pendant 5 minutes à une température de 43 °C, 44 °C, 45 °C ou 47 °C (Figure 31).



Figure 31 : Dispositif de chauffage au bain marie des pattes arrière de souris. La souris est placée sur une plaque de plexiglass au-dessus du bain marie dans laquelle un trou est formé pour insérer la patte de la souris à chauffer.

8.2. Hyperthermie magnétique

8.2.1. Champ magnétique alternatif à haute fréquence

Le champ magnétique alternatif à haute fréquence est appliqué avec le système DM3 (NanoScale, Biomagnetic, Saragosse, Espagne) (Figure 32) qui est contrôlé par le logiciel Maniac (NanoScale Biomagnetic) installé sur l'ordinateur DM100. Le champ magnétique est appliqué entre deux bobines qui sont séparées par une fenêtre d'imagerie. Une caméra infrarouge (Optris PI 200 / 230) est placée au-dessus de la fenêtre d'imagerie afin de mesurer la variation de température en temps réel lors de l'application du champ magnétique (cf. 6.2.). Des sondes optiques (NanoScale, Biomagnetic) sont également reliées au DM3 afin de mesurer la température à l'intérieur d'un échantillon. Le système dispose d'un lit thermostaté placé au niveau des bobines et d'un masque d'anesthésie (Figure 32-A). Tous les éléments présents au niveau du DM3 sont amagnétiques. Ce système est adapté aux études *in vitro* et *in vivo* (Figure 32-B et C).

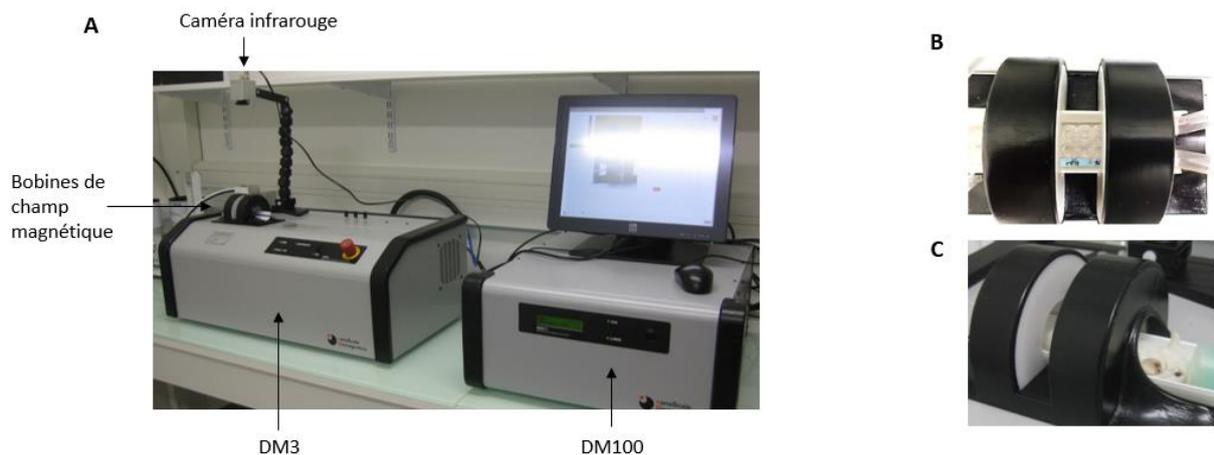


Figure 32 : Système d'application du champ magnétique par le DM3. A- Il est contrôlé par un ordinateur (DM100) et le champ magnétique est appliqué au niveau des deux bobines sur le DM3. Il est doté d'une caméra infrarouge permettant de mesurer l'augmentation de la température lors de l'application du champ magnétique. B et C- Le système est approprié pour les études *in vitro* et *in vivo*.

Quatre fréquences de champ magnétique sont disponibles avec une large gamme d'amplitudes (Tableau 11).

Fréquences (kHz)	Amplitudes (kA/m)	Amplitudes (mT)
146	3,5 - 19	4,4 – 23,83
217	3,5 - 17	4,4 – 21,32
344,5	3,5 - 15	4,4 – 18,81
473,5	3,5 - 12	4,4 – 15,05

Tableau 11 : Fréquences et amplitudes du champ magnétique disponibles sur le DM3. 1 kA/m = 1,254 mT

Les fréquences et les amplitudes du champ magnétique ont été vérifiées à l'aide de la sonde AC Magnetic Field Probe (NanoScience Laboratory). La mesure a été effectuée entre les deux extrémités des bobines pour chaque fréquence du champ magnétique (Figure 33).

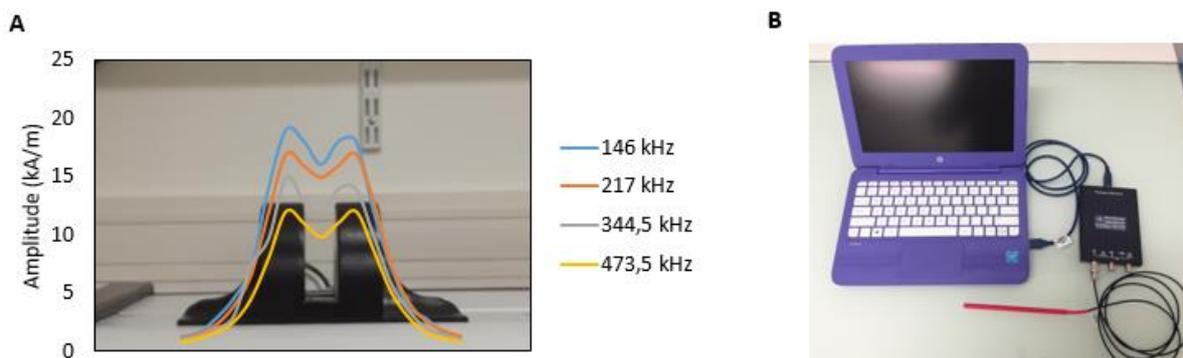


Figure 33 : Caractérisation du champ magnétique alternatif à haute fréquence. A- Mesure de la fréquence et de l’amplitude du champ magnétique entre les deux bobines de champ magnétique. **B-** Sonde AC Magnetic Field Probe permettant la mesure du champ magnétique.

8.2.2. Induction d’une hyperthermie magnétique *in vitro*

Les cellulesensemencées dans une barrette 16 puits Nunc™ LabTeck® et incubées avec des NPMs (cf. 4.5.) sont placées sur un lit thermostaté. La température du milieu de culture est suivie à l’aide d’une sonde optique (OTG-M420, Opsen™) en temps réel. Dès que la température du milieu atteint 37 °C, le champ magnétique alternatif est appliqué pendant 1 heure à une fréquence de $f = 473,5$ kHz et une amplitude de $H = 12$ kA/m. La barrette 16 puits est ensuite remise dans l’incubateur.

8.2.3. Induction d’une hyperthermie magnétique *in vivo*

Les souris portant des tumeurs contenant des NPMs et des tumeurs sans NPMs (cf. 5.5.) sont anesthésiées puis placées sur un lit thermostaté pour éviter l’hypothermie. Un masque d’anesthésie amagnétique permet de maintenir la souris anesthésiée pendant toute la procédure. Une compresse stérile imbibée de sérum physiologique est placée sur les yeux de la souris pour éviter qu’ils sèchent. La température rectale et la température tumorale sont suivies en temps réel pendant l’application du champ magnétique à l’aide d’une sonde optique (Opsen™) et d’une caméra thermique (Optris), respectivement. Le champ magnétique est appliqué pendant 15 minutes à une fréquence de $f = 473,5$ kHz et une amplitude de $H = 12$ kA/m.

8.3. Ultrasons focalisés de haute intensité

8.3.1. Appareillage

Les HIFU sont appliqués avec le système Benchtop (IGT, Image Guided Therapy, Bordeaux) situé sur la plateforme Vivoptic à l'université de Bordeaux. Il est composé d'un transducteur d'ultrasons mono-élément interchangeable de 1,5 ou 2,5 MHz dont la puissance et le temps d'application sont contrôlés par un générateur. Le transducteur est placé dans une cuve remplie d'eau continuellement dégazée et tempérée à 37 °C. La souris est placée sur un lit à effleurement de l'eau et est maintenue anesthésiée grâce à un masque fixé sur le support. Le lit est percé et recouvert d'une membrane afin de laisser passer les ondes ultrasonores. Le lit est guidé par bras motorisé permettant de le faire bouger dans les axes x ; y et z de manière à placer la zone à traiter au niveau du point focal des ultrasons. Le bras motorisé est contrôlé par le même générateur que celui des ultrasons. Cela permet également de déplacer le lit de manière contrôlée et coordonnée lors de l'application des ultrasons. Un thermomètre avec une sonde optique permet de vérifier que l'eau dans la cuve du transducteur soit à 37°C et un second thermomètre avec une sonde rectale permet de suivre la température corporelle de la souris (Figure 34).

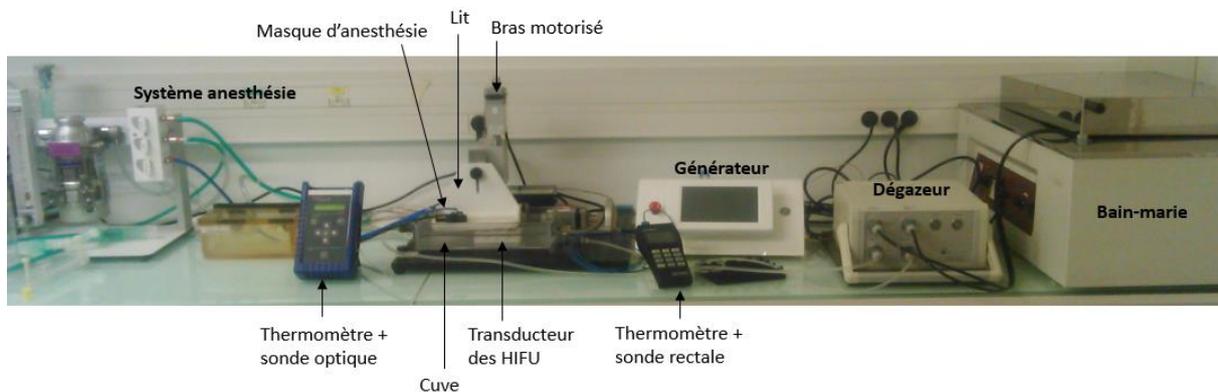


Figure 34 : Système *in vivo* pour l'application d'ultrasons focalisés de haute intensité

8.3.2. Protocole d'hyperthermie par HIFU

La souris est placée sur le ventre de façon à chauffer la peau face ventrale des pattes arrières (Figure 35). Lors du placement de l'animal, il faut vérifier qu'aucune bulle d'air ne se

forme entre l'eau dégazée et la peau de la souris afin d'éviter la réflexion des ondes ultrasonores. Le point focal des HIFU est situé sur la partie ventrale et loin d'un os car ces derniers ont une plus grande absorption de l'énergie ultrasonore que les autres tissus. Du gel pour échographie est placé sur la peau de la souris au niveau du point d'entrée des ultrasons pour faciliter leur propagation. Pour limiter les brûlures lors de la sortie des ultrasons au niveau de la partie dorsale, du gel échographie et une mousse absorbant les ultrasons sont placés sur la souris. Les HIFU sont ensuite appliqués selon plusieurs conditions comprises entre 2,5 et 25 % de l'intensité maximale du transducteur pendant 20 secondes à 10 minutes pour le transducteur de 1,5 MHz. Pour celui de 2,5 MHz, les HIFU sont appliqués entre 18 et 25% de l'intensité maximale du transducteur pendant 20 à 40 secondes.

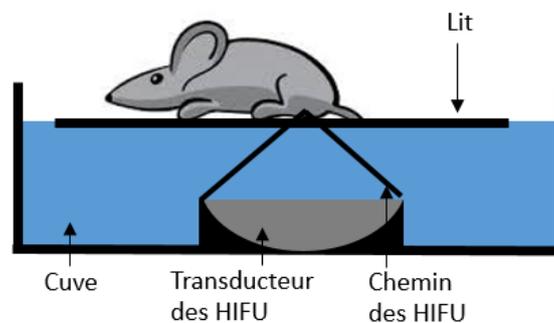


Figure 35 : Positionnement de la souris sur le système HIFU

8.4. Ultrasons focalisés de haute intensité guidés par IRM

8.4.1. Appareillage

Le système d'hyperthermie HIFU guidés par IRM (MRgHIFU) est situé à l'IHU Lyric (Pessac). Il se compose d'un transducteur de 8 éléments d'une fréquence de 2,5 MHz (IGT, Bordeaux) placé dans une IRM préclinique de 9,4 T (Bruker, Wissembourg, France). Un patch et une sonde rectale permettent de mesurer en temps réel la fréquence et la température corporelle, respectivement. L'ensemble des matériaux utilisés dans ce système sont IRM compatible (amagnétique). Le transducteur est contrôlé par le logiciel Thermoguide (IGT) et peut être déplacé dans les axes x et y de manière électronique. L'IRM est contrôlée par le logiciel ParaVision 6.0 (Bruker, Ettlingen, Allemagne). Les deux logiciels sont également connectés ensemble afin d'effectuer le rétrocontrôle automatique de la température. Grâce aux

mesures de thermométrie par IRM, l'intensité des HIFU appliqués au niveau de la ROI est contrôlée afin de suivre les paramètres de rétrocontrôle prédéfinis. (Figure 36).

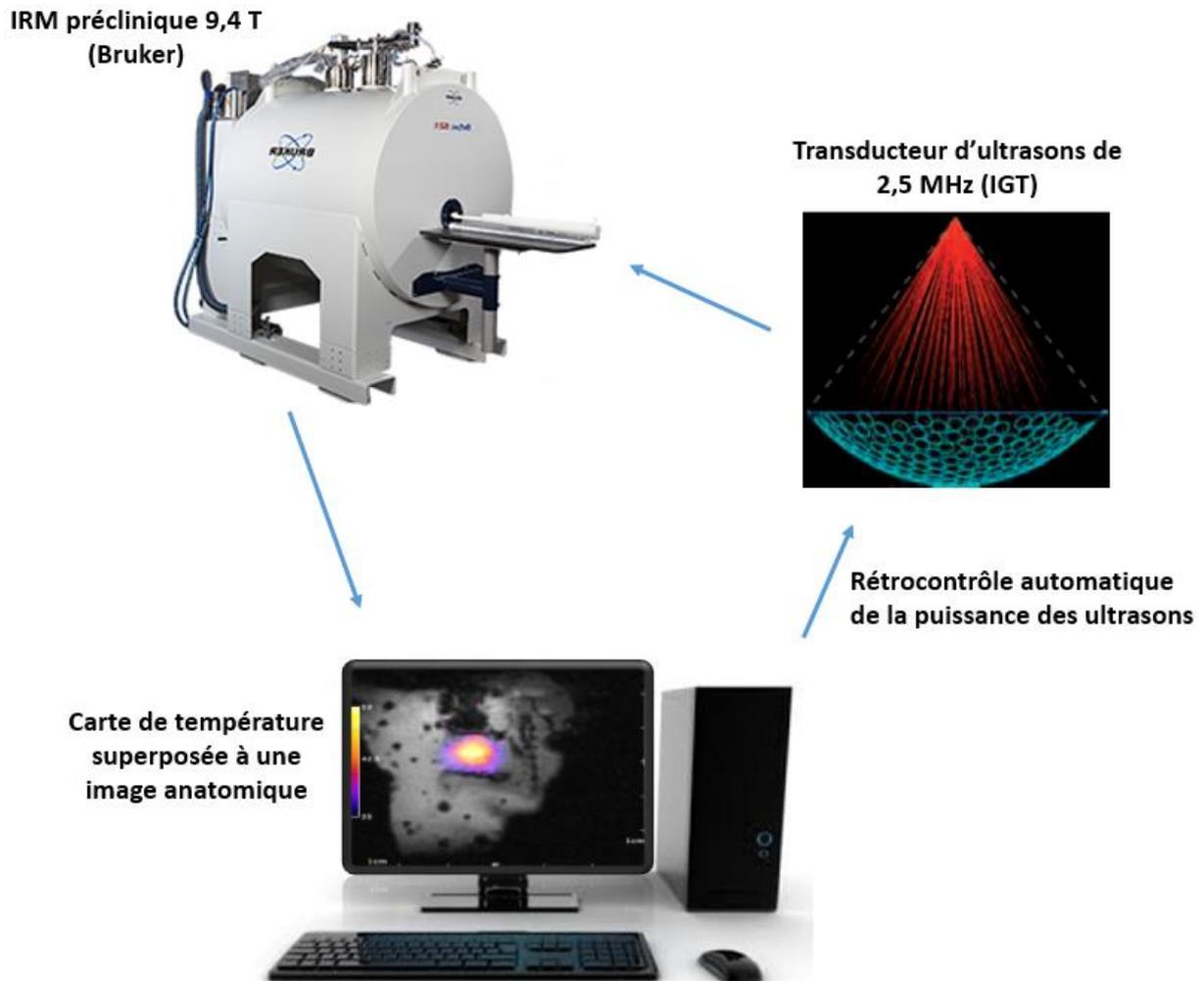


Figure 36 : Rétrocontrôle en temps réel de la température par IRM. Le transducteur d'ultrasons placé dans l'IRM chauffe la zone cible dont la variation de la température est mesurée par l'IRM. Lorsque la température souhaitée est atteinte, un rétrocontrôle automatique de la puissance des ultrasons est appliqué pour suivre le programme de rétrocontrôle de la température précédemment défini.

8.4.2. Placement de la souris dans le système MRgHIFU

La souris anesthésiée est allongée sur le ventre au niveau du lit thermostaté afin d'empêcher l'hypothermie. Une compresse imbibée de sérum physiologique est placée sur les yeux pour éviter qu'ils sèchent. Un patch mesurant la fréquence respiratoire est placé au niveau du thorax. Une sonde rectale, permettant de suivre la température de l'animal pendant le

traitement, est également utilisée. Une couverture (alèse) est placée sur la partie antérieure de la souris pour limiter la perte de chaleur sans gêner le positionnement du transducteur. Le point focal des ultrasons est positionné au niveau de la tumeur, sur le flanc gauche de la souris. Du gel échographique est placé aux points d'entrée et de sortie des ultrasons. Afin d'éviter la formation de bulles d'air qui pourraient réfléchir les ondes ultrasonores, plusieurs textures de gel échographique (dilution dans du NaCl 0,9 %) ont été utilisées. Un bloc de gel d'agarose à 3 % inclus dans le lit permet d'absorber les ultrasons à la sortie. Le transducteur d'ultrasons est placé au-dessus de la souris. La membrane est gonflée avec de l'eau dégazée de manière à obtenir un dôme d'environ 2 cm pour bien épouser la forme de la tumeur (Figure 37).

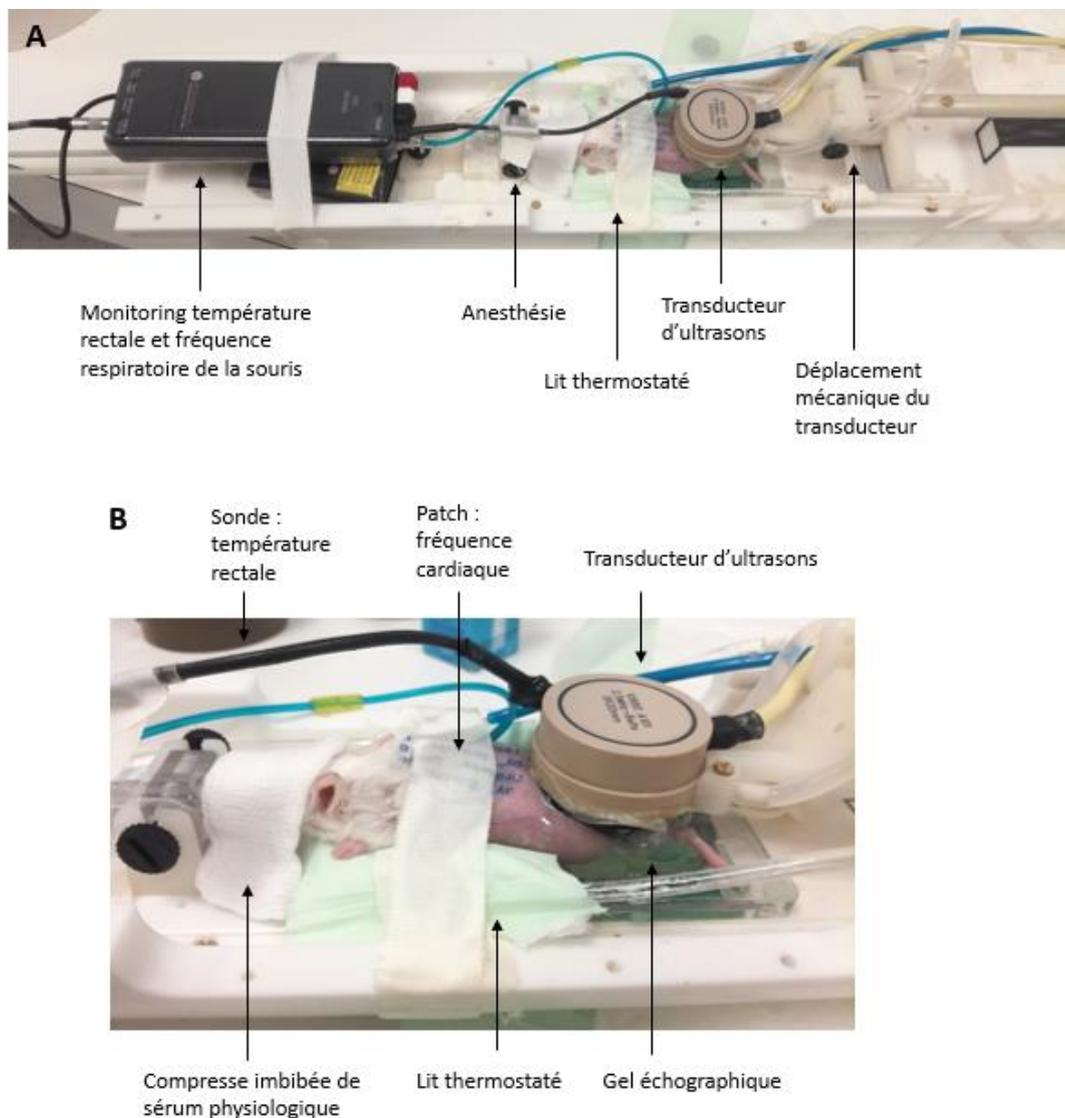


Figure 37 : Positionnement de la souris dans le système d'ultrasons focalisés de haute intensité guidés par IRM

8.4.3. Protocole d'hyperthermie par MRgHIFU

La souris anesthésiée est placée dans le système MRgHIFU comme décrit précédemment. Le protocole d'hyperthermie comprend plusieurs étapes :

- Vérification du positionnement du transducteur d'ultrasons. Il doit être éloigné des os, car ils absorbent fortement l'énergie ultrasonore en comparaison avec les autres tissus, et des viscères, car elles créées des artefacts de mouvements lors du rétrocontrôle de température. L'absence de bulle d'air est également vérifiée. La position du transducteur par rapport à la zone cible est validée à l'aide de 5 coupes axiales (Figure 38) et 5 coupes coronales (non montrées). Des tirs tests de faible intensité (10 x 500 ms à une intensité de 30 %) sont ensuite réalisés pour déterminer la position du point focal. Si besoin, le transducteur peut être déplacé dans les axes x et y grâce à un système motorisé contrôlé par le logiciel Thermoguide.

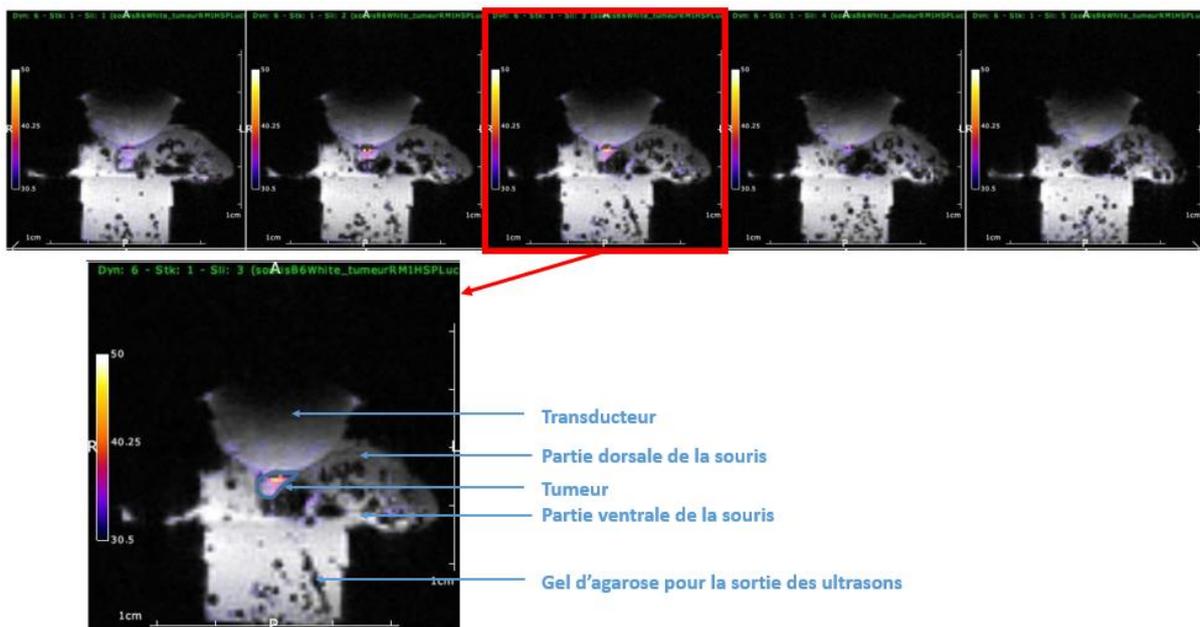


Figure 38 : Positionnement du point focal. Les 5 coupes axiales permettent de déterminer la position du point focal pour des tirs tests de faible intensité afin qu'il soit localisé au niveau de la tumeur.

- Détermination des 3 coupes coronales utilisées lors du rétrocontrôle. Le point ROI est également défini, c'est le pixel à partir duquel le rétrocontrôle est effectué (Figure 39).

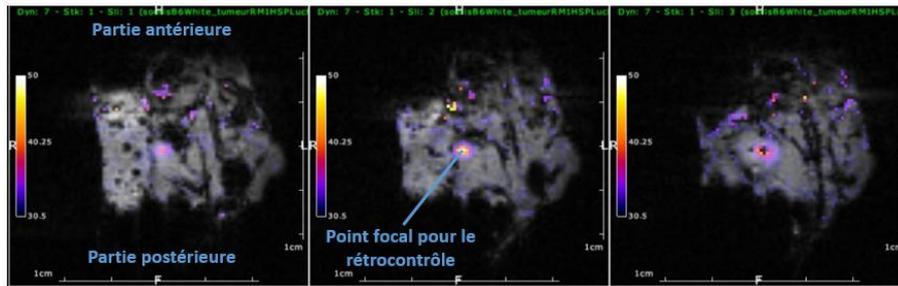


Figure 39 : Coupes coronales utilisées pour effectuer le rétrocontrôle de la température.

- Acquisition d'une image anatomique de la région d'intérêt avec la séquence RARE (Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement) (Tableau 12). Une seconde image est faite après le traitement d'hyperthermie permettant d'identifier d'éventuelles modifications anatomiques survenues lors du traitement d'hyperthermie.
- Mesure du bruit avec la séquence FLASH (Fast Low Angle Shot) sur les 3 coupes coronale précédemment définies pour le rétrocontrôle. Le bruit est ensuite déduit du signal du rétrocontrôle afin de s'assurer que le signal mesuré correspond à la variation de la température et pas à un artefact.
- Traitement d'hyperthermie par MRgHIFU en utilisant la séquence FLASH. En fonction du type d'hyperthermie souhaitée (thermoablation ou thermo-modulation), la boucle de thermorégulation de la température est différente (Tableaux 13 et 14).

A la fin du traitement d'hyperthermie, le refroidissement de la zone traitée est suivi pendant 1 minute. Les résultats de thermométrie sont ensuite analysés à l'aide du logiciel Matlab.

Séquence FLASH	Séquence RARE
<ul style="list-style-type: none"> - Temps d'écho (TE) = 5 ms - Temps de répétition (TR) = 25 ms - Champ de vue = 64 x 64 mm - Matrice = 96 x 96 - Résolution = 667 x 667 $\mu\text{m}^2/\text{pixel}$ - Epaisseur d'une coupe = 1 mm - Angle de bascule = 10° - Bande passante = 50 000 Hz - 1 dynamique = 2 secondes 40 	<ul style="list-style-type: none"> - Temps d'écho (TE) = 52,32 ms - Temps de répétition (TR) = 2000 ms - Temps d'acquisition = 2 min 8 s - Acquisition synchronisée avec la fréquence respiratoire - Facteur RARE = 8 - Echo spacing = 13,079 ms - Champ de vue = 51 x 51 mm - Matrice = 512 x 512 - Epaisseur de coupe = 1 mm - Nombre de coupes = 15 - Angle de bascule = 90° - Bande passante = 50 000 Hz

Tableau 12 : Paramètres des séquences IRM. La séquence FLASH est utilisée pour mesurer le bruit et lors du rétrocontrôle de la température et la séquence RARE est utilisée pour l'acquisition des images anatomiques.

	5 CEM ₄₃ 43 °C / 5 min	10 CEM ₄₃ 44 °C / 5 min	20 CEM ₄₃ 45 °C / 5 min	80 CEM ₄₃ 47 °C / 5 min
Programme de régulation de la température	10 dyn ; 30°C 20 dyn ; 35°C 30 dyn ; 40°C 35 dyn ; 43°C 160 dyn ; 43°C	10 dyn ; 30°C 20 dyn ; 35°C 30 dyn ; 40°C 40 dyn ; 44°C 165 dyn ; 44°C	10 dyn ; 30°C 20 dyn ; 35°C 30 dyn ; 40°C 40 dyn ; 45°C 165 dyn ; 45°C	10 dyn ; 30°C 20 dyn ; 35°C 30 dyn ; 40°C 40 dyn ; 45°C 50 dyn ; 47°C 175 dyn ; 47°C
Nombre total de dynamiques	225 dyn	225 dyn	225 dyn	225 dyn

Tableau 13 : Boucle de rétrocontrôle de la température lors de l'induction d'une hyperthermie modérée par MRgHIFU. Dyn = dynamiques (1 dynamique = 2 secondes 40)

	4096 CEM₄₃ 55 °C / 1 min	131072 CEM₄₃ 60 °C / 1 min (n°1)	131072 CEM₄₃ 60 °C / 1 min (n°2)
Programme de régulation de la température	10 dyn ; 30°C 20 dyn ; 40°C 30 dyn ; 50°C 40 dyn ; 55°C 65 dyn ; 55°C	10 dyn ; 30°C 20 dyn ; 40°C 30 dyn ; 50°C 40 dyn ; 55°C 50 dyn ; 60°C 75 dyn ; 60°C	10 dyn ; 30°C 20 dyn ; 35°C 30 dyn ; 40°C 40 dyn ; 45°C 50 dyn ; 50°C 60 dyn ; 55°C 65 dyn ; 60°C 95 dyn ; 60°C
Nombre total de dynamiques	115 dyn	125 dyn	145 dyn

Tableau 14 : Boucle de rétrocontrôle de la température lors de l'induction d'une thermoablation par MRgHIFU. Dyn = dynamiques (1 dynamique = 2 secondes 40).

9. Statistiques

L'ensemble des résultats est exprimé avec leur moyenne \pm SD (standard deviation ou écart-type). L'ensemble des études statistiques a été réalisé avec le logiciel GraphPad Prisme 7.0. Les résultats sont significativement différents pour une valeur de p de : $0,01 < p < 0,05 = *$; $0,001 < p < 0,01 = **$; $0,0001 < p < 0,001 = ***$ et $p < 0,0001 = ****$.

CHAPITRE 1

INDUCTION D'UNE HYPERTHERMIE MAGNETIQUE *IN VITRO* ET *IN VIVO*

OBJECTIFS

L'hyperthermie magnétique résulte de la production de chaleur par des NPMs placées dans un champ magnétique alternatif. Nanotherm™ est une thérapie par hyperthermie magnétique proposée par la société MagForce pour le traitement des glioblastomes et du cancer de la prostate (Johannsen *et al.*, 2005, 2007*b*). Pour le traitement des glioblastomes, le procédé Nanotherm™ associé à une radiothérapie améliore la survie des patients par rapport aux traitements classiques (protocole de Stupp : chirurgie + chimiothérapie + radiothérapie) (Maier-Hauff *et al.*, 2007, 2011). D'autres stratégies ont été proposées et expérimentées à l'échelle préclinique. Il a été montré que l'hyperthermie magnétique augmente la sensibilité des tumeurs vis à vis de la lyse cellulaire induite par les cellules NK (Kubista *et al.*, 2002), provoque la destruction des cellules du μ E (Kolosnjaj-Tabi *et al.*, 2014), permet l'expression locale de gènes pour la thérapie (Sandre *et al.*, 2017), permet la libération locale de médicaments à partir de nanoparticules thermosensibles (Guisasola *et al.*, 2018) ou induit la production de ROS par hyperthermie magnétique intra-lysosomale (Domenech *et al.*, 2013; Clerc *et al.*, 2018).

Néanmoins, il reste encore de nombreuses limitations à l'utilisation de l'hyperthermie magnétique comme traitement anticancéreux. La première est la voie d'injection des NPMs. La plus utilisée est la voie intra-tumorale car la quantité de NPMs nécessaire pour induire un effet thérapeutique ne peut actuellement pas être atteinte lors d'une injection intraveineuse. Dans la circulation sanguine, les NPMs sont reconnues, captées et éliminées par le système immunitaire, limitant ainsi leur accumulation dans la tumeur. La seconde est le pouvoir chauffant des NPMs. Les NPMs actuellement utilisées ne chauffent pas suffisamment pour induire un effet thérapeutique.

L'objectif de cette étude est de mettre en évidence, par imagerie *in vivo*, les paramètres essentiels à l'hyperthermie magnétique pour améliorer l'efficacité de cette thérapie. Pour cela, l'efficacité de trois types de NPMs ayant des caractéristiques différentes (pouvoir chauffant, modification de surface) a été comparée sur des lignées cellulaires identiques. Dans un deuxième temps, cette étude a montré que l'hyperthermie magnétique est capable de conduire à deux types d'hyperthermie, la thermoablation et l'hyperthermie modérée, en fonction de la dose thermique délivrée. Ces deux types d'hyperthermie peuvent être induite séparément ou en combinaison pour amener à une thermoablation tumorale centrale avec une hyperthermie modérée périphérique du μ E.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Hyperthermie magnétique induite avec des nanoparticules d'oxyde de fer décorées avec le peptide Tat

Ce travail, initié par Gauvin Hemery lors de sa thèse, a fait l'objet d'une collaboration. Les résultats présentés sont regroupés dans un manuscrit intitulé :

« Thermosensitive diblock elastin-like peptide (ELP) and cell-penetrating (Tat) peptide brush grafted on magnetic iron oxide nanoparticles: De-swelling by magnetic hyperthermia, internalization in tumor cells and strong disruption effect on lysosome membranes »

Gauvin Hemery, Pauline Jeanjean*, Emmanuel Ibarboure, Coralie Genevois, Franck Couillaud, Sabrina Lacomme, Etienne Gontier, Sarah MacEwan, Ashutosh Chilkoti, Sébastien Lecommandoux, Elisabeth Garanger, Olivier Sandre*

** Co-premiers auteurs*

1.1. Caractéristiques des IONPs-Tat et IONPs-PEG

Les IONPs (iron oxide nanoparticles) sont des nanoparticules d'oxyde de fer avec une morphologie sphérique (nanosphères) et un diamètre moyen de $11,7 \pm 3,1$ nm (Figure 40-A et B). Elles possèdent un pouvoir chauffant (SAR) de 167 W/g lorsqu'elles sont soumises à un champ magnétique alternatif d'une fréquence $f = 473,5$ kHz et d'une amplitude $H = 12$ kA/m.

Les IONPs ont été décorées par fixation covalente d'un peptide ELP₄₀₋₆₀-Tat de la séquence suivante : MGCGWPG-(VPGVG)₄₀-(VPGAG-VPGGG)₃₀-PGGS-YGRKKRRQRRR. Le bloc principal MGCGWPG contient un résidu de cystéine destiné à la fonctionnalisation. Le deuxième bloc (VPGVG)₄₀ est un ELP thermosensible (elastin-like polypeptide) avec une température de transition de 42 °C. Le troisième bloc (VPGAG-VPGGG)₃₀ est un ELP hydrophile utilisé pour stabiliser les IONPs dans des conditions aqueuses (Garanger *et al.*, 2015). Le bloc final YGRKKRRQRRR est la séquence peptidique Tat enrichie en arginine, dérivée du peptide TAT (Trans-Activator of Transcription) présent dans la capsidie du VIH-1 et fixée à l'ELP grâce à un espaceur PGGS. Cette séquence peptidique a été conçue

pour améliorer les propriétés de pénétration des IONPs dans les cellules (Richard *et al.*, 2003). Afin de mettre en évidence ses propriétés d'internalisation, un second lot d'IONPs fonctionnalisées avec du PEG a été synthétisé et utilisé en comparaison avec les IONPs-Tat. Une molécule fluorescence Dy700 a aussi été greffée pour un suivi *in vitro* et *in vivo* non-invasif des IONPs (Figure 40-A).

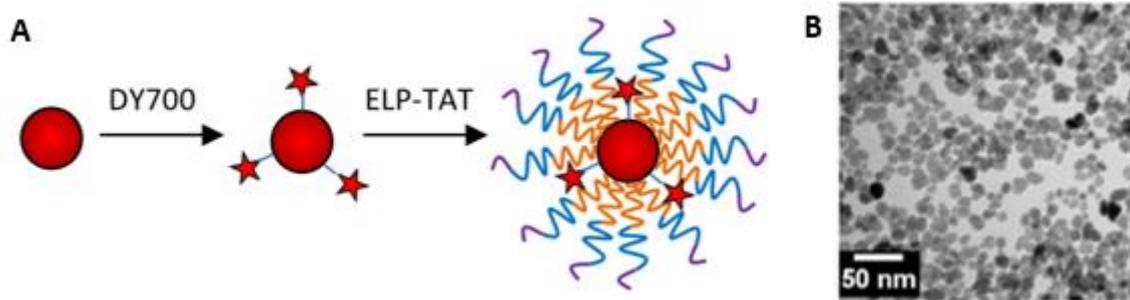


Figure 40: Nanoparticules IONPs-Tat. A- Représentation schématique des IONPs-Tat avec la nanoparticule d'oxyde de fer (IONPs), le fluorophore Dy700 (étoile) et le peptide ELP₄₀₋₆₀-Tat. B- Image de MET des IONPs.

1.2. Internalisation dans les cellules et toxicité des IONPs-Tat et IONPs-PEG

Les études *in vitro* ont été effectuées avec les cellules de glioblastome U87 génétiquement modifiées pour exprimer de manière constitutive la LucF. Pour étudier l'internalisation des IONPs-Tat dans les cellules, une concentration de 100 µg d'oxyde de fer/mL pendant 24 heures a été utilisée puis les études de MET et d'immunohistologie ont été réalisées de suite après. En MET, les organites tels que les mitochondries, le noyau et la membrane nucléaire sont reconnaissables grâce à leur morphologie spécifique. Ainsi, on peut observer que les IONPs-Tat sont internalisées dans des vésicules d'un diamètre de 500 nm environ (Figure 41-A).

Dans un deuxième temps, les cellules contenant des IONPs-Tat ont été étudiées en microscopie confocale. Les noyaux ont été marqués avec du Hoechst, un intercalant de l'ADN fluorescent, et les lysosomes ont été marqués avec du LysoTracker™, une molécule fluorescente qui s'accumulent dans les vésicules acides des cellules vivantes. Les images montrent une forte co-localisation entre des molécules fluorescentes rouges et vertes donnant un marquage jaune dans l'image fusionnée mettant ainsi en évidence une co-localisation des IONPs-Tat et des lysosomes dans les cellules (Figure 41-B).

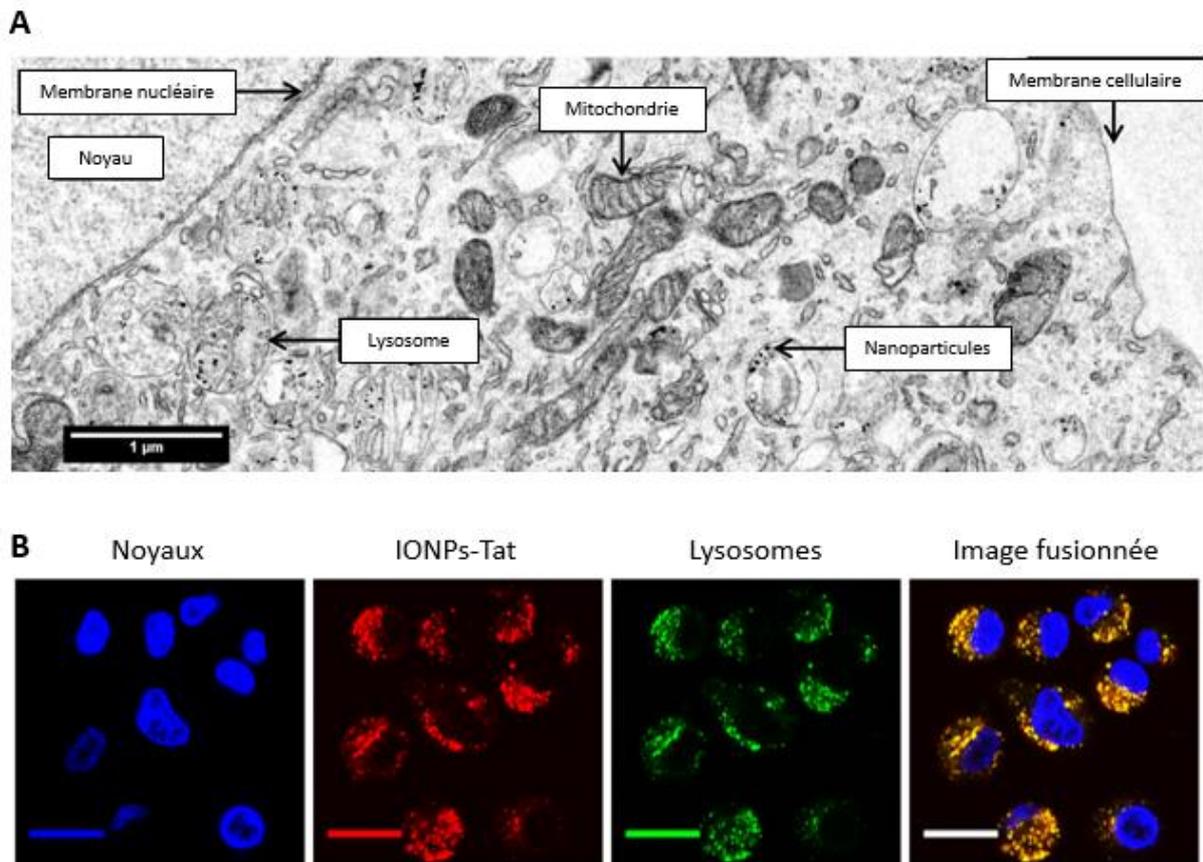


Figure 41 : Localisation intracellulaire des IONPs-Tat. A- Image de MET d'une cellule U87 contenant des IONPs-Tat. B – Images de microscopie confocale avec les noyaux marqués en bleu, les IONPs-Tat marquées en rouge et les lysosomes marqués en vert. La co-localisation de la fluorescence verte et rouge donne une coloration jaune sur l'image fusionnée. Les barres d'échelle sur les images de microscopie confocale correspondent à 20 µm.

En microscopie confocale, certaines cellules observées étaient en division (Figure 42, colonnes du centre et de droite). Dans la cellule de la colonne du milieu, les chromosomes sont condensés et la membrane nucléaire a disparu (image de fond clair) : ce sont les caractéristiques de la prophase (1^{ère} phase de la mitose). Les lysosomes contenant des IONPs-Tat sont répartis tout autour. Dans la cellule de la colonne de droite, les chromatides de chaque chromosome sont séparés et les deux cellules filles sont en train de se former : c'est la télophase (4^{ème} phase de la mitose). Les lysosomes de la cellule mère sont répartis équitablement dans les deux cellules filles. La quantité d'IONPs-Tat présente dans la cellule mère est divisée par deux dans les deux cellules filles. Il est donc possible de poursuivre le traitement d'hyperthermie après division cellulaire (Figure 42).

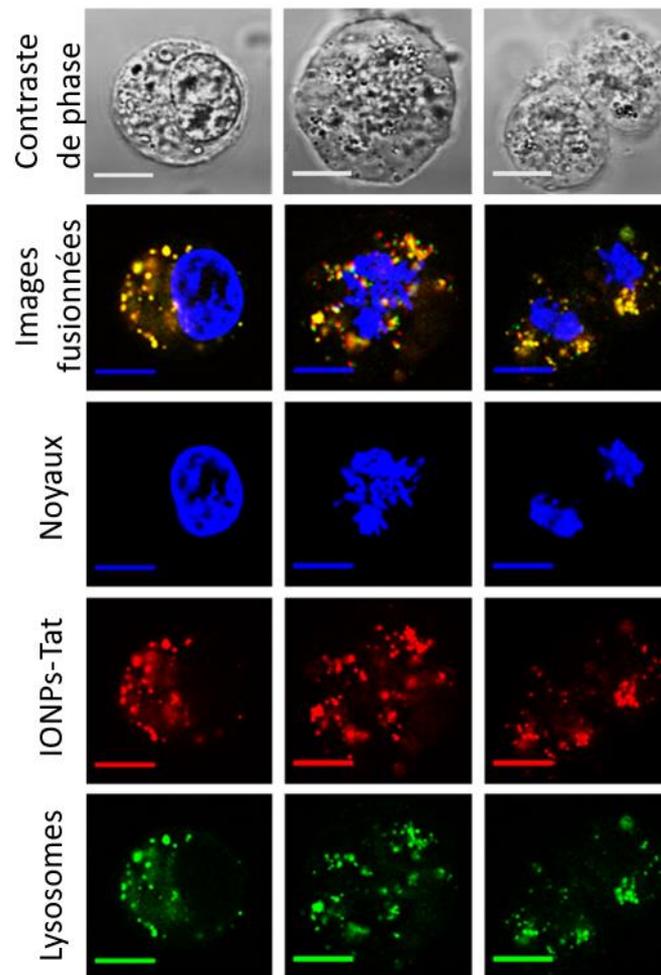


Figure 42 : Images de microscopie confocale de cellules contenant des IONPs-Tat à différentes étapes du cycle cellulaire. La cellule de la colonne de gauche n'est pas en division, la cellule de la colonne du milieu est en prophase (1^{ère} phase de la mitose) et la cellule de la colonne de droite est en télophase (4^{ème} phase de la mitose). Pour chaque cellule, on observe les lysosomes en vert, les IONPs-Tat en rouge et les noyaux en bleu. Sur les images fusionnées, la co-localisation de la fluorescence verte et rouge donne une couleur jaune. (Taille de l'image : 30 x 30 μ m).

L'effet du champ magnétique ($f = 473,5$ kHz, $H = 12$ kA/m, $t = 30$ minutes) sur la morphologie des cellules contenant des IONPs-Tat et des cellules contenant des IONPs-PEG a ensuite été étudié. L'intensité de fluorescence des cellules contenant des IONPs-Tat est supérieure à celle des cellules contenant des IONPs-PEG ce qui suggère que l'internalisation des IONPs-Tat dans les cellules a été plus importante que celle des IONPs-PEG. Les lysosomes dans lesquels se trouvent les IONPs-Tat sont plus nombreux et ont un diamètre plus large que ceux contenant les IONPs-PEG. Dans les deux cas, l'application du champ magnétique a

conduit à une destruction des lysosomes et à une fuite du contenu lysosomal, comme en témoigne la libération du Lysotracker™ et des deux types d'IONPs (Figure 43).

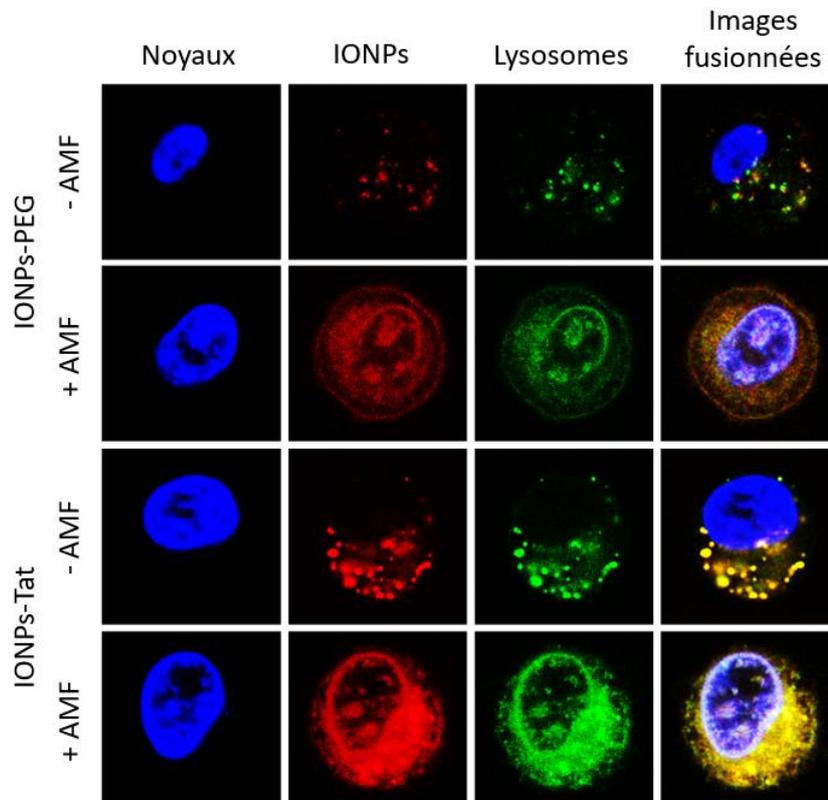


Figure 43 : Effet du champ magnétique sur des cellules contenant des IONPs-Tat ou des IONPs-PEG par imagerie confocale. Les noyaux sont marqués en bleu, les deux types d'IONPs en rouge et les lysosomes en vert. La co-localisation des fluorophores rouge et vert donne une couleur jaune sur les images fusionnées (Taille de l'image : 30 x 30 μm).

L'effet du champ magnétique sur la morphologie des cellules contenant des IONPs-Tat ou des IONPs-PEG a également été observé en MET, selon les mêmes paramètres de champ magnétique. En l'absence de champ magnétique, les lysosomes ont une forme ellipsoïdale ou sphérique (Figure 44-A et C). Après application du champ magnétique, la membrane lysosomale est clairement dégradée et la morphologie est différente (Figure 44-B et D). Ces résultats confirment ceux obtenus par microscopie confocale montrant une destruction de la membrane lysosomale conduisant à une fuite des enzymes lysosomales dans le cytosol.

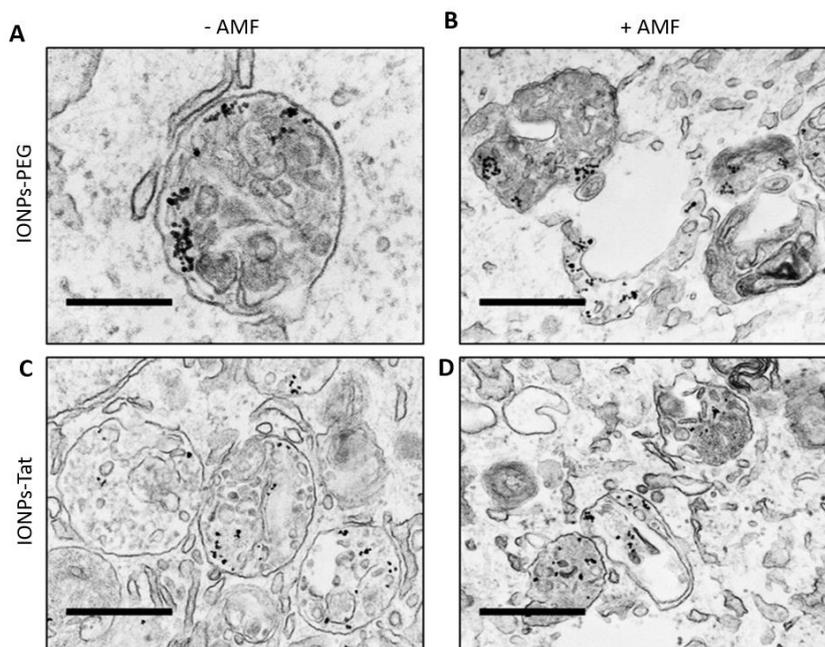


Figure 44 : Effet du champ magnétique sur des cellules contenant des IONPs-Tat ou des IONPs-PEG par MET. Les cellules contenant des IONPs-PEG ne sont pas soumises (A) ou sont soumises (B) au champ magnétique. Les cellules contenant des IONPs-Tat ne sont pas soumises (C) ou sont soumises (D) au champ magnétique. Les barres d'échelle correspondent à 250 nm (A) ou 500 nm (B à D).

Après avoir étudié l'internalisation des IONPs dans les cellules et leurs effets sur la morphologie cellulaire, la cytotoxicité des IONPs-Tat et des IONPs-PEG a été évaluée avant et après application du champ magnétique. Les cellules U87 exprimant de manière constitutive la LucF ont été utilisées permettant de suivre par BLI la viabilité et la prolifération cellulaire.

En l'absence du champ magnétique, les IONPs-PEG ne montrent pas de toxicité cellulaire alors que les IONPs-Tat montrent une légère cytotoxicité indépendante de la concentration en IONPs dans le milieu (Figure 45, histogrammes bleus). Les cellules contenant des IONPs ont été soumises au champ magnétique ($f = 473,5$ kHz, $H = 12$ kA/m, $t = 30$ minutes) conduisant à une diminution entre 10 et 20 % de la viabilité cellulaire (Figure 45, histogrammes rouges). L'hyperthermie magnétique *in vitro* induit donc une mort cellulaire de 10 à 20 % pour les cellules contenant des IONPs-PEG et les IONPs-Tat. La fonctionnalisation de surface des IONPs ne semble pas avoir d'impact majeur sur l'induction de la mort des cellules cancéreuses *in vitro*.

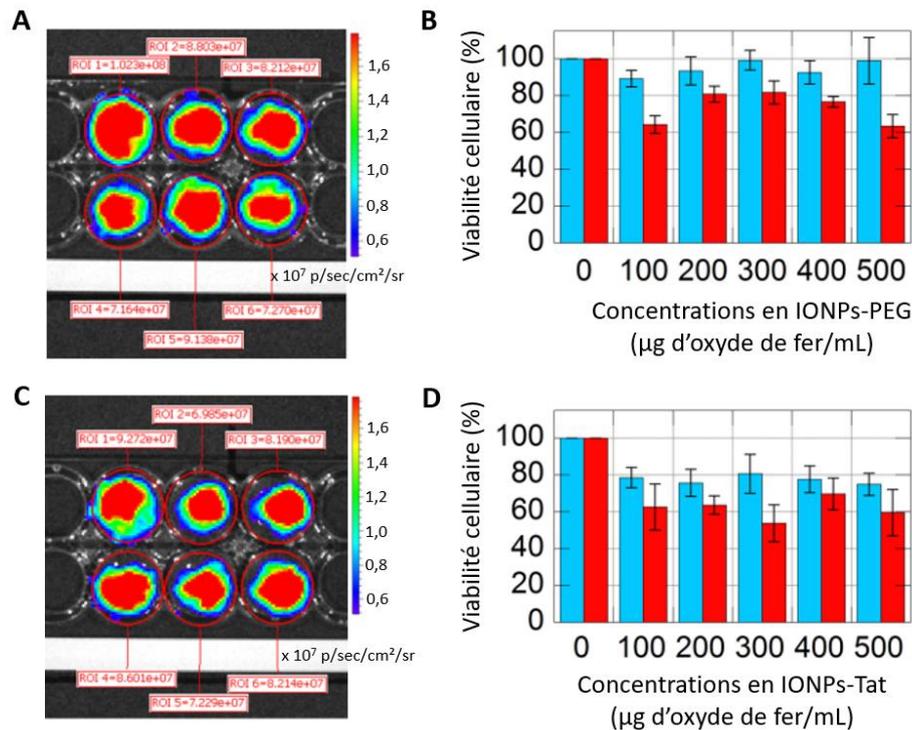


Figure 45 : Effet de l'hyperthermie magnétique *in vitro* sur la viabilité des cellules U87 contenant des IONPs-PEG ou IONPs-Tat. **A** – Image de BLI des cellules U87-CMV-LucF ensemencées dans une barrette 16 puits puis traitées avec les IONPs-PEG à différentes concentrations (de haut à gauche à bas à droite : 0, 100, 200, 300, 400 et 500 µg d'oxyde de fer/mL) pendant 24 heures. Les cellules contenant les IONPs-PEG sont ensuite soumises au champ magnétique (473,5 kHz, 12 kA/m, 30 minutes). **B** - La viabilité cellulaire est représentée avant (histogrammes bleus) et 24 heures après (histogrammes rouges) application du champ magnétique (N = 3). **C** – Image de BLI des cellules U87-CMV-LucF ensemencées dans une barrette 16 puits puis traitées avec les IONPs-Tat à différentes concentrations (selon le même schéma que la figure A) pendant 24 heures. Les cellules contenant les IONPs-Tat sont ensuite soumises au champ magnétique (473,5 kHz, 12 kA/m, 30 minutes). **D** - La viabilité cellulaire est représentée avant (histogrammes bleus) et 24 heures après (histogrammes rouges) application du champ magnétique (N = 3).

1.3. Biodistribution des IONPs-Tat et IONPs-PEG

Pour les études de biodistribution, les IONPs (750 µg d'oxyde de fer dans 100 µL de PBS) ont été injectées par voie intraveineuse à des souris présentant une tumeur U87 sous-cutanée au niveau de la patte arrière droite. Les IONPs ont été suivies par FRI à 700 nm grâce aux Dy700 greffés à leur surface. Pour les deux types d'IONPs, une accumulation majoritaire est observée dans le foie due au phénomène d'opsonisation puis à la reconnaissance par le système immunitaire, principalement les cellules de Kupffer. A 30 minutes et 1 heure après injection, on observe un faible signal de fluorescence dans la tumeur, plus important pour les

IONPs-Tat que pour les IONPs-PEG. Le marquage tumoral disparaît 4 heures après injection pouvant être dû à une diffusion en continue des IONPs dans la tumeur ou à la dégradation du fluorophore (Figure 46-A et C). Les images de microscopie confocale effectuées sur des coupes de foie et de tumeur prélevés confirment les résultats de FRI. Pour les deux types d'IONPs, un marquage important du foie est observé. Les tumeurs sont marquées uniquement avec les IONPs-Tat (Figure 46-B et D). Ces résultats suggèrent que lors de la circulation des IONPs dans l'organisme, une partie des IONPs-Tat a pénétré dans la tumeur grâce à l'effet EPR et s'est ensuite accumulée dans les cellules grâce au greffage du peptide Tat à leur surface. L'intensité de fluorescence *in vivo* 4 heures après l'injection des IONPs-Tat est probablement trop faible pour être détectée. La microscopie confocale étant plus sensible, la fluorescence des IONPs-Tat peut être détectée *ex vivo*. Au contraire, les IONPs-PEG ne sont pas internalisées dans les cellules tumorales et ont été extravasées dans la circulation sanguine. Aucun marquage *in vivo* et *ex vivo* n'est donc observé.

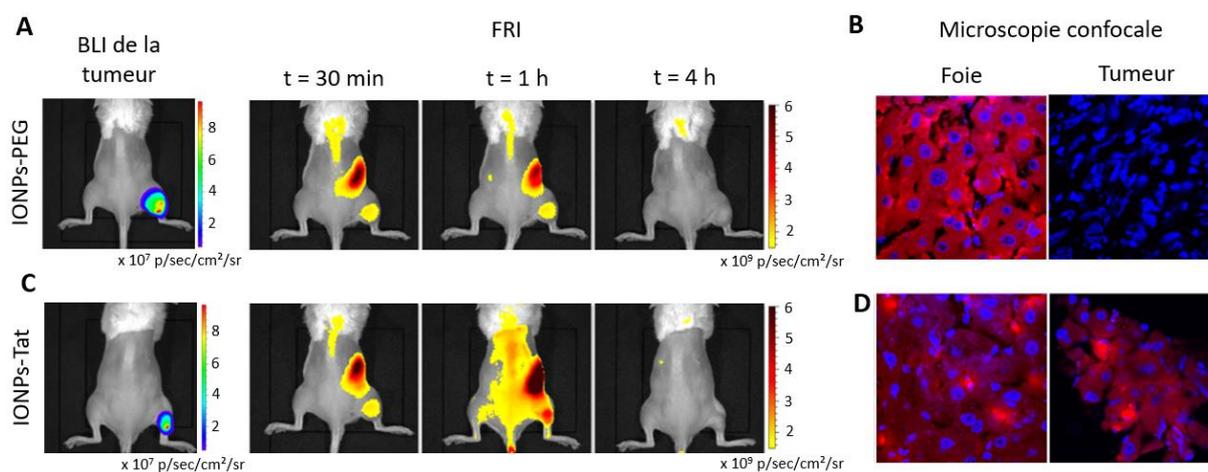


Figure 46 : Biodistribution des IONPs-Tat et des IONPs-PEG. La biodistribution des IONPs-PEG et la localisation de la tumeur ont respectivement été suivies par FRI et BLI (A) et leur localisation intracellulaire dans le foie et dans la tumeur a été déterminée par microscopie confocale (B). La biodistribution des IONPs-Tat et la localisation de la tumeur ont respectivement été suivies par FRI et BLI (C) et leur localisation intracellulaire dans le foie et dans la tumeur a été déterminée par microscopie confocale (D). (N = 1)

1.4. Induction d'une hyperthermie magnétique *in vivo*

La concentration intra-tumorale des IONPs-Tat après injection intraveineuse reste faible, capable d'induire la mort cellulaire par des atteintes lysosomales (Domenech *et al.*, 2013;

Clerc *et al.*, 2018) mais très probablement insuffisante pour visualiser, par BLI, l'effet sur la croissance et la viabilité tumorale. Pour évaluer leur potentiel à induire une thermoablation, nous avons choisi d'injecter les IONPs directement dans la tumeur. Les IONPs ont été testées sur des souris portant une tumeur RM1 au niveau de chaque patte arrière (Figure 47-A). Ce modèle présente plusieurs avantages, d'une part la souris est immunocompétente et, d'autre part, la croissance tumorale est rapide et homogène. Les souris ont reçu une injection d'IONPs-Tat ou d'IONPs-PEG (1,3 mg d'oxyde de fer/tumeur dans 40 μ L) dans la tumeur de la patte droite et une injection de sérum physiologique dans la tumeur de la patte gauche. La moitié des souris a ensuite été soumise 4 fois (4 ; 8 ; 24 ; 48 heures après injection) au champ magnétique ($f = 473,5$ kHz, $H = 12$ kA/m, $t = 15$ minutes) (Figure 47-B).

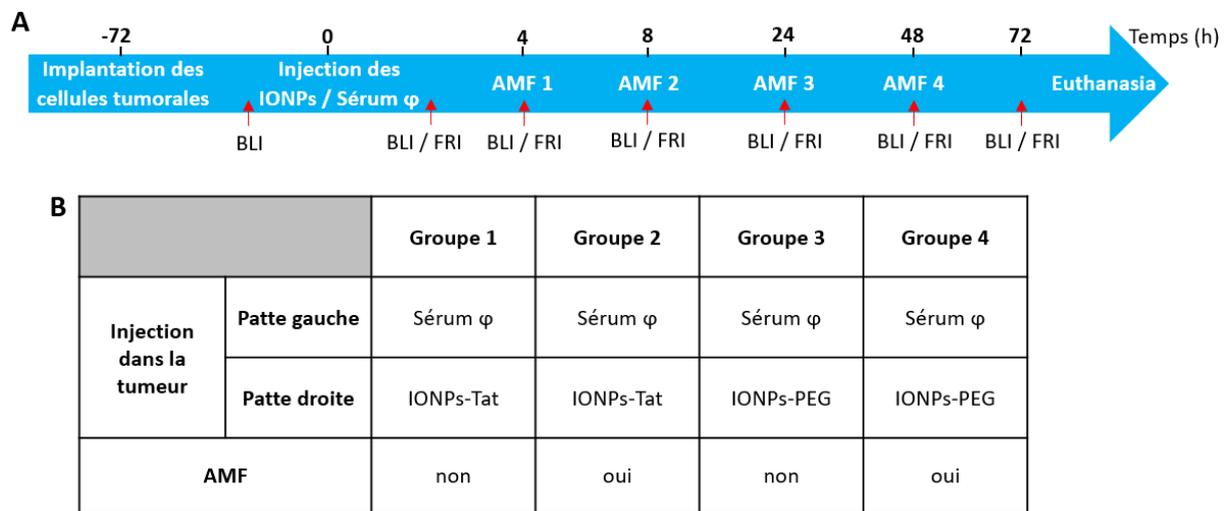


Figure 47 : Conditions expérimentales. A - Chronologie expérimentale : Les souris ont été implantées avec des cellules RM1 génétiquement modifiées pour l'expression constitutive de la LucF. Trois jours après implantation, les IONPs-Tat ou IONPs-PEG ont été injectées dans la tumeur droite (1,3 μ g de fer/ tumeur dans 40 μ L) et du sérum physiologique dans la tumeur gauche (40 μ L). La moitié des souris a été soumise au champ magnétique 4, 8, 24 et 48 heures après injection ($f = 473,5$ kHz, $H = 12$ kA/m, $t = 15$ min). La croissance tumorale et les IONPs ont été suivies, respectivement, par BLI et FRI avant et après injection, après chaque application du champ magnétique et 24 heures après la dernière. **B –** Différents groupes de souris formés lors de cette étude. Sérum ϕ = Sérum physiologique ; AMF = champ magnétique alternatif

Lors du traitement d'hyperthermie, la température de la tumeur contrôle (Sérum physiologique) n'a pas changé alors que celle de la tumeur traitée aux IONPs (IONPs) a

augmenté, dès le début de l'application du champ magnétique, pour atteindre un plateau à 44 °C. Cette élévation de la température est observée pour les deux types d'IONPs (Figure 48).

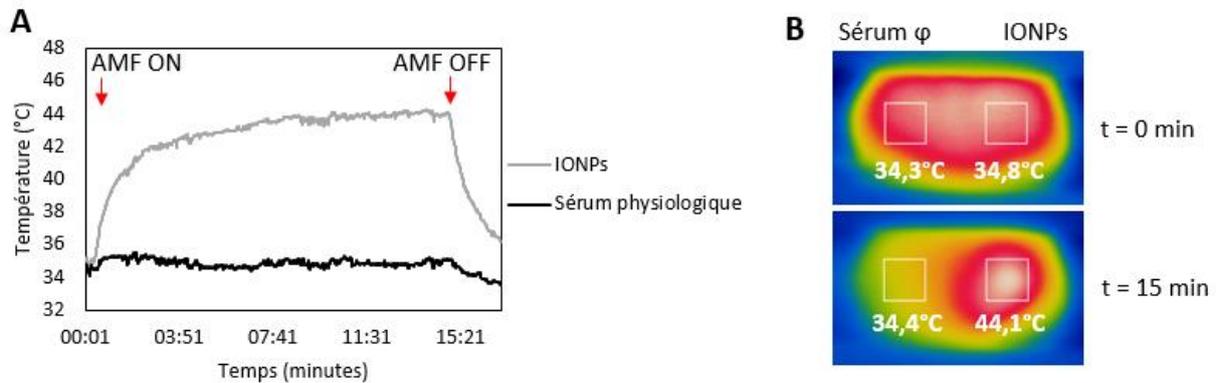


Figure 48 : Suivi de la température tumorale lors de l'application du champ magnétique. **A** - Suivi de la température tumorale en temps réel lors de l'application du champ magnétique avec une caméra thermique. **B** – Images de la caméra thermique au début (t = 0 min) et à la fin (t = 15 min) de l'application du champ magnétique. Sérum ϕ = Sérum physiologique ; AMF = champ magnétique alternatif

La croissance des tumeurs injectées avec le sérum physiologique n'est pas modifiée par l'application du champ magnétique (Figure 49-A et B). Celui-ci n'a donc aucun effet sur la viabilité cellulaire *in vivo*. Les tumeurs contenant des IONPs ont continué à croître jusqu'à 72 heures après l'application du champ magnétique. Cependant, la croissance des tumeurs contenant des IONPs-Tat et soumises au champ magnétique est ralentie en comparaison avec la croissance des tumeurs contenant des IONPs-Tat et non soumises au champ magnétique (Figure 49-C et D). Cette différence n'est pas observée entre les tumeurs contenant des IONPs-PEG soumises au champ magnétique et celles non soumises au champ magnétique (Figure 49-E et F). Le ralentissement de la croissance des tumeurs contenant des IONPs-Tat et soumises au champ magnétique est peut-être dû à un ralentissement global de la croissance tumorale mais il peut aussi être dû à des zones de mort cellulaire, en particulier, si la répartition des IONPs-Tat n'est pas homogène.

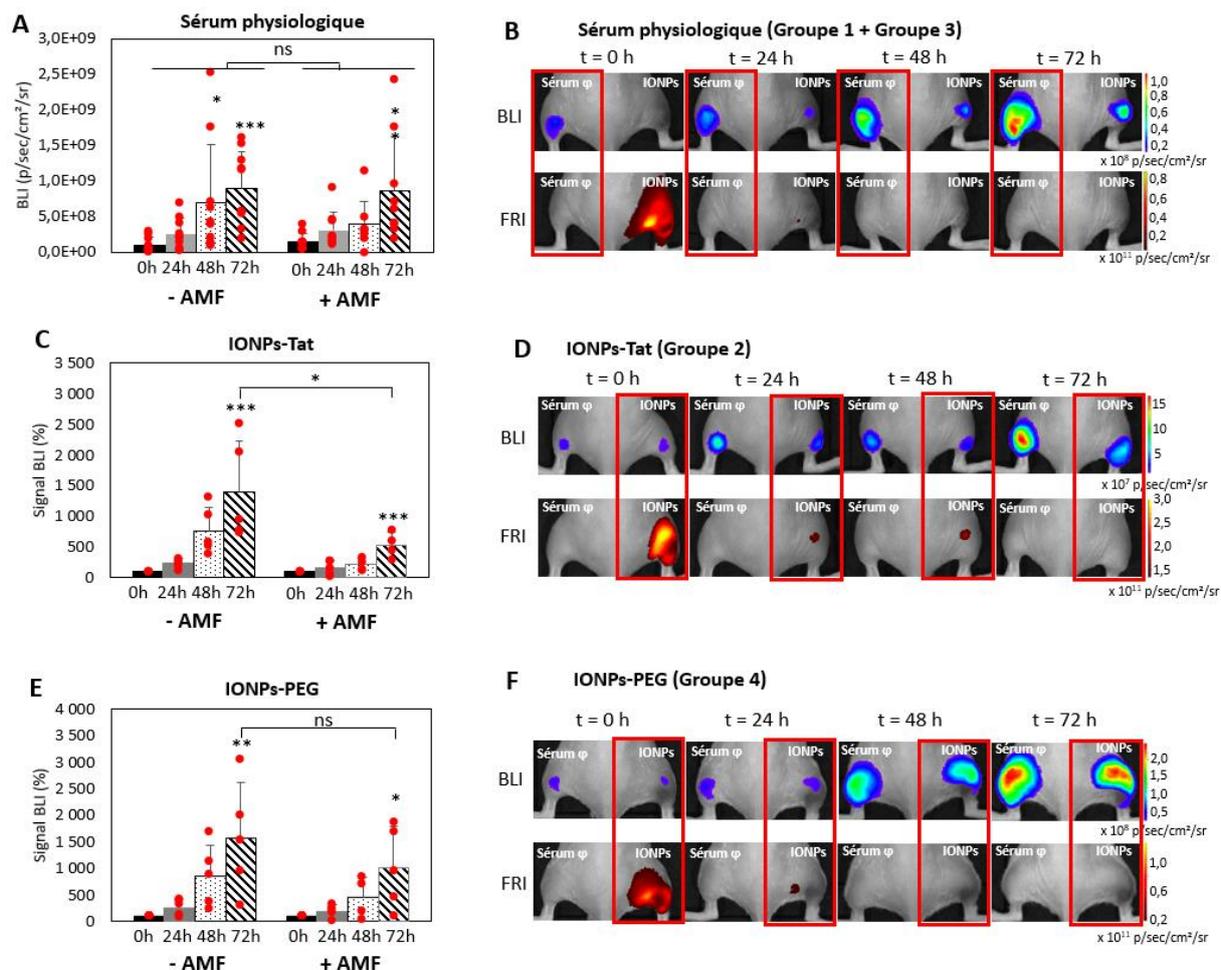


Figure 49 : Induction d'une hyperthermie magnétique *in vivo* en utilisant les IONPs-Tat ou IONPs-PEG. **A** – Signal BLI des tumeurs injectées avec du sérum physiologique et soumises (+ AMF) (N= 5) ou non (- AMF) (N = 5) au champ magnétique. **B** - Images de BLI et de FRI d'une souris injectée avec des IONPs et du sérum physiologique (cadres rouges) puis soumise au champ magnétique. **C** – Suivi de la croissance tumorale par BLI des tumeurs injectées avec des IONPs-Tat et soumises (+ AMF) (N = 5) ou non (- AMF) (N = 5) au champ magnétique. **D** – Images de BLI et de FRI d'une souris injectée avec IONPs-Tat (cadres rouges) et du sérum physiologique et soumise au champ magnétique. **F** – Suivi de la croissance tumorale par BLI des tumeurs injectées avec des IONPs-PEG et soumises (+ AMF) ou non (- AMF) au champ magnétique. **F** – Images de BLI et de FRI d'une souris injectée avec des IONPs-PEG (cadres rouges) et du sérum physiologique et soumise au champ magnétique. Sérum ϕ = sérum physiologique ; dans les graphes, les points rouges représentent le signal BLI de chaque souris et les histogrammes représentent la moyenne de ces signaux \pm SD pour chaque condition. Les analyses statistiques ont été effectuées avec un test ANOVA à 2 facteurs.

Lors de l'injection des IONPs-Tat dans les tumeurs, une partie s'internalisent probablement dans les cellules cancéreuses grâce au peptide Tat, comme cela a été montré à la suite d'une injection intraveineuse. Le ralentissement de la croissance tumorale induit par

hyperthermie magnétique *in vivo* peut-être dû à la combinaison des effets des IONPs-Tat extracellulaires (hyperthermie extracellulaire) et intracellulaires (hyperthermie intracellulaire).

L'hyperthermie intracellulaire, également appelée hyperthermie magnétique intra-lysosomale, résulte de l'internalisation spécifique des NPMs dans les cellules grâce à un ciblage actif puis à l'accumulation dans les lysosomes conduisant à l'activation d'une voie de mort cellulaire (Domenech *et al.*, 2013; Clerc *et al.*, 2018). Les résultats *in vitro*, que nous avons obtenus, peuvent suggérer que le même mécanisme de mort cellulaire pourrait intervenir. Cette voie de mort est intéressante car elle nécessite une faible quantité de NPMs dans les cellules par rapport à la thermoablation et limite les effets secondaires au niveau des tissus sains car l'élévation de la température dans la tumeur est modérée. L'hyperthermie extracellulaire a montré son intérêt dans les travaux de MagForce en combinaison avec la radiothérapie. Ces deux thérapies par hyperthermie conduisent, toutefois, à des effets délétères restreints qui ne suffisent pas à éradiquer la totalité de la tumeur. Plusieurs hypothèses sont établies afin d'améliorer leur efficacité :

- Une modification de surface conduisant à une accumulation plus importante de NPMs dans les cellules. Plus le nombre de NPMs internalisées est élevé et plus l'augmentation de la température dans la cellule est importante. De ce fait, les dommages cellulaires sont plus délétères pour la cellule.
- L'utilisation de NPMs avec un pouvoir chauffant plus élevé permettrait d'induire des effets cytotoxiques directement par la chaleur sans passer par la production de ROS et la destruction lysosomale. Dans cette situation, les effets peuvent conduire à une thermoablation tumorale au lieu d'une hyperthermie magnétique intra-lysosomale.

Ces hypothèses sont soutenues par des travaux comparant l'effet de NPMs avec une morphologie sphérique (nanosphère) et l'effet de NPMs de type nanofleur. Le pouvoir chauffant et la quantité de NPMs internalisées dans les cellules sont différents (SAR = 134 W/g et 300 pg de fer par cellules pour les nanosphères ; SAR = 265 W/g et 800 pg de fer par cellules pour les nanofleurs). Ainsi, les nanosphères induisent 40 % de mort cellulaire par hyperthermie magnétique alors que les nanofleurs conduisent à 80 – 90 % de mort cellulaire. Un pouvoir chauffant élevé combiné avec une concentration intracellulaire en fer plus importante conduisent à une hyperthermie magnétique plus efficace (Hemery *et al.*, 2017a).

Les deux prochains chapitres ambitionnent de répondre à ces deux hypothèses en utilisant un peptide améliorant l'internalisation dans les cellules (cell-penetrating peptide =

CPP) différent du Tat, d'une part, ou des NPMs avec un pouvoir chauffant supérieur à celui des IONPs, d'autre part.

2. Hyperthermie magnétique induite par des nanoparticules d'oxyde de fer décorées avec de la protamine

Afin d'améliorer les performances de l'hyperthermie magnétique intracellulaire, nous avons entrepris d'améliorer l'internalisation des NPMs. Pour cela, nous avons décidé d'utiliser un autre CPP en remplaçant le Tat par la protamine. Ce peptide est amphiphile, riche en arginine (séquence peptidique : CVSRRRRRRGGRRRR) et possède une séquence peptidique proche de celle du peptide Tat (Xia *et al.*, 2011). La séquence d'arginine confère aux NPMs une charge positive améliorant ainsi leur internalisation dans les cellules.

2.1. Caractérisation des SPC-protamine

Les SPC sont des nanoparticules de morphologie sphérique (nanosphère) (Figure 50-A) et sont composées d'un cluster de particules d'oxyde de fer (diamètre d'une particule = 7 à 8 nm) (Figure 50-B et C) consolidé avec de la silice (Figure 50-D). Les cœurs d'oxyde de fer, d'un diamètre de 60 nm environ, ont été sélectionnés par centrifugation puis recouverts d'une couche de silice (4 nm) contenant 2 fluorophores : la cyanine 3 (Cy 3) et la cyanine 7.5 (Cy 7.5) utilisés pour le suivi non-invasif des SPC, respectivement, dans les études *in vitro* et *in vivo* (Figure 50-E).

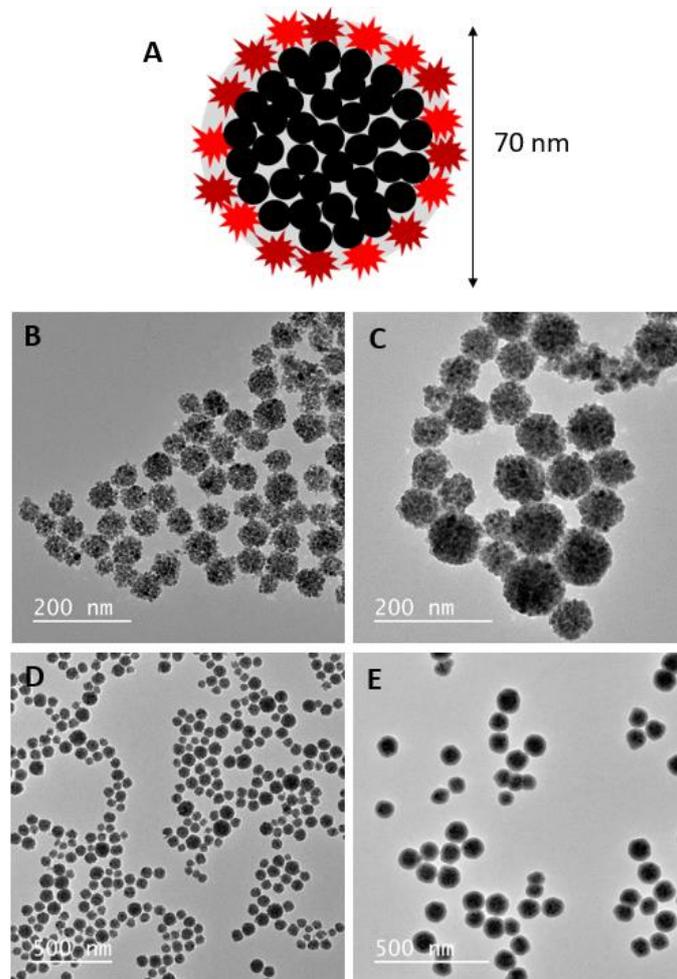


Figure 50 : Nanoparticules SPC. **A-** Schéma de la composition des SPC avec les particules d'oxyde de fer (ronds noirs) entourées par la couche de silice bi-fluorescente. **B et C** – Images de MET des SPC avant encapsulation dans une couche de silice. **D** – Image de MET des SPC après formation d'une pré-couche de silice. **E** – Image de MET des SPC après encapsulation dans une couche de silice bi-fluorescente.

Les SPC ont ensuite été décorées avec de la protamine (Figure 51-A). La quantité de protamine adsorbée à la surface des SPC a été déterminée par la mesure de la turbidité par spectrophotométrie à 800 nm avec des concentrations croissantes en protamine par unité de surface de nanoparticules (nm^2) (Figure 51-B). A faibles et fortes concentrations, la protamine entraîne l'agrégation des SPC et donc une forte turbidité. Un pic d'absorbance a été mesuré à une concentration de $0,21$ protamine/ nm^2 de SPC, suivi d'un plateau. La quantité de protamine retenue ($0,84$ protamine/ nm^2) se situe au niveau du plateau afin de limiter d'agrégation des SPC. Ces SPC sont appelées SPC-protamine.

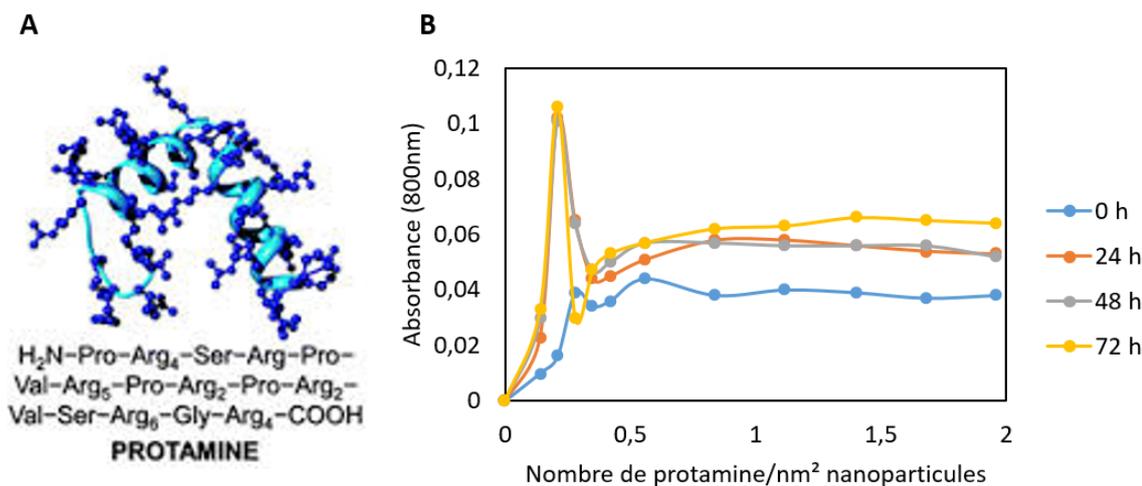


Figure 51 : Adsorption de la protamine à la surface des SPC. A- Structure 3D et séquence protéique de la protamine. **B –** Adsorption de la protamine à la surface des SPC en fonction du temps et du nombre de protamine par nm² de SPC.

Les SPC-protamine (77 g d'oxyde de fer/L) ont été soumises à un champ magnétique selon différents couples fréquence/amplitude. La température de la suspension augmente dès l'application du champ magnétique passant de 37 à 55 °C en environ 2 minutes (Figure 52). Dans ces conditions expérimentales, le pouvoir chauffant (SAR) des SPC-protamine est de 50 W/g.

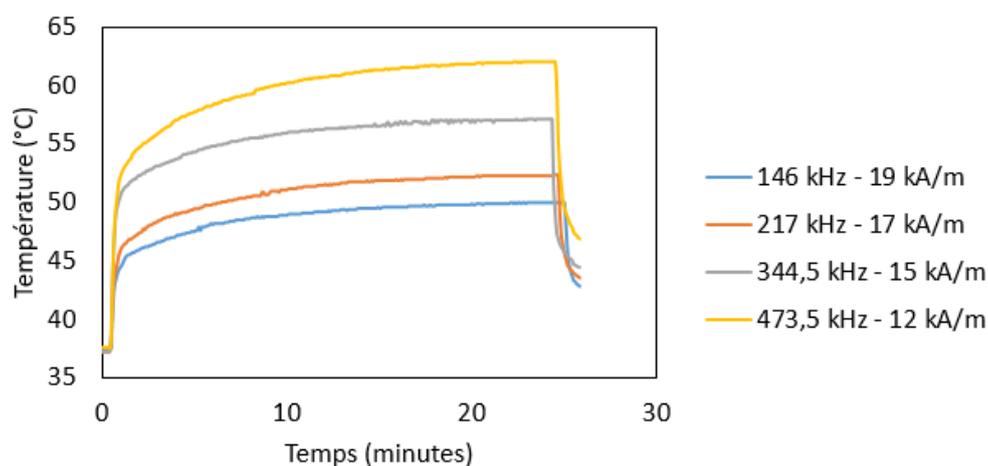


Figure 52 : Application du champ magnétique sur les SPC-protamine. La température d'un échantillon de SPC-protamine à 77 g d'oxyde de fer/L a été suivie lors de l'application du champ magnétique selon plusieurs couples fréquence/amplitude (146 kHz - 19 kA/m ; 217 kHz - 17 kA/m ; 344,5 kHz - 15kA/m et 473,5 kHz - 12kA/m) pendant 25 minutes.

2.2. Toxicité et internalisation des SPC-protamine

Plusieurs concentrations de SPC et SPC-protamine ont été étudiées (de 0 à 300 μg d'oxyde de fer/mL) à différents temps d'incubation (24 ; 48 ; 72 heures) afin de déterminer la concentration en oxyde de fer induisant un minimum de cytotoxicité et une accumulation maximale dans les cellules. Les analyses ont été effectuées à la fin du temps d'incubation.

Dans un premier temps, la viabilité des cellules U87 et RM1 incubées avec les SPC ou SPC-protamine a été déterminée par BLI. La figure 53 montre que les deux types de SPC induisent une faible cytotoxicité (entre 15 et 20 %) principalement dépendante de la concentration mais pas du temps d'incubation.

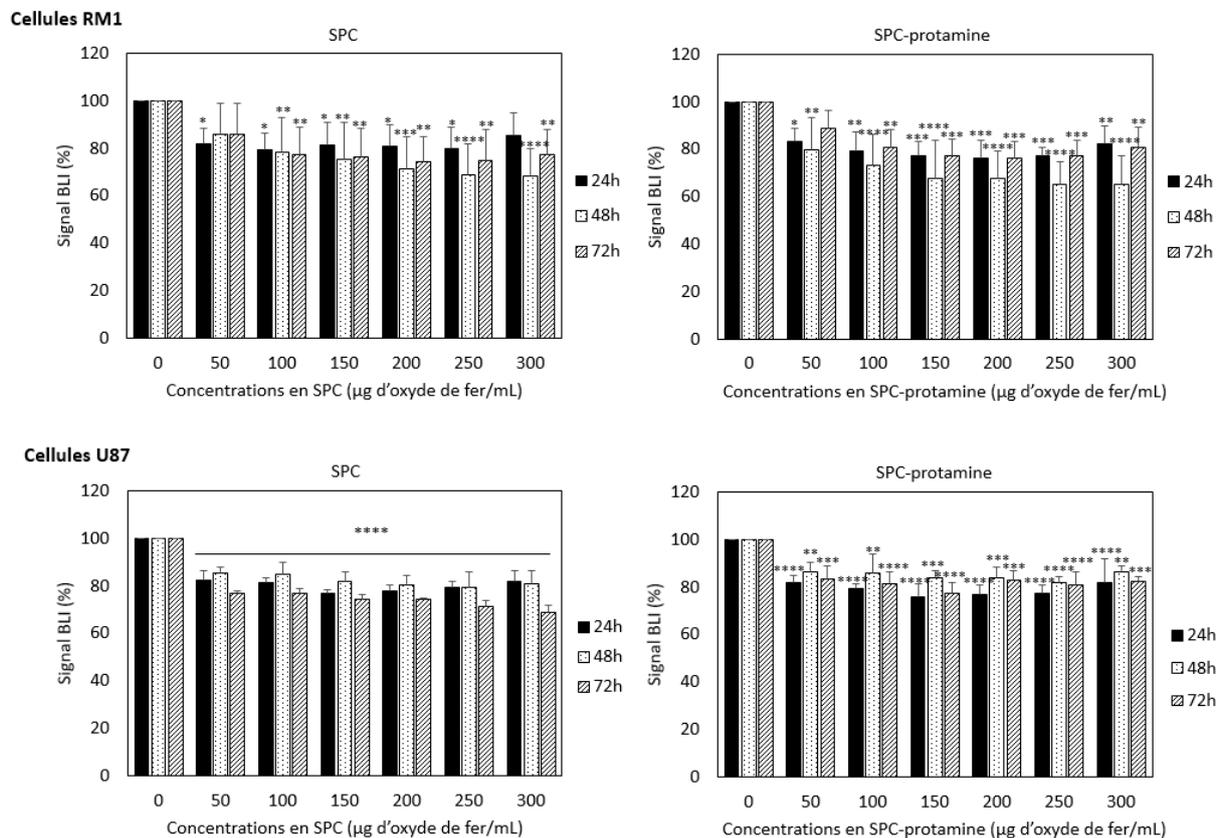


Figure 53 : Viabilité des cellules RM1 et des cellules U87 contenant des SPC ou des SPC-protamine. Signal BLI des cellules RM1 (N = 5) et cellules U87 (N = 3) contenant des SPC ou SPC-protamine. Les études statistiques ont été effectuées avec un test ANOVA à 2 facteurs.

L'internalisation des SPC et SPC-protamine dans les cellules a ensuite été évaluée par cytométrie en flux grâce au fluorophore Cy 3 présent dans la couche de silice bi-fluorescente. La fluorescence détectée au cytomètre en flux correspond aux SPC ou SPC-protamine internalisées dans les cellules mais aussi à celles liées à la membrane plasmique. Pour les deux types de SPC, l'internalisation dans les cellules (U87 et RM1) est maximale après 24 heures d'incubation (Figure 54). Aux temps 48 et 72 heures, les divisions cellulaires pourraient expliquer la diminution de l'intensité de fluorescence.

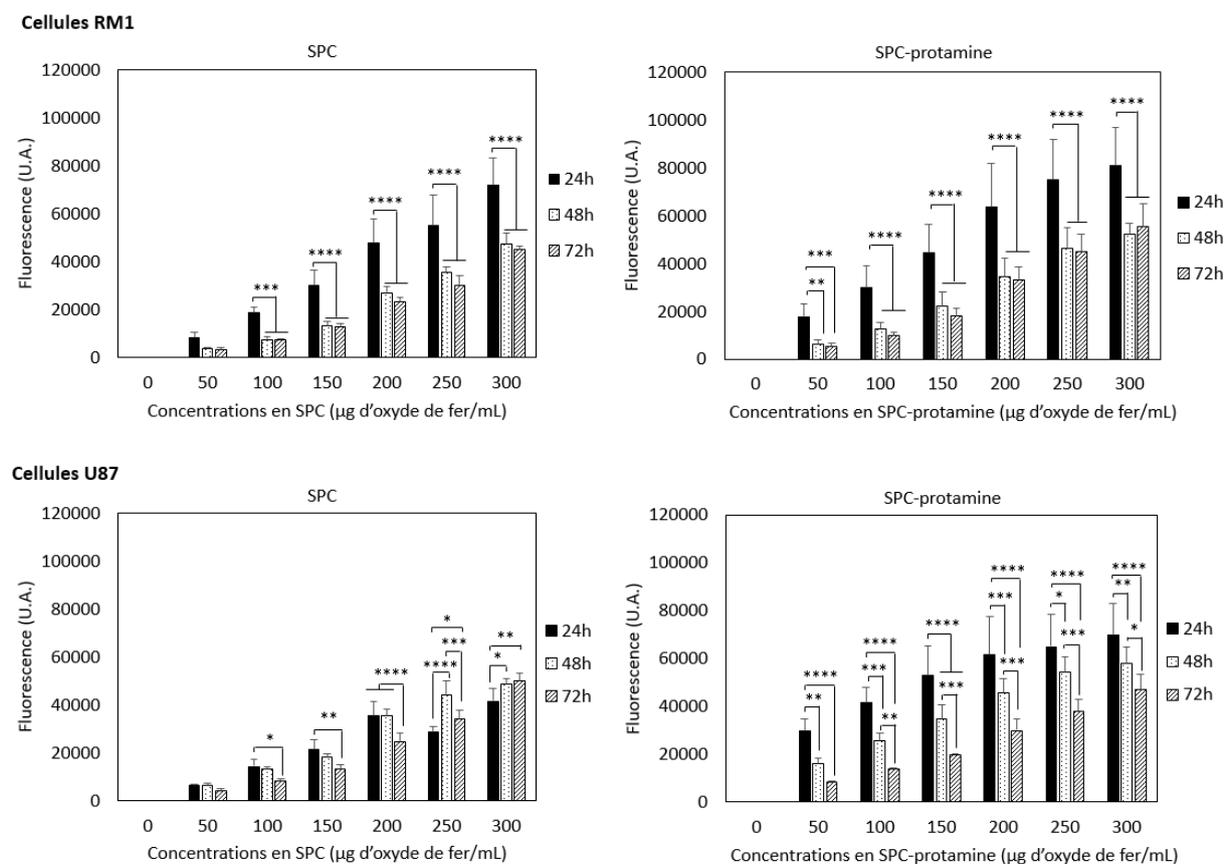


Figure 54 : Internalisation des SPC et SPC-protamine dans les cellules RM1 et les cellules U87. Intensité de fluorescence par cellule pour les cellules RM1 (N = 5) et pour les cellules U87 (N = 3) contenant des SPC ou les SPC-protamine. Les études statistiques ont été effectuées avec un test ANOVA à 2 facteurs.

L'objectif de cette étude étant d'atteindre une concentration intracellulaire en oxyde de fer maximale, la condition de 250 µg d'oxyde de fer/mL pendant 24 heures a été retenue pour la suite des expérimentations. A partir des résultats obtenus dans la figure 54, une comparaison entre les conditions avec et sans protamine pour une concentration de 250 µg d'oxyde de fer/mL

avec une incubation de 24 heures a été effectuée pour les deux lignées cellulaires. Comme le montre la figure 55, la quantité des SPC-protamine associée aux cellules est significativement supérieure à celle des SPC. La protamine améliore donc significativement l'internalisation des SPC dans les cellules RM1 (augmentation d'environ 30 %) et dans les cellules U87 (augmentation d'environ 55 %).

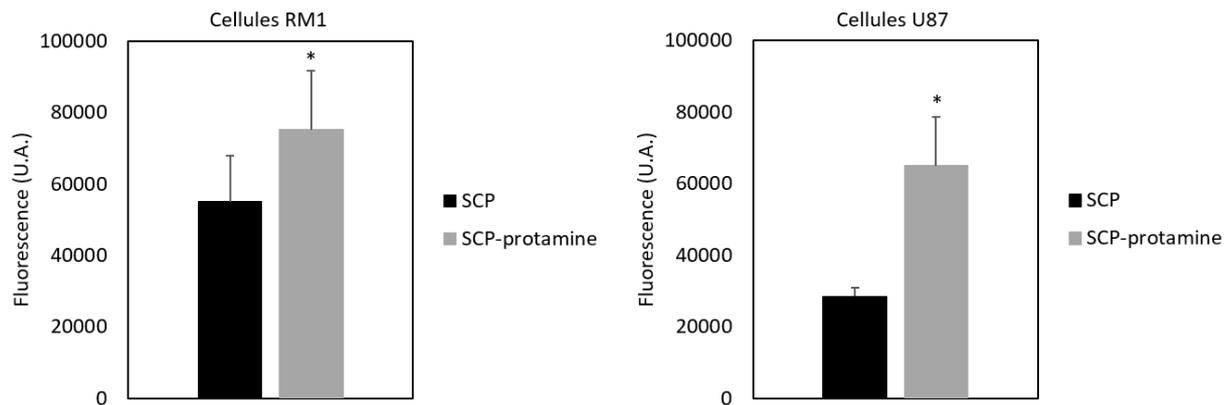


Figure 55 : Comparaison de la quantité de SPC et de SPC-protamine internalisées dans les cellules U87 et les cellules RM1. Intensité de fluorescence des cellules RM1 (N = 5) et U87 (N = 3) contenant des SPC ou SPC-protamine à une concentration de 250 μg d'oxyde de fer/mL pendant 24 heures. Les études statistiques ont été effectuées avec un test de student.

2.3. Localisation intracellulaire des SPC et SPC-protamine

La localisation intracellulaire des SPC et SPC-protamine a été étudiée par immunohistochimie sur les cellules en culture. Comme décrit précédemment, la majorité des études en hyperthermie magnétique montrent une accumulation intra-lysosomale. Les cellules ont donc été immuno-marquées pour la détection de la protéine Lamp-1 (vert), une protéine de la membrane lysosomale. Les noyaux ont été révélés par le DAPI et représentés en bleu et les SPC ou SPC-protamine contenant la Cy 3 dans la couche de silice ont été représentées en rouge.

L'internalisation des SPC-protamine est plus importante que celle des SPC, ce qui est en accord avec les résultats obtenus en cytométrie en flux. De plus, les SPC-protamine internalisées semblent être majoritairement localisées dans les lysosomes comme le révèle la fluorescence jaune résultant de la co-localisation de Lamp-1 (vert) et des SPC (rouge). Au contraire, peu de co-localisation est observée entre les SPC et les lysosomes (Figure 56). Il semblerait donc que la voie d'internalisation soit différente entre les SPC et SPC-protamine.

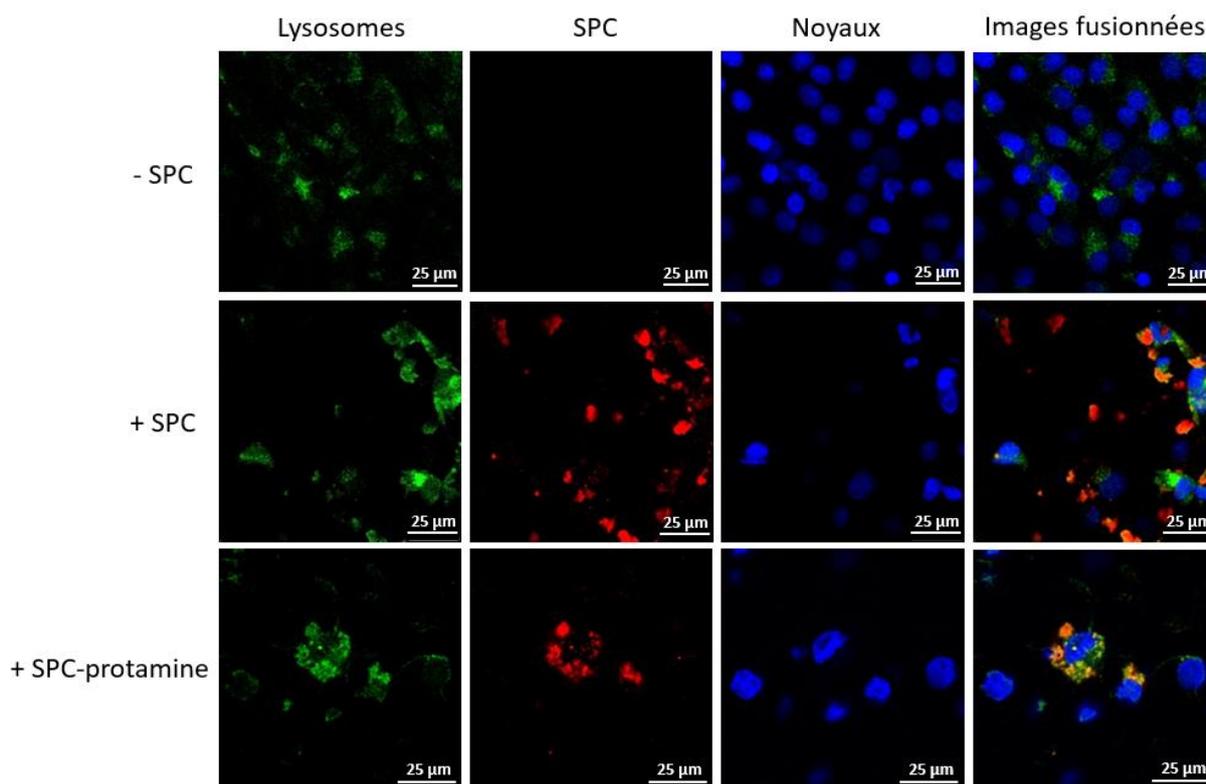


Figure 56 : Localisation intracellulaire des SPC et des SPC-protamine dans les cellules U87 par microscopie confocale. Immunohistochimie des cellules U87 sans SPC (- SPC) ou des cellules contenant des SPC (+ SPC) ou des SPC-protamine (+ SPC-protamine). Les lysosomes sont marqués avec la protéine Lamp-1 (vert), les SCP et SPC-protamine avec la Cy 3 (rouge) et les noyaux avec le DAPI (bleu).

La protamine améliore significativement l'internalisation des SPC dans les cellules et conduit à une localisation intra-lysosomale. Pour la suite des expérimentations, uniquement les SPC-protamine ont été utilisées aux conditions précédemment définies.

2.4. Induction d'une hyperthermie magnétique *in vitro*

Lors des études d'hyperthermie magnétique *in vitro*, pour satisfaire aux contraintes de géométrie de l'appareillage d'hyperthermie magnétique, les cellules ont dû êtreensemencées dans des barrettes de culture pour la microscopie (Labteck) avec un fond en verre. Les cellules RM1 adhèrent mal sur ce support et se décollent lors des lavages. Comme aucune solution technique n'a pu être trouvée pour pallier à ce problème, les études *in vitro* d'hyperthermie ont donc été réalisées uniquement avec les cellules U87-CMV-LucF.

Vingt-quatre heures après l'application du champ magnétique, aucune différence significative n'est observée entre l'intensité du signal BLI des cellules contenant ou non des SPC-protamine, qu'elles soient soumises ou non au champ magnétique (Figure 57). Dans nos conditions expérimentales, l'hyperthermie magnétique ne semble donc pas avoir d'effet délétère sur les cellules.

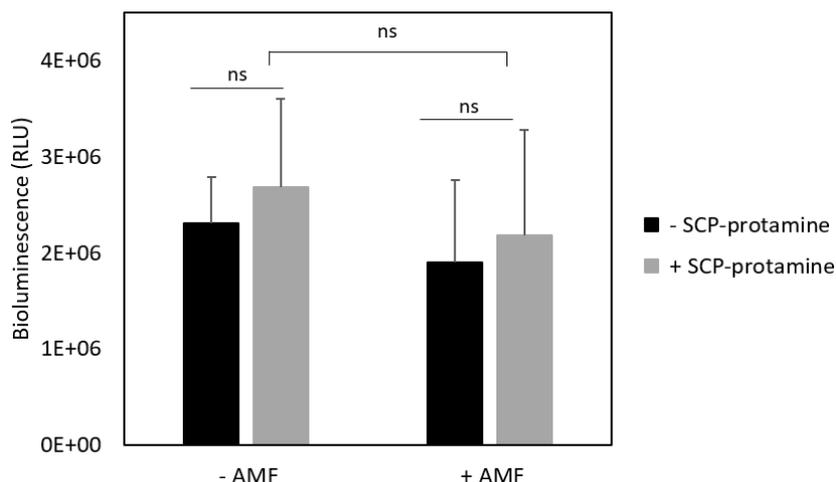


Figure 57 : Induction d'une hyperthermie magnétique *in vitro* avec des SPC-protamine. La mesure du signal BLI a été effectuée 24 heures après application du champ magnétique (N = 3). Les études statistiques ont été effectuées avec un test ANOVA à 2 facteurs.

L'hyperthermie magnétique induite avec les SPC-protamine ne conduit pas à la mort des cellules U87. Pourtant, la localisation des SPC-protamine est lysosomale, comme les IONPs-Tat précédemment étudiées, mais leur pouvoir chauffant (SAR = 50 W/g pour $f = 473,5$ kHz et $H = 12$ kA/m) est très inférieur à celui des IONPs-Tat (SAR = 167 W/g pour $f = 473,5$ kHz et $H = 12$ kA/m). Pour une même quantité de fer dans les cellules, des NPMs avec un pouvoir chauffant élevé induisent des dommages cellulaires plus importants que celles avec un pouvoir chauffant faible.

La prochaine étape consistera à utiliser des NPMs de type nanofleurs, ayant un pouvoir chauffant plus élevé, et décorées avec de la protamine. L'effet de ces NPMs en hyperthermie magnétique sera étudié. Cette étude n'a pas pu être entreprise durant ce travail de thèse. L'ensemble des résultats regroupant les deux types de NPMs décorées avec de la protamine fera l'objet d'une même publication.

3. Nanofleurs décorées avec des groupements ammoniums quaternaires

Les résultats présentés dans ce chapitre sont regroupés dans un manuscrit intitulé :

« Imaging magnetic hyperthermia for tumor ablation and tumor microenvironment mild hyperthermia »

Pauline Jeanjean, Clément Vecco Garda*, Coralie Genevois, Sabrina Lacomme, Olivier Sandre, Stéphane Mornet, Franck Couillaud*

** Co-premiers auteurs*

Dans ce travail, nous avons utilisé des NPMs de type nanofleurs décorées avec des groupements d'ammonium quaternaire : elles sont nommées NF-Q. L'utilisation de nanofleurs permet de vérifier la deuxième hypothèse établie précédemment en essayant d'induire des effets délétères plus importants grâce à des NPMs possédant un pouvoir chauffant supérieur (SAR = 230 W/g pour $f = 473,5$ kHz et $H = 12$ kA/m).

Les groupements d'ammonium quaternaire confèrent aux nanofleurs une charge positive à pH physiologique. La membrane plasmique étant chargée négativement, l'internalisation des nanofleurs est améliorée. Grâce à la charge positive, cette modification chimique de surface a la même vocation que les CPPs précédemment utilisés pour améliorer l'accumulation des NPMs sans induire de cytotoxicité.

3.1. Caractérisation des NF-Q

3.1.1. Synthèse des NF

Les nanofleurs magnétiques (NF) sont synthétisées par voie polyol selon la méthode développée par Caruntu et al. en 2004 (Caruntu *et al.*, 2004). La synthèse consiste en une hydrolyse forcée des précurseurs (chlorure ferreux tétra-hydraté et chlorure ferrique hexa-hydraté) en milieu basique dans un mélange de polyol composé de DEG et de NMDEA. Le mélange réactionnel est chauffé à 220 °C pendant 4 heures en appliquant une rampe de

température de 2 °C/min avec un régulateur de température. La taille des nanoparticules obtenues dépend de la quantité d'eau ajoutée au début de la synthèse, de la rampe de température appliquée ou encore du temps de croissance à 220 °C (Hemery *et al.*, 2017b). La synthèse par méthode polyol permet d'obtenir des NPMs d'oxyde de fer avec un pouvoir chauffant beaucoup plus élevé que celui des nanosphères monodisperses en taille et bien cristallisées (Fiévet *et al.*, 2018) en raison d'une température de réaction importante qui permet de séparer les paliers de nucléation et de croissance. Les conditions de synthèse sélectionnées permettent d'obtenir des nanoparticules d'oxyde de fer (γ -Fe₂O₃) de morphologie NF et de 16 nm de diamètre.

3.1.2. Encapsulation de NF dans une couche de silice bi-fluorescente

Les NF sont ensuite encapsulées dans une couche de silice fluorescente pour obtenir des NF@SiO₂:DF. La silice fluorescente est composée de deux fluorophores, l'un dans le proche infrarouge et l'autre dans le visible, pour suivre les NF par imagerie optique. Les fluorophores sont incorporés dans la couche de silice de manière covalente (Adumeau *et al.*, 2017). Cette synthèse est basée sur le greffage covalent entre un fluorophore portant une fonction maléimide et un agent de couplage silanique organofonctionnel thiolé, le MPS. Les deux fluorophores utilisés sont la Cy 7.5 et la Cy 3. Ensuite, les organosilanes fluorescents sont condensés en présence de TEOS et des NF, en milieu hydro-alcoolique basique. Cependant pour les NF, il est nécessaire de modifier préalablement leur surface par adsorption d'acide citrique afin de les stabiliser en milieu hydro-alcoolique basique.

Au final, les nanoparticules obtenues font 24 nm de diamètre et la présence des deux fluorophores est confirmée par le spectre d'absorption de l'échantillon (Figure 58-A). Le spectre d'absorption présente deux bandes d'absorption vers 555 nm et vers 790 nm correspondant, respectivement, à la Cy 3 et Cy 7.5. La MET des NF@SiO₂:DF confirme également l'encapsulation par une couche de silice homogène (Figure 58-B et C). L'agrégation bidimensionnelle sur la grille MET se produit lors de l'évaporation du milieu dispersant sur le film de carbone.

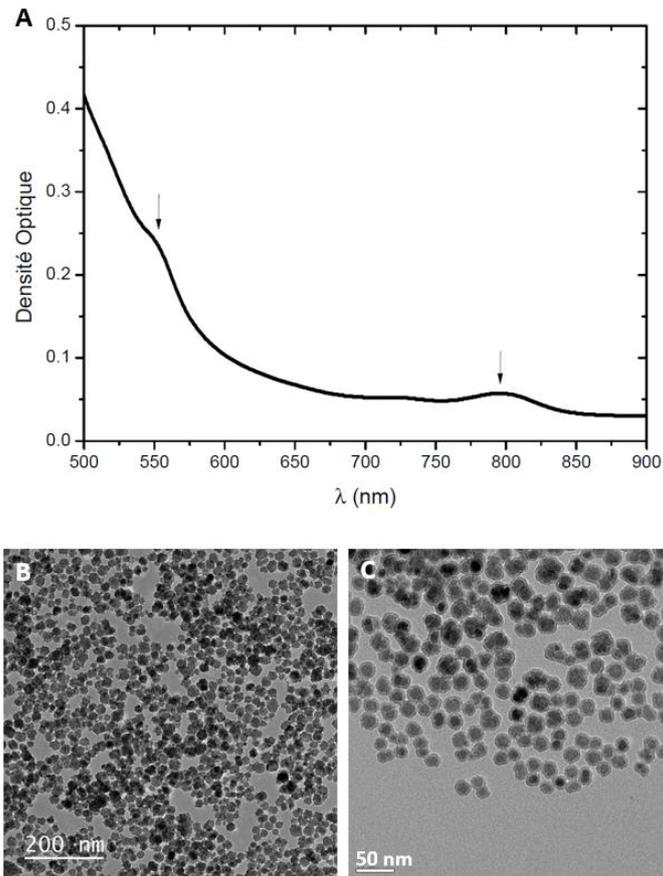


Figure 58 : Caractérisation des NF et des NF@SiO₂:DF. **A** – Spectre d’absorption des NF@SiO₂:DF validant la présence des deux fluorophores : Cy 3 avec un pic à 550 nm (flèche de gauche) et Cy 7.5 avec un pic à 790 nm (flèche de droite). **B et C** - Images de MET des NF (A) et des NF@SiO₂:DF (B)

3.1.3. Modifications de surface des NF@SiO₂:DF

Les NF@SiO₂:DF sont ensuite modifiées en surface avec un aminosilane, l’EDPS, elles deviennent alors des NF@SiO₂:DF-NH₃⁺. Cette modification de surface optimisée est issue du brevet WO2004107368A2. Afin de modifier la surface des nanoparticules et de la saturer, l’EDPS est ajouté dans un milieu hydro-alcoolique, en large excès (150 μmol/m²). Dans un premier temps, le film polysiloxane est adsorbé à la surface de la nanoparticule par formation de liaisons hydrogènes entre les silanols du film et les silanols présents à la surface des nanoparticules. L’étape de chauffage sous vide dans le glycérol permet ensuite la polycondensation des silanols ainsi que la libération des amines.

La modification de surface par l'EDPS a été vérifiée par des mesures du potentiel zêta en fonction du pH. Elle se caractérise notamment par le déplacement du point isoélectrique vers un pH = 9,5 correspondant au pKa de l'amine et de la zone de stabilité colloïdale (Figure 59).

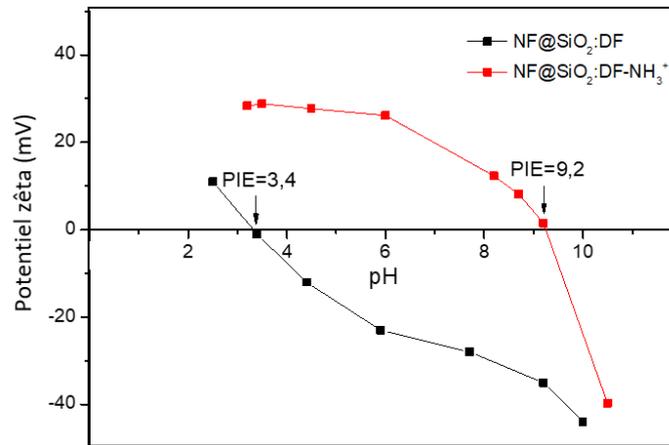


Figure 59 : Mesure du potentiel zêta en fonction du pH. Graphique montrant l'évolution du potentiel zêta en fonction du pH des NF@SiO₂:DF et des NF@SiO₂:DF-NH₃⁺

Les NF@SiO₂:DF-NH₃⁺ sont par la suite modifiées en surface avec des ammoniums quaternaires (Reinhardt *et al.*, 2015) afin de leur procurer une charge positive nette indépendante du pH. Ces NF sont nommées NF-Q. Cette modification de surface permet d'améliorer leur stabilité colloïdale en milieu physiologique et d'augmenter leur temps de résidence dans la matrice extracellulaire (Duan & Li, 2013; Matsumoto *et al.*, 2016). Cette charge nette en surface permettrait également de promouvoir l'endocytose au niveau des cellules tumorales du fait du caractère amphiphile cationique de la surface des NF.

La modification de surface des nanoparticules par les ammoniums quaternaires a fait également l'objet d'une caractérisation par zétamétrie en fonction du pH. La quaternisation des amines primaires présentes en surface est à l'origine d'une augmentation du potentiel zêta. Un déplacement du point isoélectrique de 10 à 11 est observé (Figure 60-A). Des mesures spectrophotométriques à 800 nm (transmittance) ont également été réalisées pour évaluer la stabilité en fonction du pH. Une augmentation de la densité optique (DO) à 800 nm correspond à une augmentation de la diffusion à l'origine de la floculation des NPs. Les mesures de DO montrent que les NF@SiO₂-NH₃⁺ se déstabilisent à partir de pH=9 tandis que les NF-Q sont stables d'un point de vue colloïdale jusqu'à pH=10 (Figure 60-B). Ce déplacement s'explique

par le fait que les amines primaires se déprotonnent à pH basique tandis que les ammoniums quaternaires possèdent une charge nette indépendante du pH. La déstabilisation des nanoparticules quaternisées est due à la dissociation de la silice en milieu basique. Ainsi, une augmentation de pH provoque l'apparition de charges négatives des groupements silanolates de surface.

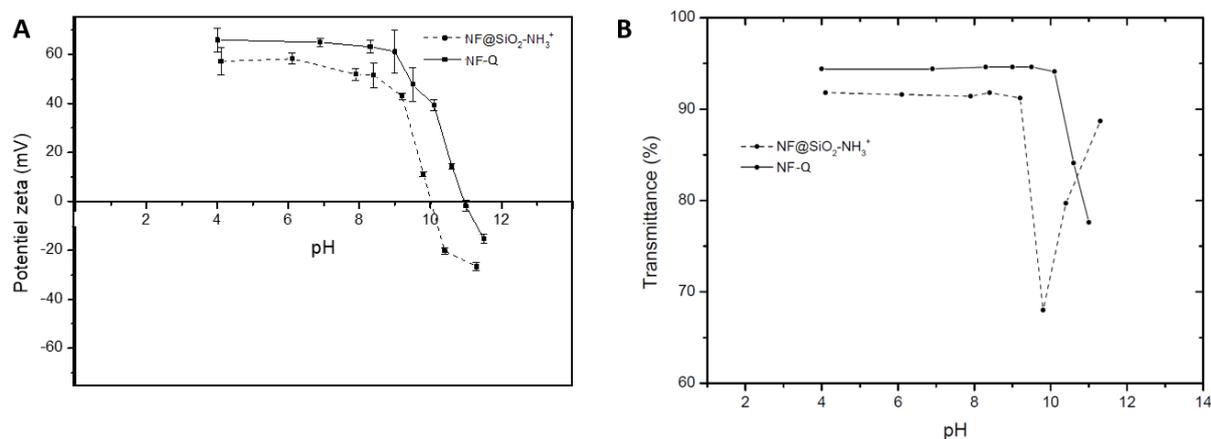


Figure 60 : Mesure du potentiel zêta et de la transmittance en fonction du pH. A - Evolution du potentiel zêta en fonction du pH des NF@SiO₂:DF-NH₃⁺ et des NF-Q. **B –** Evolution de la transmittance des NF@SiO₂:DF-NH₃⁺ et des NF-Q en fonction du pH permettant de déterminer les zones de stabilité colloïdale des NF@SiO₂:DF-NH₃⁺ et des NF-Q. Lorsque la transmittance est élevée, les nanoparticules sont stables et lorsqu'elle est faible, les nanoparticules sont déstabilisées.

Des mesures de transmission à 800 nm fixées à pH =7 en fonction de la concentration en sel (NaCl) ont été réalisées afin de comparer en milieu salin les deux types de modifications de surface, avant et après quaternisation (Figure 61). Les NF@SiO₂:DF-NH₃⁺ sont déstabilisées dès 10 mM en NaCl tandis que les NF-Q sont stables jusqu'à 150 mM en NaCl. La quaternisation permet donc d'accroître la stabilité colloïdale des NF en milieu salin. Ceci s'explique par la différence de taille entre les cations NH₃⁺ et ammonium quaternaire. Le cation ammonium quaternaire est plus gros que NH₃⁺ et sa charge est portée par l'azote tandis que la charge partielle de l'ammonium primaire est portée par les protons. L'ammonium quaternaire est moins sensible à l'écrantage des charges.

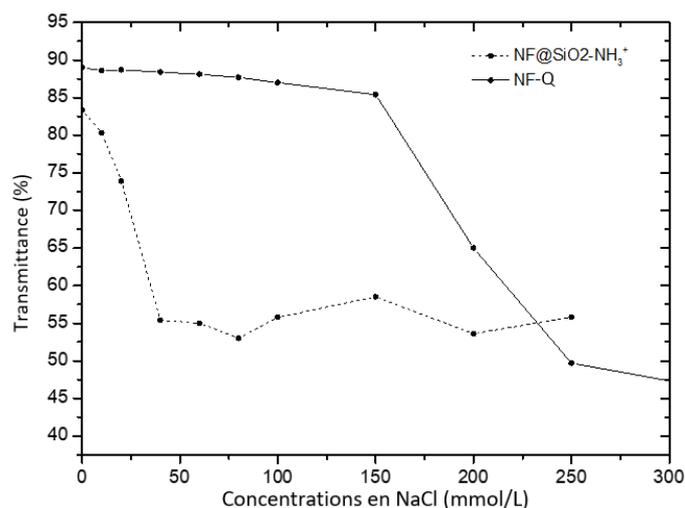


Figure 61 : Mesure de la transmittance en fonction de la concentration en NaCl. Evolution de la transmittance des dispersions de NF@SiO₂:DF-NH₃⁺ et des NF-Q en fonction de la concentration en NaCl pour un pH = 7.

3.1.4. Application du champ magnétique sur les NF-Q

Les NF-Q (8,85 g d'oxyde de fer/L) ont été soumises à un champ magnétique à une fréquence de $f = 473,5$ kHz et une amplitude de $H = 12$ kA/m pendant 5 minutes (Figure 62). Dès l'application du champ magnétique, une forte élévation de la température est observée, passant de $37,6$ °C à 67 °C en 2 minutes. Dans ces conditions expérimentales, le pouvoir chauffant des NF-Q est de 236 W/g.

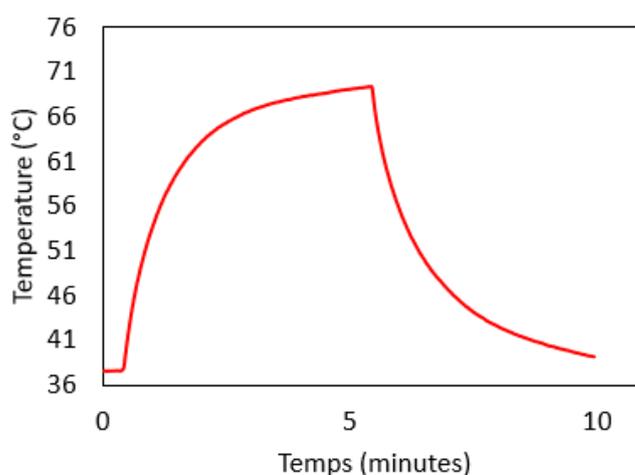


Figure 62 : Evolution de la température lors de l'application du champ magnétique sur les NF-Q. Le champ magnétique ($f = 473,5$ kHz ; $H = 12$ kA/m ; $t = 5$ minutes) est appliqué sur les NF-Q (8,85 g d'oxyde de fer/L) dans un tube.

3.2. Toxicité et internalisation des NF-Q

La viabilité cellulaire et l'internalisation des NF-Q ont été respectivement évaluées par BLI et cytométrie en flux sur les lignées cellulaires U87-CMV-LucF et RM1-CMV-LucF. Pour déterminer les conditions expérimentales conduisant à une internalisation maximale des NF-Q dans les cellules et une cytotoxicité minimale, plusieurs concentrations en NF-Q ont été étudiées (0 à 300 µg d'oxyde de fer/mL) pour 3 temps d'incubation différents (2 ; 18 ; 24 heures). Les analyses ont été effectuées à la fin du temps d'incubation. Le phénomène d'opsonisation résulte de l'absorption des protéines à la surface des NF-Q et diminue leur internalisation *in vitro* (Owens & Peppas, 2006). En culture cellulaire, les protéines sont apportées par le SVF ajouté à la culture à hauteur de 10 %. La composition exacte du SVF n'est pas connue mais il apporte aux cellules des éléments essentiels à la croissance cellulaire à long terme. En absence de SVF ou à faibles concentrations, les lignées U87 et RM1 dépérissent rapidement. Pour le temps d'incubation court (2 heures), le milieu de culture complet (10 % de SVF) a été remplacé par du milieu de culture supplémenté de 2 % de SVF alors que pour les temps d'incubation longs (18 et 24 heures), le milieu de culture complet a été conservé.

Comme le montre la figure 63 A et B, les NF-Q n'induisent pas de diminution du signal BLI pour les cellules RM1 et une faible diminution à certaines conditions pour les cellules U87. Dans tous les cas, la viabilité des deux types cellulaires est supérieure ou égale à 80 %.

L'internalisation des NF-Q dans les cellules a été mesurée par cytométrie en flux. Après 2 heures d'incubation, le niveau de fluorescence des cellules U87 et RM1 atteint un plateau pour des concentrations en NF-Q supérieures à 150 µg d'oxyde de fer/mL. Pour les temps d'incubation de 18 et 24 heures, on observe le même phénomène où l'internalisation des NF-Q atteint un plateau à une concentration supérieure à 250 µg d'oxyde de fer/mL (Figure 63-C et D).

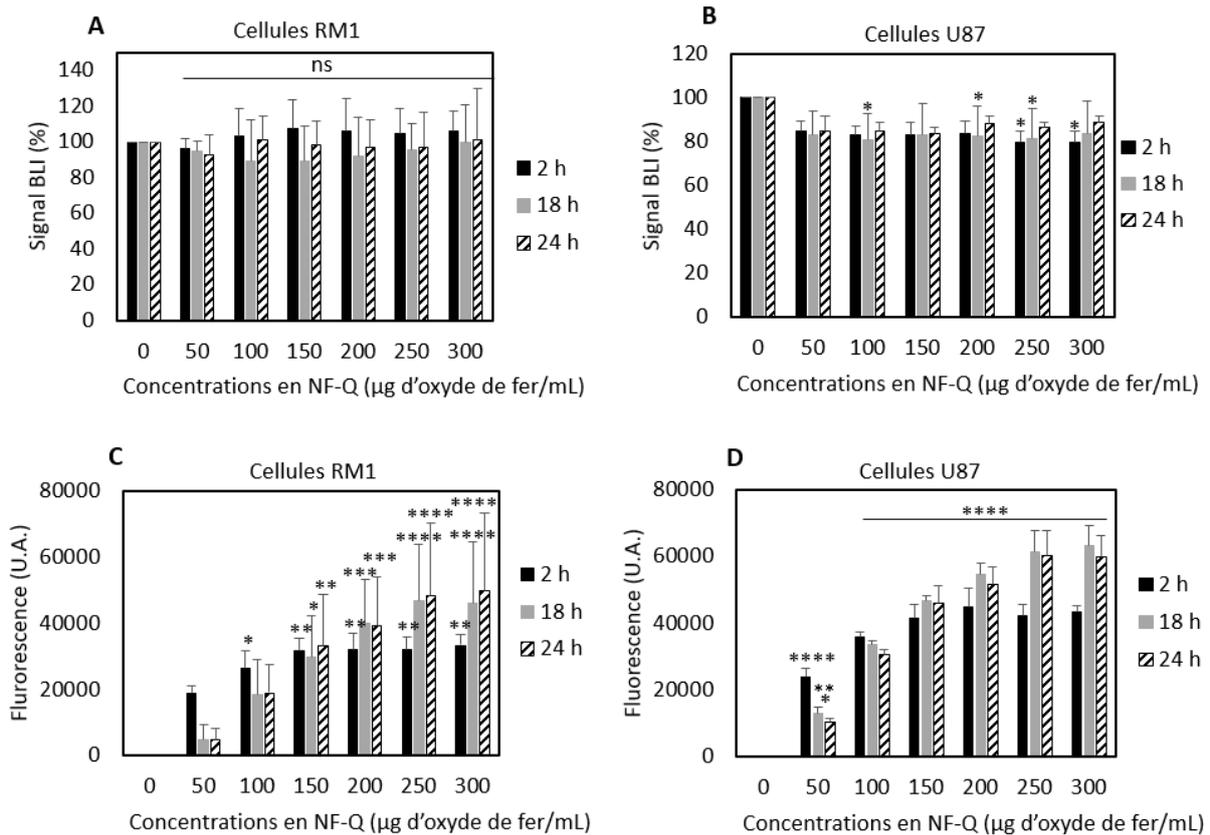


Figure 63 : Cytotoxicité et l'internalisation des NF-Q dans les cellules U87 et les RM1. Le signal BLI aux différents temps d'incubation (2, 18 et 24 heures) dans les cellules RM1-CMV-LucF (A) (N = 3) et U87-CMV-LucF (B) (N = 3) après ajout des NF-Q dans le milieu de culture. L'intensité de fluorescence des cellules RM1-CMV-LucF (C) (N = 3) et des U87-CMV-LucF (D) (N = 3) après ajout des NF-Q dans le milieu de culture pour les différents temps d'incubation (2, 18 et 24 heures). Les analyses statistiques ont été réalisées avec un test ANOVA à 2 facteurs.

Les conditions de 250 µg d'oxyde de fer/mL pour un temps d'incubation de 24 heures conduisent à une internalisation maximale des NF-Q. Elles ont donc été sélectionnées pour la suite des expérimentations. La quantité totale de fer dans les cellules a ensuite été déterminée par spectrométrie à 350 nm suite à la destruction du fer à l'acide chlorhydrique (5 M). Dans ces conditions, une cellule contient 300 pg de fer.

Pour évaluer l'efficacité de la modification de surface, une étude comparative sur la cytotoxicité et l'internalisation des NF-Q et des NF@SiO₂:DF-NH₃⁺ a été effectuée. Les NPMs ont été ajoutées directement dans le milieu de culture des cellules U87 et RM1 à une concentration de 250 µg d'oxyde de fer/mL pendant 24 heures. La viabilité cellulaire, évaluée

par BLI, montre que les NF-Q et les NF@SiO₂:DF-NH₃⁺ induisent aucun effet cytotoxique (Figure 64-A et B). Toutefois, la quantité de NF-Q internalisées est significativement plus importante par rapport à la quantité de NF@SiO₂:DF-NH₃⁺ internalisées dans les deux types cellulaires (Figure 64-C et D). La modification de surface des nanofleurs avec l'ajout de groupements d'ammoniums quaternaires améliore donc leur internalisation dans les cellules RM1 (augmentation d'environ 40 %) et dans les cellules U87 (augmentation d'environ 30 %). Puisque l'objectif de ce projet est d'atteindre une concentration maximale en nanofleurs intracellulaires, les NF-Q ont été retenues pour le reste des expérimentations.

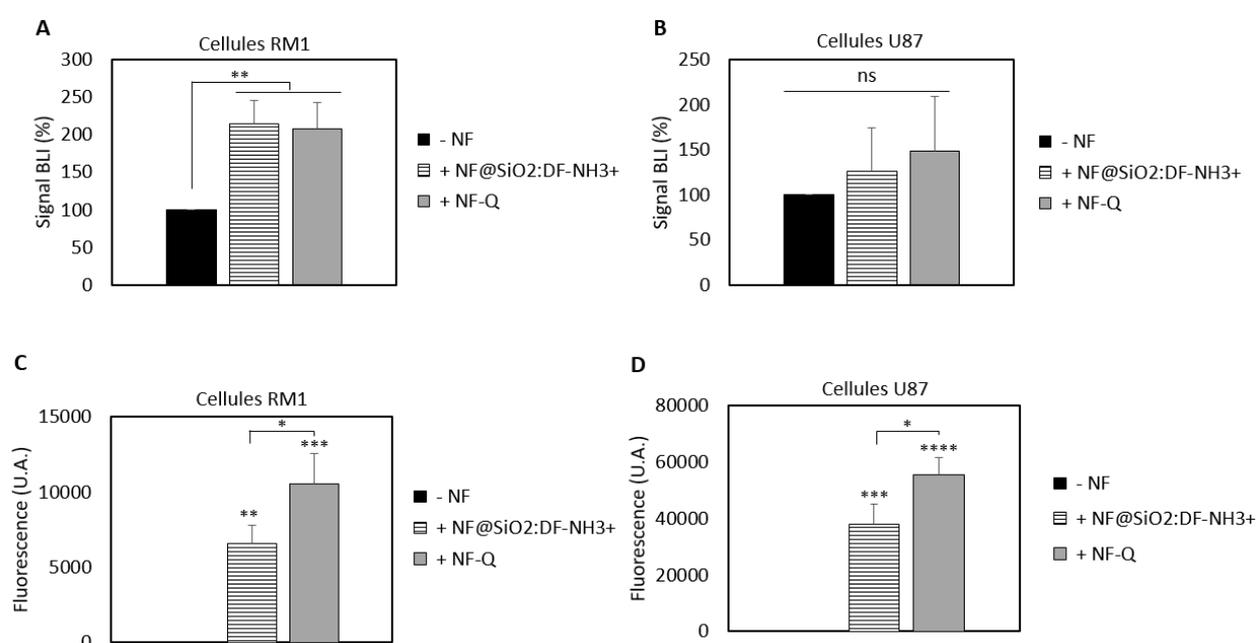


Figure 64 : Intérêt de la modification de surface des nanofleurs avec les groupements d'ammoniums quaternaires. A et B - Cellules RM1 (A) (N = 3) et U87 (B) (N = 3), exprimant de manière constitutive la LucF, sans nanofleur (- NF) ou contenant des nanofleurs sans groupement quaternaire (+ NF@SiO₂:DF-NH₃⁺) ou des nanofleurs avec des groupements quaternaires (+ NF-Q). La viabilité cellulaire est évaluée par BLI. C et D - Intensité de fluorescence des cellules RM1 (C) (N = 3) et U87 (D) (N = 3) sans nanofleurs (- NF) ou contenant des nanofleurs sans groupement quaternaire (+NF@SiO₂:DF-NH₃⁺) ou des nanofleurs avec des groupements quaternaires (+ NF-Q). L'intensité de fluorescence par cellule a été mesurée par cytométrie en flux. Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant un test ANOVA à 2 facteurs.

3.3. Localisation intracellulaire des NF-Q

La localisation intracellulaire des NF-Q a été étudiée par trois méthodes : coloration au bleu de Prusse, immunohistochimie et MET. La coloration au bleu de Prusse permet de révéler le fer (bleu foncé) dans les cellules dont les noyaux sont colorés en rose (Figure 65-A). En absence de NF-Q (- NF-Q) aucune coloration bleue est détectée dans les cellules. Au contraire, les cellules incubées en présence de NF-Q (+ NF-Q) présentent de nombreux points bleus dus à l'internalisation des NF-Q dans les cellules.

L'étude par immunohistochimie (Figure 65-B) révèle une faible co-localisation (en jaune, signalée par des flèches) entre les NF-Q (en rouge) et le marqueur lysosomal, Lamp-1 (en vert). La majorité des NF-Q semble être localisée dans le cytoplasme en dehors des lysosomes.

L'analyse par MET confirme les résultats obtenus par immunohistochimie (Figure 65-C). Les NF-Q s'internalisent dans les cellules et s'accumulent dans des grandes vésicules (entre 1 et 8 μm) dont le diamètre est supérieur à celui des lysosomes. La forme de ces vésicules est variée et ne correspond pas à la forme ronde caractéristique des lysosomes. Néanmoins, une faible quantité de NF-Q est localisée dans des vésicules d'un plus petit diamètre pouvant être des lysosomes, ce qui est en accord avec la faible co-localisation des NF-Q et de la protéine Lamp-1 détectée par immunohistochimie. De rares NF-Q sont également observées libres dans le cytoplasme. L'observation des cellules à 6 puis 24 heures d'incubation permet de mettre en évidence des vésicules de diamètres croissants suggérant une internalisation continue des NF-Q au cours du temps.

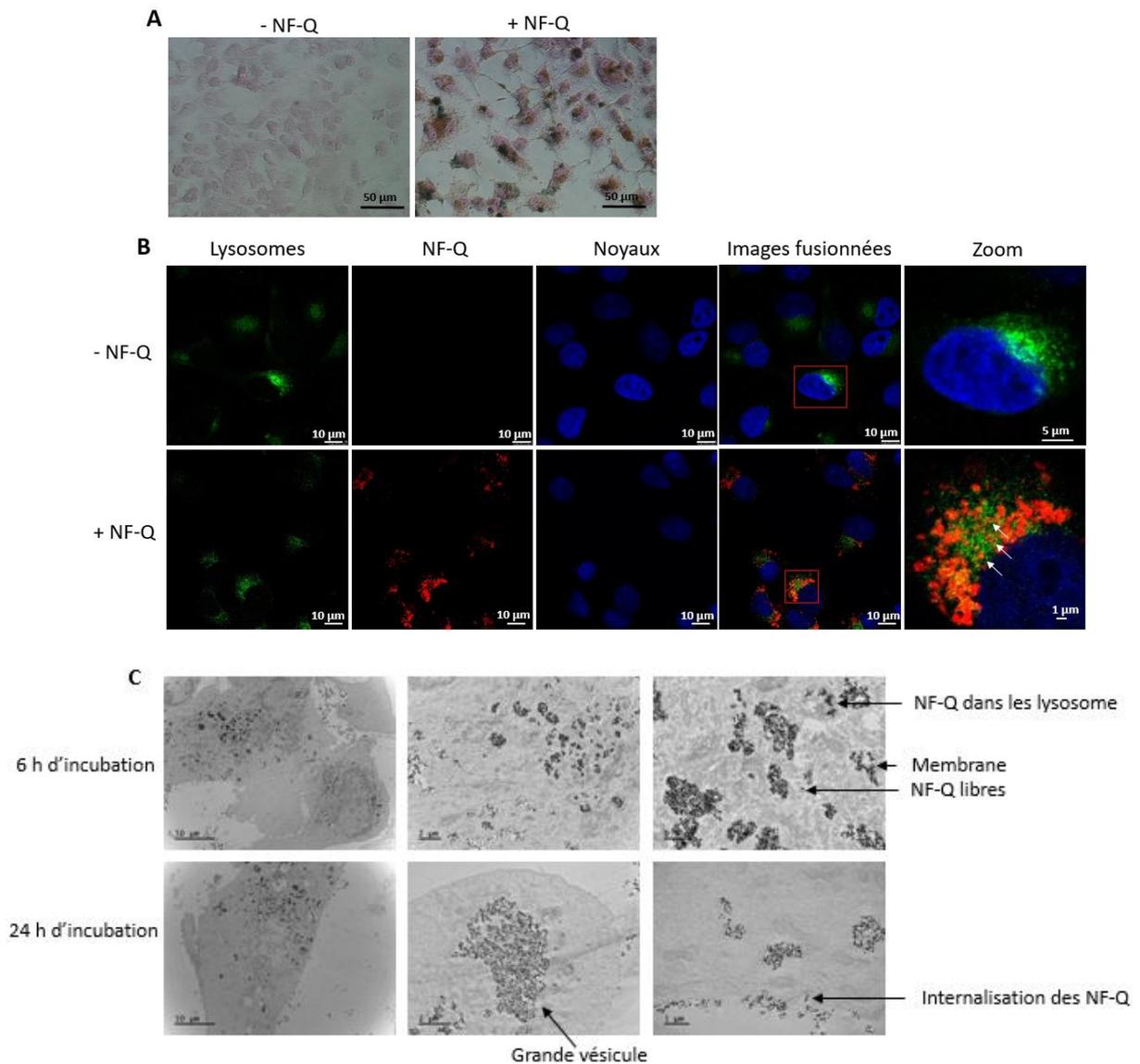


Figure 65 : Localisation intracellulaire des NF-Q dans les cellules U87. **A** - Coloration au bleu de Prusse caractérisée par une coloration nucléaire rose et une coloration du fer bleue foncée. Cette coloration a été effectuée sur des cellules seules (- NF-Q) et des cellules contenant des NF-Q (+ NF-Q). **B** – Immunohistochimie des cellules seules (- NF-Q) et des cellules contenant des NF-Q (+ NF-Q) avec un immunomarquage des lysosomes (protéine Lamp-1, vert), des NF-Q (Cy 3, rouge) et du noyau (DAPI, bleu). **C** - Images de MET avec deux temps d'incubation (6 et 24 heures) des cellules U87 contenant des NF-Q.

L'ensemble de ces résultats montrent que les NF-Q s'internalisent dans les cellules et s'accumulent peu dans les lysosomes mais principalement dans des vésicules de grandes tailles contenant des NF-Q en grand nombre.

3.4. Induction d'une hyperthermie magnétique intracellulaire *in vitro*

Les cellules contenant des NF-Q ont ensuite été soumises au champ magnétique ($f = 473,5$ kHz, $H = 12$ kA/m, $t = 1$ heure) afin d'étudier leur effet sur la viabilité cellulaire *in vitro*. La viabilité cellulaire a été évaluée par BLI en comparant le signal avant et celui 24 heures après l'application du champ magnétique. La mesure de la température du milieu de culture pendant l'application du champ magnétique augmente très faiblement ($1,5$ °C) et la différence n'est pas significative (Figure 66-A). Les NF-Q seules et l'application du champ magnétique seul n'induisent pas d'effet cytotoxique. Dans les deux cas, une augmentation du signal BLI est observée mettant en évidence la prolifération cellulaire. Lorsque les cellules contenant des NF-Q sont soumises au champ magnétique, le signal BLI n'augmente pas suggérant un ralentissement de la prolifération cellulaire (Figure 66-B).

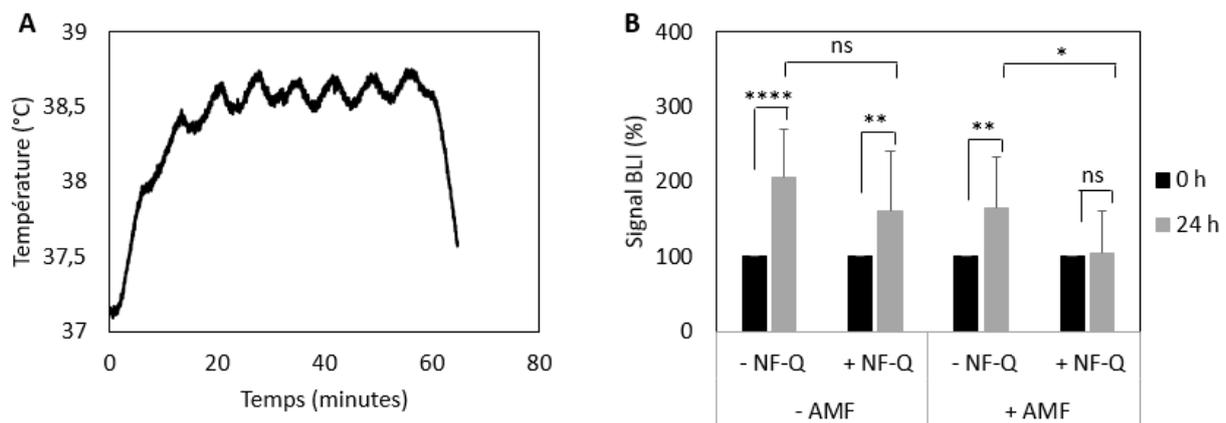


Figure 66 : Effet d'une hyperthermie magnétique intracellulaire sur la viabilité des cellules U87 contenant des NF-Q *in vitro*. A- Suivi de la température du milieu de culture lors de l'application du champ magnétique sur les cellules contenant des NF-Q. B – Effet de l'application du champ magnétique sur la viabilité cellulaire (avant et 24 heures après application du champ magnétique) évalué par BLI sur les cellules U87-CMV-LucF contenant (+ NF-Q) ou non (-NF-Q) des NF-Q (N = 14). Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant les tests ANOVA à 2 facteurs.

Des effets cellulaires délétères induits par hyperthermie magnétique sans augmentation significative de la température ont déjà été décrits (Moros *et al.*, 2015; Clerc *et al.*, 2018). Cette hyperthermie modérée est caractérisée par l'activation du processus de cytoprotection impliquant les Hsp. Afin de la mettre en évidence, l'activation du promoteur Hsp70 a été utilisée comme témoin de chauffage (Moros *et al.*, 2015). Pour confirmer cette hypothèse, nous avons

utilisé une lignée de cellules U87 génétiquement modifiées pour exprimer la LucF sous le contrôle du promoteur Hsp70 (U87-Hsp-LucF). De manière physiologique, ce promoteur est activé par un choc thermique et la réponse thermo-induite de cette lignée cellulaire a été caractérisée (Eker *et al.*, 2011). L'activation du promoteur Hsp70 est dépendante de la dose thermique (Deckers *et al.*, 2012) et son activation peut être mesurée par BLI 6 heures après chauffage.

La figure 67 ne montre pas d'augmentation du signal BLI après application du champ magnétique. Des cellules chauffées au bain-marie à 45 °C pendant 8 minutes ont été utilisées comme témoin positif de l'activation du promoteur Hsp70 et montrent une augmentation drastique du signal BLI 6 heures après chauffage (Figure 67). L'hyperthermie magnétique induite par les NF-Q n'induit pas de stress cellulaire pouvant activer le promoteur Hsp70.

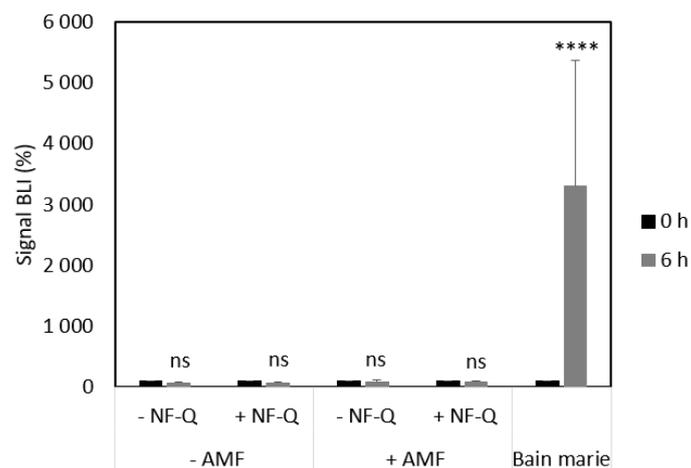


Figure 67 : Effet de l'hyperthermie magnétique intracellulaire sur l'activation du promoteur Hsp70 dans les cellules U87 contenant des NF-Q *in vitro*. Signal BLI avant et 6 heures après application du champ magnétique mettant en évidence l'activation du promoteur Hsp70 dans les cellules U87-Hsp70-LucF (N = 12). Le bain marie (45°C, 8 min) (N = 8) est utilisé comme contrôle positif de l'activation du promoteur Hsp70. Les analyses statistiques ont été réalisées par un test ANOVA à 2 facteurs.

3.5. Induction d'une hyperthermie magnétique intracellulaire *in vivo*

In vivo, dans la tumeur, le contexte cellulaire est très différent de celui, *in vitro*, en culture cellulaire monocouche en particulier la régulation thermique. Pour étudier l'impact réel de l'hyperthermie magnétique intracellulaire sur la viabilité cellulaire et la croissance tumorale,

des cellules contenant préalablement des NF-Q ont été implantées ($2 \cdot 10^6$ cellules/ 100 μ L de PBS) en sous-cutané chez la souris et se sont organisées progressivement en tumeurs (Figure 68-A). Les cellules U87-CMV-LucF et les cellules RM1-CMV-LucF ont respectivement été implantées chez des souris immunodéficientes et immunocompétentes. Les cellules contenant des NF-Q ont été implantées dans la patte droite alors que des cellules seules ont été implantées dans la patte gauche (tumeur contrôle). Le champ magnétique ($f = 473,5$ kHz, $H = 12$ kA/m, $t = 15$ minutes) a été appliqué sur la moitié des souris 1 heure après implantation des cellules. La croissance tumorale est suivie par BLI pendant 72 heures après application du champ magnétique (Figure 68-B).

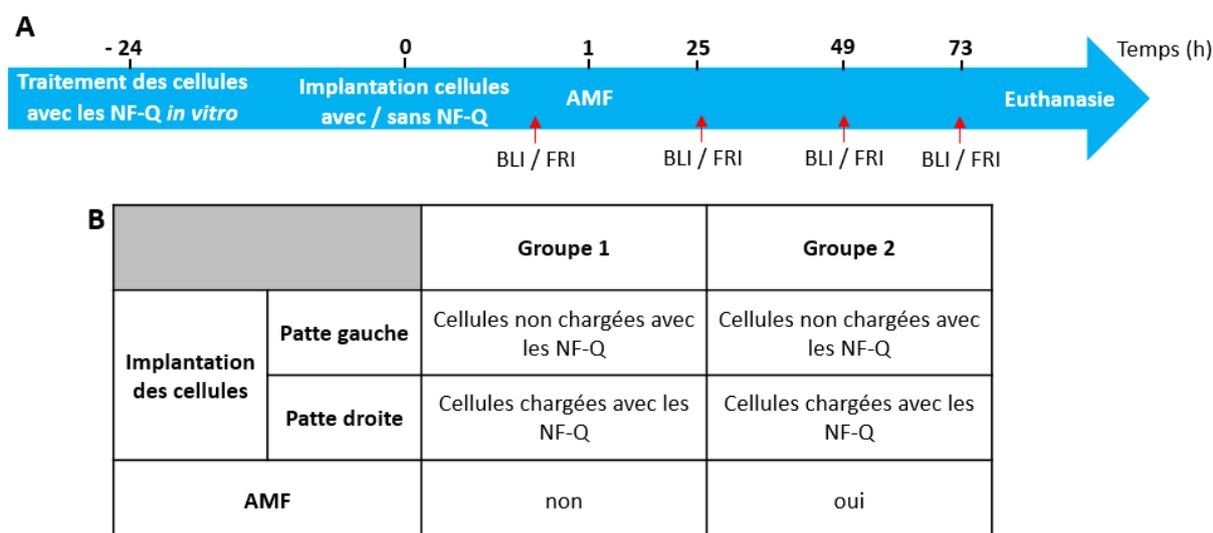


Figure 68 : Conditions expérimentales. **A- Chronologie expérimentale :** *In vitro*, les cellules sont traitées avec des NF-Q pendant 24 heures à une concentration de 250 μ g d'oxyde de fer/mL (soit 300 pg de fer /cellule), et après plusieurs lavages, les cellules ont été implantées ($2 \cdot 10^6$ cellules / 100 μ L de PBS) en sous-cutané dans la patte arrière droite des souris (+ NF-Q). Le même nombre de cellules ne contenant pas de NF-Q a été implanté par voie sous-cutanée dans la patte arrière gauche (- NF-Q). La moitié des souris ont ensuite été soumises au champ magnétique 1 heure après implantation des cellules ($f = 473,5$ kHz, $H = 12$ kA/m, $t = 15$ min). La croissance tumorale et les NF-Q ont respectivement été suivies par BLI et FRI. **B –** Différents groupes de souris formés lors de cette étude.

Lors de l'application du champ magnétique, la température des tumeurs est suivie en temps réel à l'aide d'une caméra thermique. La température des tumeurs issues des cellules contenant des NF-Q atteint 44 °C alors que celle des tumeurs contrôles ne varie pas (Figure 69).

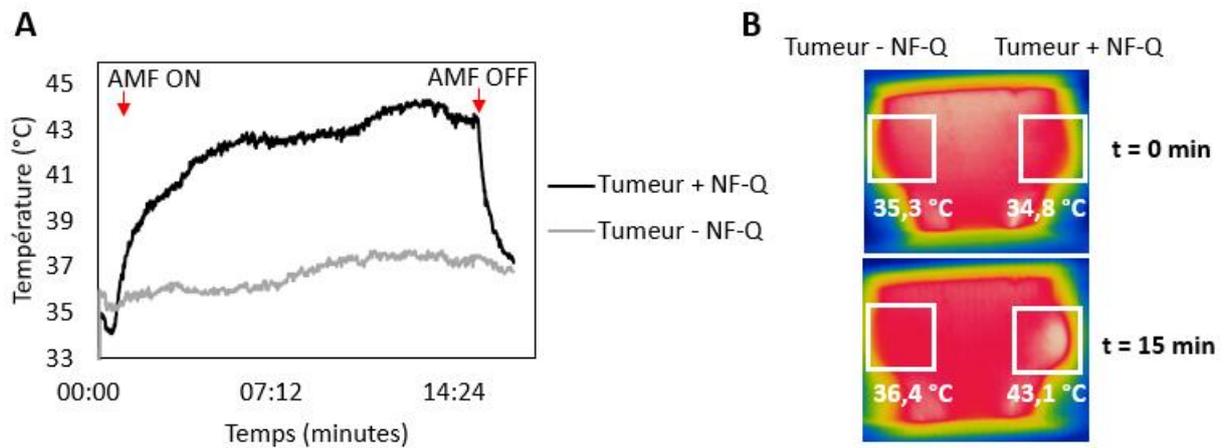


Figure 69 : Suivi de la température des tumeurs lors de l'application du champ magnétique. **A** - Suivi de la température des tumeurs pendant l'application du champ magnétique avec une caméra infrarouge. **B** - Images de la caméra infrarouge au début (t = 0 min) et à la fin (t = 15 min) de l'application du champ magnétique. AMF = champ magnétique alternatif ; Tumeur + NF-Q = tumeur contenant des NF-Q ; Tumeur - NF-Q = tumeur sans NF-Q.

L'application du champ magnétique sur les tumeurs seules ne modifie pas la croissance tumorale (Figure 70-A à C). Le profil de croissance des deux types de tumeurs est également identique entre les tumeurs contenant des NF-Q et soumises au champ magnétique et celles contenant des NF-Q et non soumises au champ magnétique (Figure 70-D à F). L'hyperthermie induite avec des NF-Q intercellulaires ne semble pas conduire à des effets délétères pour la tumeur.

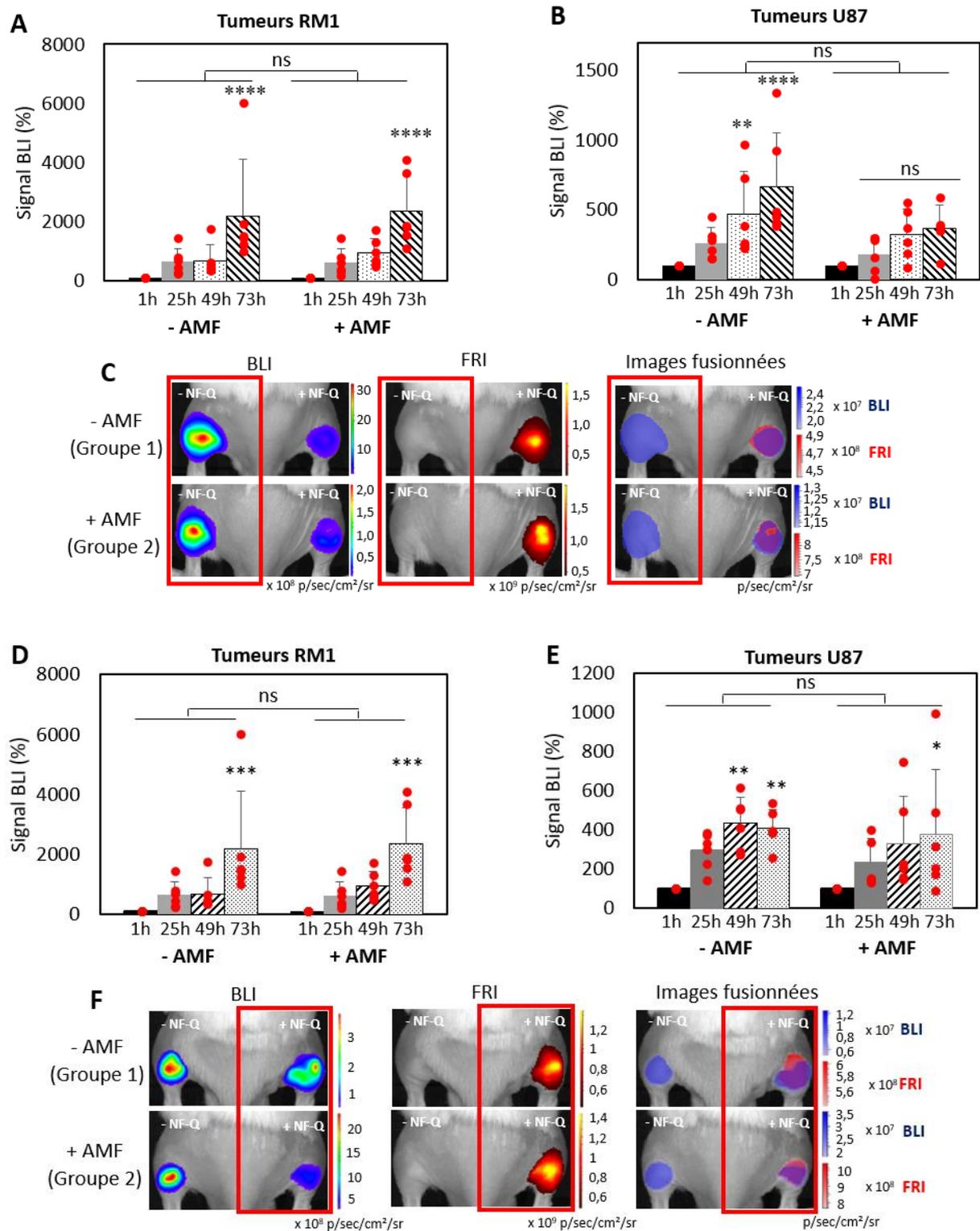


Figure 70 : Application du champ magnétique *in vivo* sur des cellules traitées *in vitro* avec des NF-Q. A et B – Suivi du signal BLI des souris portant des tumeurs RM1 (N = 6) (A) ou des tumeurs U87 (N = 6) (B) sans NF-Q et soumises au champ magnétique (+ AMF) ou non (- AMF) ($f = 473,5$ kHz, $H = 12$ kA/m, $t = 15$ minutes). C – Images de BLI et FRI et images fusionnées pour les souris portant des tumeurs contenant des NF-Q (+ NF-Q) et des tumeurs sans NF-Q (- NF-Q) (cadres rouges) et soumises au champ magnétique (+ AMF) ou non (- AMF). D et E – Suivi du signal BLI des souris portant des tumeurs RM1 (N = 6) (D) ou des

tumeurs U87 (N = 6) (**E**) contenant des NF-Q et soumises au champ magnétique (+ AMF) ou non (- AMF) ($f = 473,5$ kHz, $H = 12$ kA/m, $t = 15$ minutes). **F** – Images de BLI et FRI et images fusionnées pour les souris portant des tumeurs contenant des NF-Q (+ NF-Q) (cadres rouges) et des tumeurs sans NF-Q (- NF-Q) et soumises au champ magnétique (+ AMF) ou non (- AMF). Dans les graphes, les points rouges représentent le signal BLI de chaque souris et les histogrammes représentent la moyenne de ces signaux \pm SD pour chaque condition. Les analyses statistiques ont été réalisées avec un test ANOVA à 2 facteurs.

L'ensemble des résultats de cette étude utilisant des NF-Q montrent une forte accumulation dans les cellules tumorales avec une faible cytotoxicité même après application du champ magnétique. Les NF-Q intracellulaires ne semblent donc pas induire d'effet cytotoxique.

3.6. Hyperthermie magnétique locale pour une thermoablation tumorale

Compte tenu de leur SAR élevé, les NF-Q ont été testées pour leur performance à induire une thermoablation tumorale. Des tumeurs U87 ou RM1 ont été générées sur chacune des pattes arrières des souris (Figure 71-A). Chaque souris possède deux tumeurs, une a reçu une injection de NF-Q (1,3 mg d'oxyde de fer dans 10 μ L pour les tumeurs U87 ou 40 μ L pour les tumeurs RM1) et la tumeur contra-latérale a reçu une injection d'un volume identique de sérum physiologique. La moitié des souris ont été soumises au champ magnétique ($f = 473,5$ kHz, $H = 12$ kA/m, $t = 15$ min), 4 fois (4, 8, 24 et 48 heures après injection), 4 heures après injection. La croissance et la viabilité tumorale ont été évaluées par BLI et la localisation des NF-Q dans la souris a été suivie par FRI (Figure 71-B).

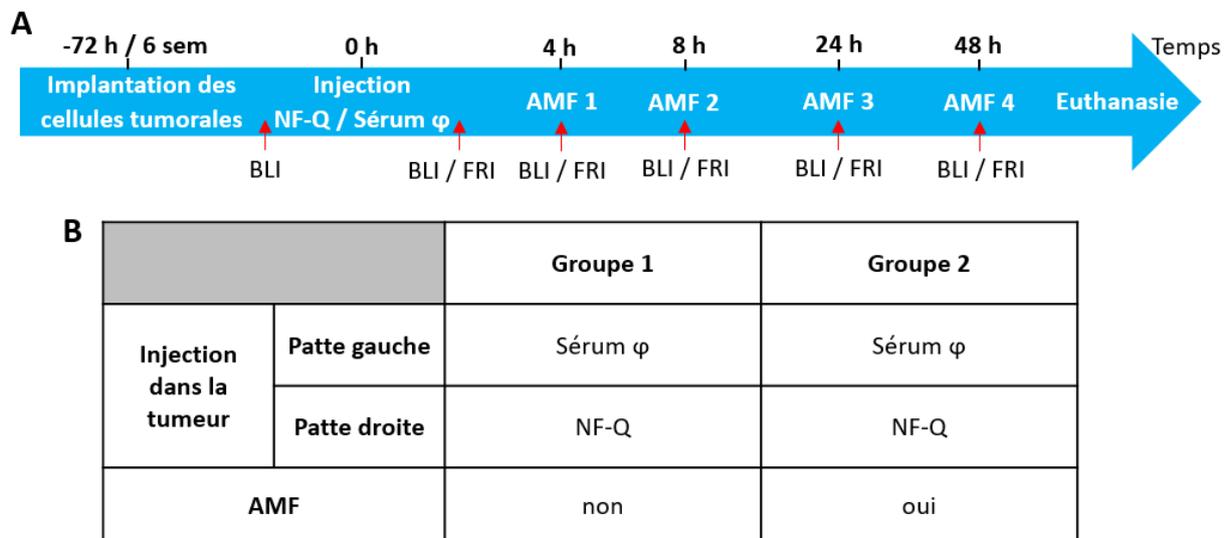


Figure 71 : Conditions expérimentales. **A- Chronologie expérimentale :** Sur chaque patte arrière, une tumeur RM1, générée en 72 heures, ou une tumeur U87, générée en 6 semaines, a été implantée en sous-cutané. Les souris ont ensuite reçu une injection de sérum physiologique (Sérum ϕ) dans la tumeur de la patte gauche et une injection de NF-Q (1,3 mg d'oxyde de fer/tumeur) dans la tumeur de la patte droite. La moitié des souris a été soumise 4 fois au champ magnétique (4, 8, 24 et 48 heures après injection) 4 heures après l'injection. La croissance tumorale et la localisation des NF-Q ont respectivement été suivies par BLI et FRI. **B –** Différents groupes de souris formés lors de cette étude.

La température des tumeurs a été suivie en temps réel lors de l'application du champ magnétique avec une caméra infrarouge (Figure 72). Lorsque les tumeurs injectées avec les NF-Q sont soumises à un champ magnétique, la température de la tumeur augmente pendant la procédure pour atteindre 53 °C alors que la température des tumeurs contrôles reste à 37 °C. L'augmentation de la température est identique à chaque application du champ magnétique.

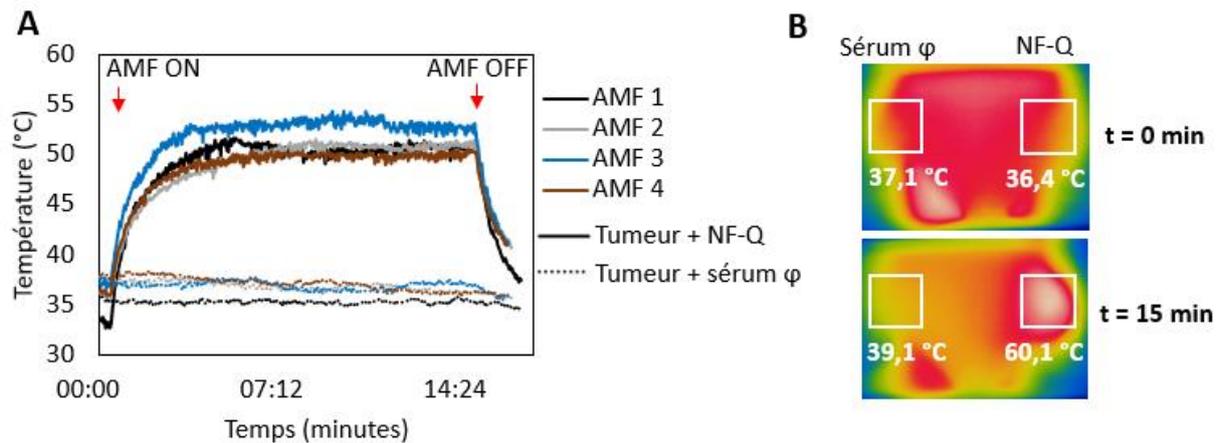


Figure 72 : Suivi de la température tumorale lors de l'application du champ magnétique. **A-** La température des tumeurs a été suivie lors de l'application du champ magnétique avec une caméra infrarouge. **B** – Images de la caméra infrarouge au début ($t = 0$ min) et à la fin ($t = 15$ min) de l'application du champ magnétique. Sérum ϕ = Sérum physiologique ; AMF = champ magnétique

En absence de champ magnétique, le signal BLI des tumeurs RM1 injectées avec les NF-Q (Figure 73-A) augmente alors qu'il reste stable pour les tumeurs U87 (Figure 73-B). Cette différence s'explique par la prolifération rapide *in vivo* des cellules RM1 par rapport aux cellules U87. L'application du champ magnétique sur les tumeurs U87 ou RM1 injectées avec du sérum physiologique (tumeur contrôle) ne modifie pas la croissance tumorale (données non montrées). Les tumeurs injectées avec les NF-Q et soumises au champ magnétique montrent une forte diminution du signal de BLI, dès la première application du champ magnétique et le signal reste faible jusqu'à la fin de l'étude. La localisation des NF-Q a été évaluée par FRI et montre que pour les petites tumeurs (Figure 73-C, ligne du milieu), les NF-Q ont diffusé dans la totalité de la tumeur. Après l'application du champ magnétique, le signal BLI de ces petites tumeurs a totalement disparu indiquant une thermoablation tumorale complète. Pour les tumeurs avec un plus grand diamètre (Figure 73-C, dernière ligne), les NF-Q ont diffusé uniquement dans une partie de la tumeur qui coïncide avec la partie ablatée après application du champ magnétique (thermoablation partielle).

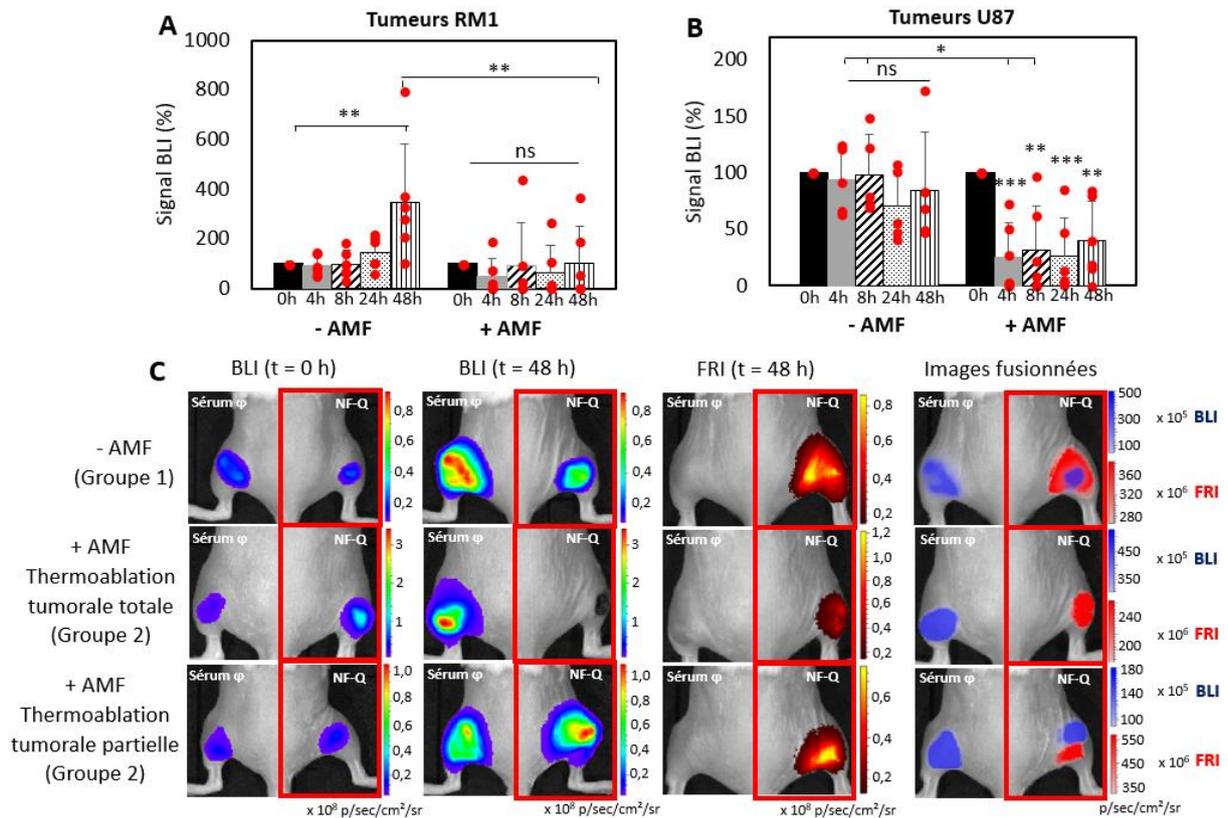


Figure 73 : Thermoablation totale ou partielle par hyperthermie magnétique *in vivo*. A et B - Suivi du signal BLI des tumeurs RM1 (A) ou des tumeurs U87 (B) contenant des NF-Q et soumises au champ magnétique (+ AMF) (N = 6) ou non (- AMF) (N = 6). C – Images de BLI, FRI et images fusionnées montrant une thermo-ablation tumorale partielle ou totale par hyperthermie magnétique. Dans les graphes, les points rouges représentent le signal BLI de chaque souris et les histogrammes représentent la moyenne de ces signaux \pm SD pour chaque condition. Les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant un test ANOVA à 2 facteurs.

Lorsqu'elles sont injectées dans les tumeurs et soumises au champ magnétique, les NF-Q induisent une forte augmentation de la température locale grâce à leur SAR élevé. Cette augmentation de température conduit à la mort des cellules cancéreuses. La zone d'ablation est spatialement corrélée avec la localisation des NF-Q dans la tumeur résultant à une thermoablation tumorale partielle ou totale. La diminution du signal BLI est observée dès la première application du champ magnétique et n'est pas amplifiée avec les applications suivantes. Les NF-Q restent principalement localisées dans la tumeur et atteignent quasiment la même température pour chaque application de champ magnétique.

3.7. Localisation intratumorale des NF-Q

La localisation des NF-Q dans les tumeurs a ensuite été étudiée par histologie. Les tumeurs ont été prélevées à la fin de l'étude (72 heures). La coloration au bleu de Prusse révèle que les NF-Q restent groupées en paquets dans le tissu (Figure 74-A). Pour les cellules proches des NF-Q, l'intensité de la coloration rose du noyau diminue après application du champ magnétique reflétant la mort des cellules tumorales (Figure 74-B). Ces cellules n'ont pas de marquage bleu foncé, elles ne contiennent donc pas de NF-Q ce qui montre que la mort de ces cellules tumorales n'a pas été induite par des NF-Q intracellulaires mais certainement par une augmentation de la température autour des NF-Q suite à la diffusion de la chaleur dans les cellules environnantes.

L'étude d'immunohistochimie n'a pu être effectuée sur les tissus exposés au champ magnétique car ils étaient trop endommagés. En absence de champ magnétique, les images de microscopie confocale montrent une localisation des NF-Q principalement dans le milieu extracellulaire et une faible quantité dans les lysosomes (Figure 74-C). Compte tenu des résultats obtenus sur les cellules en culture et de la faible quantité de NF-Q intracellulaire observée après injection intra-tumorale, il est peu probable que les NF-Q accumulées dans les cellules soient responsables de la mort cellulaire. Dès lors, la thermoablation tumorale observée *in vivo* serait principalement due à l'augmentation significative de la température par des NF-Q localisées dans le milieu extracellulaire.

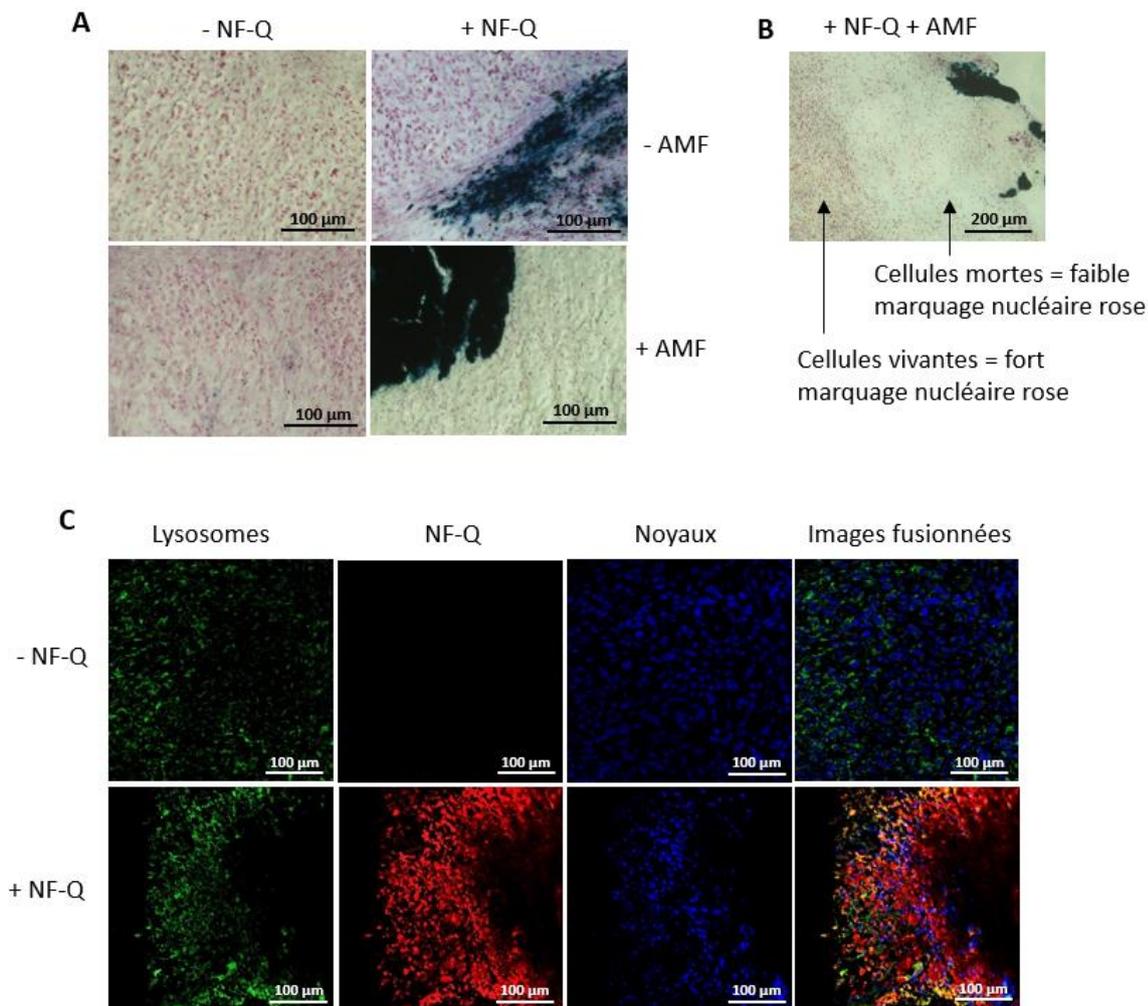


Figure 74 : Localisation des NF-Q dans la tumeur. **A** – Coloration au bleu de Prusse sur des coupes de tumeurs sans NF-Q (- NF-Q) et des coupes de tumeurs contenant des NF-Q (+ NF-Q) exposées au champ magnétique (+ AMF) ou non (- AMF). Les noyaux sont colorés en rose et le fer en bleu foncé. **B**- Le marquage nucléaire des cellules proches des NF-Q est de plus faible intensité suite à l'application du champ magnétique. **C** – Immunohistochimie sur des coupes de tumeurs sans NF-Q (- NF-Q) et des coupes de tumeurs contenant des NF-Q (+ NF-Q) sans application du champ magnétique. Les noyaux sont marqués au DAPI (bleu), les NF-Q avec le fluorophore Cy3 (rouge) et les lysosomes avec un anticorps primaire dirigé contre la protéine Lamp-1 (vert).

3.8. Corrélation entre la dose de NF-Q injectée et l'efficacité de l'hyperthermie magnétique

La concentration en NF-Q et leur distribution spatiale dans la tumeur est difficile à contrôler *in vivo*. Pour mettre en évidence l'impact de la concentration en NF-Q dans la tumeur et l'efficacité de l'hyperthermie magnétique, une étude *in vivo* a été réalisée avec une quantité en NF-Q injectée plus faible dans un volume identique (0,6 mg de fer dans 40 μ L pour les

tumeurs RM1). La moitié des souris a ensuite été soumise à une seule application de champ magnétique ($f = 473,5$ kHz, $H = 12$ kA/m, $t = 15$ minutes) 4 heures après injection (Figure 75). Les résultats précédents ont montré que la première application du champ magnétique est la plus efficace et que les autres n'apportent pas d'effet supplémentaire.

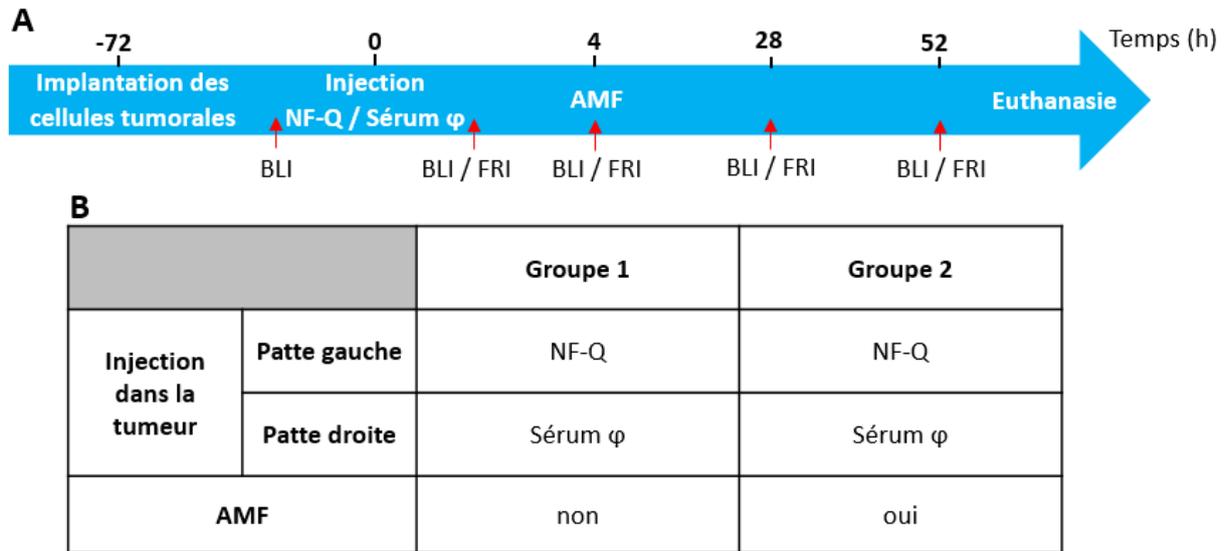


Figure 75 : Conditions expérimentales. **A- Chronologie expérimentale :** Une tumeur RM1 a été générée sur chaque patte arrière des souris immunocompétantes. Après 72 heures, la tumeur de la patte gauche a reçu une injection de NF-Q (0,3 mg d'oxyde de fer dans 100 μ L de PBS) et la tumeur de la patte droite a reçu un même volume de sérum physiologique. La moitié des souris a été soumise au champ magnétique ($f = 473,5$ kHz, $H = 12$ kA/m, $t = 15$ minutes) 4 heures après injection. La croissance tumorale et la localisation des NF-Q ont été respectivement suivies par BLI et FRI. **B –** Différents groupes de souris formés pour l'étude. Sérum ϕ = sérum physiologique ; AMF = champ magnétique alternatif

Lors de l'application du champ magnétique, la température de la tumeur injectée avec les NF-Q atteint 47 °C ce qui est plus faible que la température atteinte par les tumeurs injectées avec 1,3 mg d'oxyde de fer (53 °C) (Figure 76).

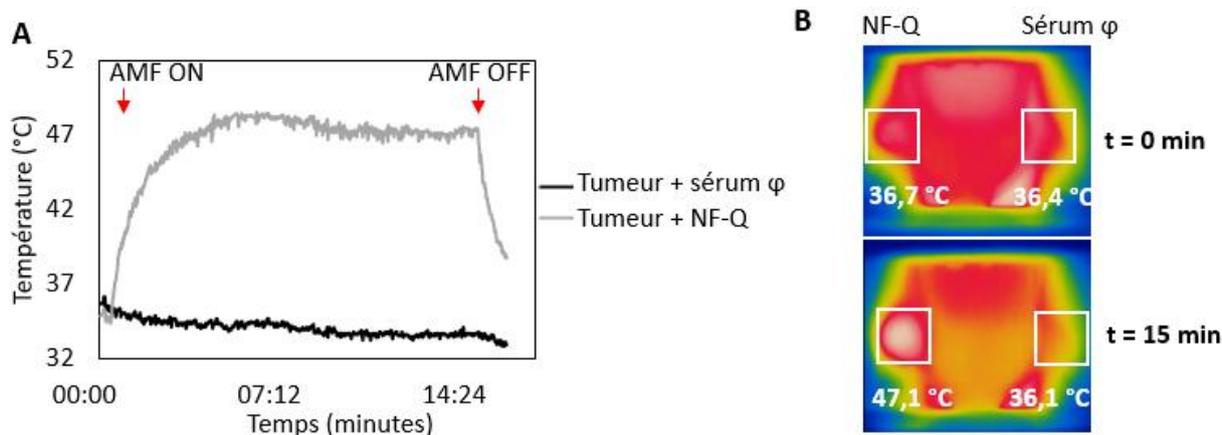


Figure 76 : Suivi de la température tumorale lors de l'application du champ magnétique. **A** – Suivi de la température tumorale lors de l'application du champ magnétique dans une tumeur injectée avec les NF-Q (tumeur + NF-Q ; 0,6 mg d'oxyde de fer) et dans la tumeur contrôle (tumeur + sérum ϕ). **B** – Images de caméra infrarouge au début ($t = 0$ min) et la fin ($t = 15$ min) de l'application du champ magnétique. Sérum ϕ = sérum physiologique ; AMF = champ magnétique

Comme montré dans les précédentes études, l'application du champ magnétique n'a aucun impact sur la croissance des tumeurs injectées avec du sérum physiologique (données non montrées). La figure 77 A montre un ralentissement de la croissance des tumeurs injectées avec les NF-Q et soumises au champ magnétique en comparaison avec les tumeurs injectées avec les NF-Q et non soumises au champ magnétique (sans différence statistique significative due à la forte hétérogénéité des résultats). Les images de BLI montre une augmentation progressive du signal BLI pour les tumeurs injectées avec les NF-Q et non soumises au champ magnétique (Figure 77-B). Quatre heures après l'application du champ magnétique, le signal BLI diminue, sans devenir nul, dans les tumeurs injectées avec des NF-Q et ré-augmente 24 heures après (Figure 77-C). La faible mort cellulaire induite par hyperthermie magnétique n'est pas suffisante pour conduire à une thermoablation tumorale mais satisfaisante pour conduire à un ralentissement de la croissance tumorale. Cette étude démontre donc l'importance d'une forte concentration en NF-Q dans la tumeur pour induire des effets délétères importants par hyperthermie magnétique.

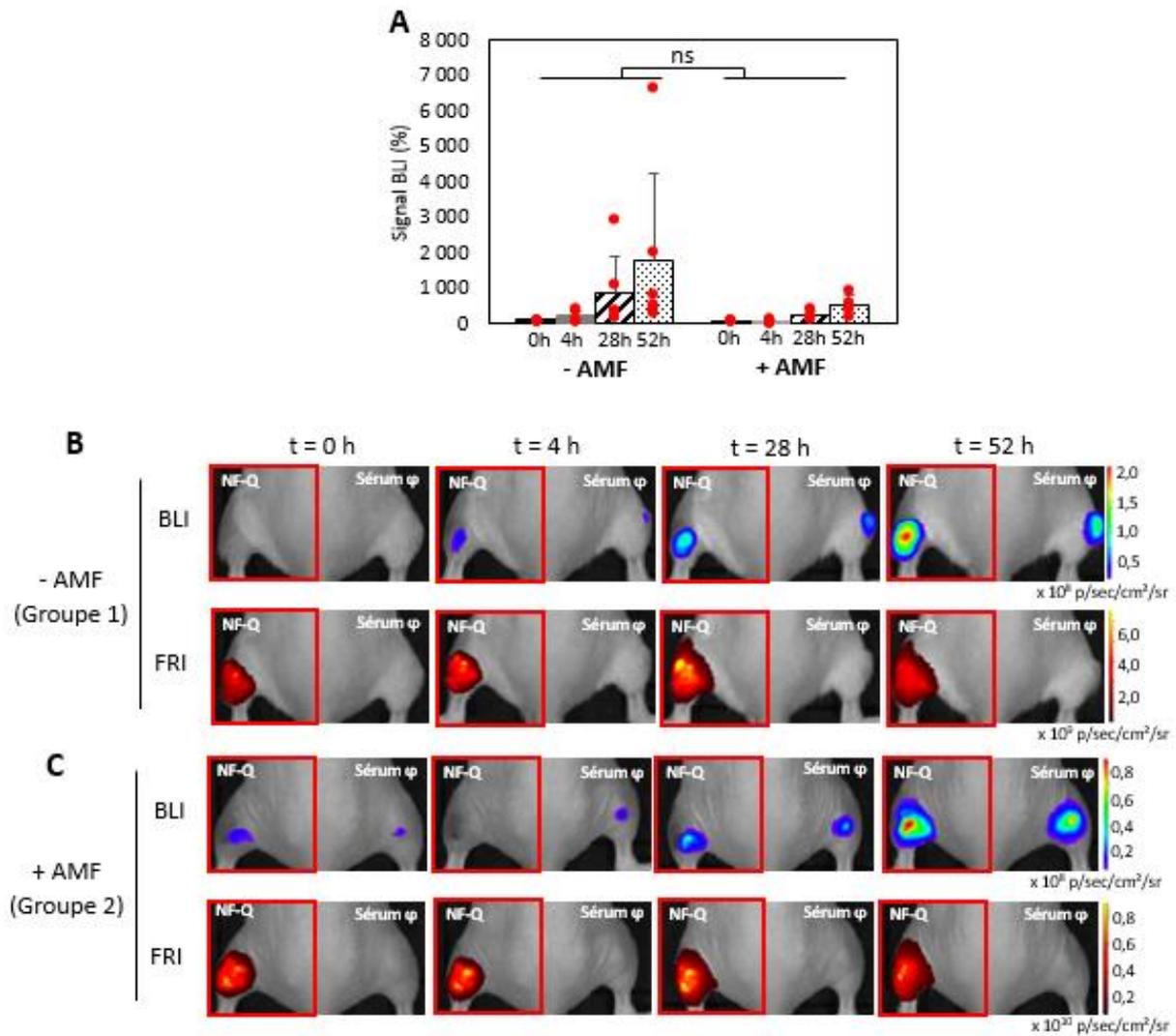


Figure 77 : Hyperthermie magnétique avec 0,6 mg d'oxyde de fer dans la tumeur. A – Signal BLI des tumeurs contenant des NF-Q et non soumises (- AMF) (N = 6) ou soumises (+ AMF) (N = 5) au champ magnétique. **B –** Images BLI et FRI d'une souris injectée avec les NF-Q dans la tumeur gauche (cadres rouges) et avec du sérum physiologique dans la tumeur droite et non soumise (- AMF) au champ magnétique. **C -** Images BLI et FRI d'une souris injectée avec les NF-Q dans la tumeur gauche (cadres rouges) et avec du sérum physiologique dans la tumeur droite et soumise (+ AMF) au champ magnétique. Dans les graphes, les points rouges représentent le signal BLI de chaque souris et les histogrammes représentent la moyenne de ces signaux \pm SD pour chaque condition. Les analyses statistiques ont été effectuées avec un test ANOVA à 2 facteurs.

3.9. Hyperthermie magnétique locale induit une thermo-modulation du microenvironnement tumoral

Après avoir montré l'effet de l'hyperthermie magnétique par injection intra-tumorale des NF-Q, nous avons également étudié l'effet sur le μ E. Pour cela, des tumeurs RM1 sous-

cutanées ont été générées sur des souris transgéniques thermosensibles exprimant le gène de la LucF sous le contrôle du promoteur thermosensible Hsp70. Afin de suivre la croissance tumorale, les cellules RM1 ont été génétiquement modifiées pour l'expression constitutive de la Nluc. Les signaux BLI de la LucF et de la Nluc ont été mesurés séquentiellement après injection de leur substrat spécifique respectif : la D-luciférine et la furimazine (Figure 78-A). Afin d'éviter des brûlures cutanées observées lors de l'application du champ magnétique sur les tumeurs injectées avec 1,3 mg d'oxyde de fer qui pourraient compromettre l'interprétation des signaux BLI émis par la souris, les NF-Q ont été injectées par voie intra-tumorale à une concentration de 0,6 mg d'oxyde de fer dans la tumeur de la patte droite. La tumeur de la patte gauche a été injectée avec du sérum physiologique (40 µL). La moitié des souris a été soumise au champ magnétique ($f = 473,5$ kHz, $H = 12$ kA/m, $t = 15$ min) 4 heures après les injections (Figure 78-B).

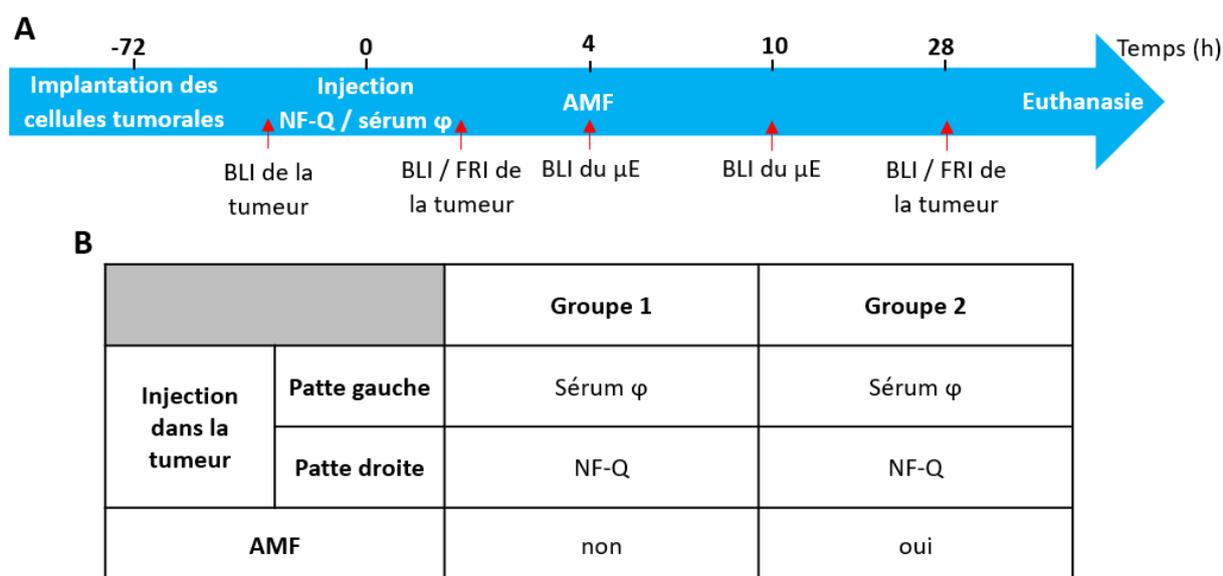


Figure 78 : Conditions expérimentales. **A-** Chronologie expérimentale : les souris thermosensibles (expression thermo-induite de la LucF) ont été implantées avec les cellules RM1 (expression constitutive de la Nluc) ($2 \cdot 10^6$ cellules/ 100 µL de PBS). Les NF-Q ont été injectées par voie intra-tumorale (0,6 mg d'oxyde de fer/ tumeur) 72 heures plus tard dans la tumeur de la patte droite et un volume de sérum physiologique identique a été injecté dans la tumeur de la patte gauche. La croissance tumorale et la thermo-modulation du µE ont été suivies par BLI. La localisation des NF-Q a été suivie par FRI. **B** – Différents groupes de souris formés lors de cette étude.

Avant application du champ magnétique, le signal BLI de la Nluc (tumeur) et la FRI des NF-Q sont détectés dans la tumeur alors qu'aucun signal BLI en provenance de la LucF (μE) n'est observé (Figure 79-A à C). La thermo-induction de la LucF est clairement détectable 6 heures après chauffage uniquement dans les tumeurs injectées avec les NF-Q et soumises au champ magnétique (Figure 79-B et D). Ce signal BLI de la LucF met en évidence l'activation du promoteur thermosensible Hsp70 dans les cellules de la souris et donc une hyperthermie modérée dans le μE . Aucun signal BLI de la LucF n'est détectable autour des tumeurs injectées avec du sérum physiologique et soumises au champ magnétique, de même que les tumeurs injectées avec les NF-Q mais non soumises au champ magnétique (Figure 79-A, C et D). Ces résultats montrent que ni les NF-Q seules, ni le champ magnétique seul n'active le promoteur Hsp70. Vingt-quatre heures après l'application du champ magnétique, le signal Nluc des tumeurs injectées avec les NF-Q est équivalent au signal BLI avant application du champ magnétique. Pour 4 souris, une thermo-ablation totale ou partielle de la tumeur est observée sur les images BLI et pour une souris, un ralentissement de la croissance tumorale est observé. Au contraire, le signal BLI des tumeurs injectées avec les NF-Q et non soumises au champ magnétique est augmenté montrant une prolifération cellulaire (Figure 79-B). L'ensemble de ces résultats montrent que l'hyperthermie magnétique peut induire simultanément *in vivo* une thermoablation centrale de la tumeur et une hyperthermie modérée périphérique du μE .

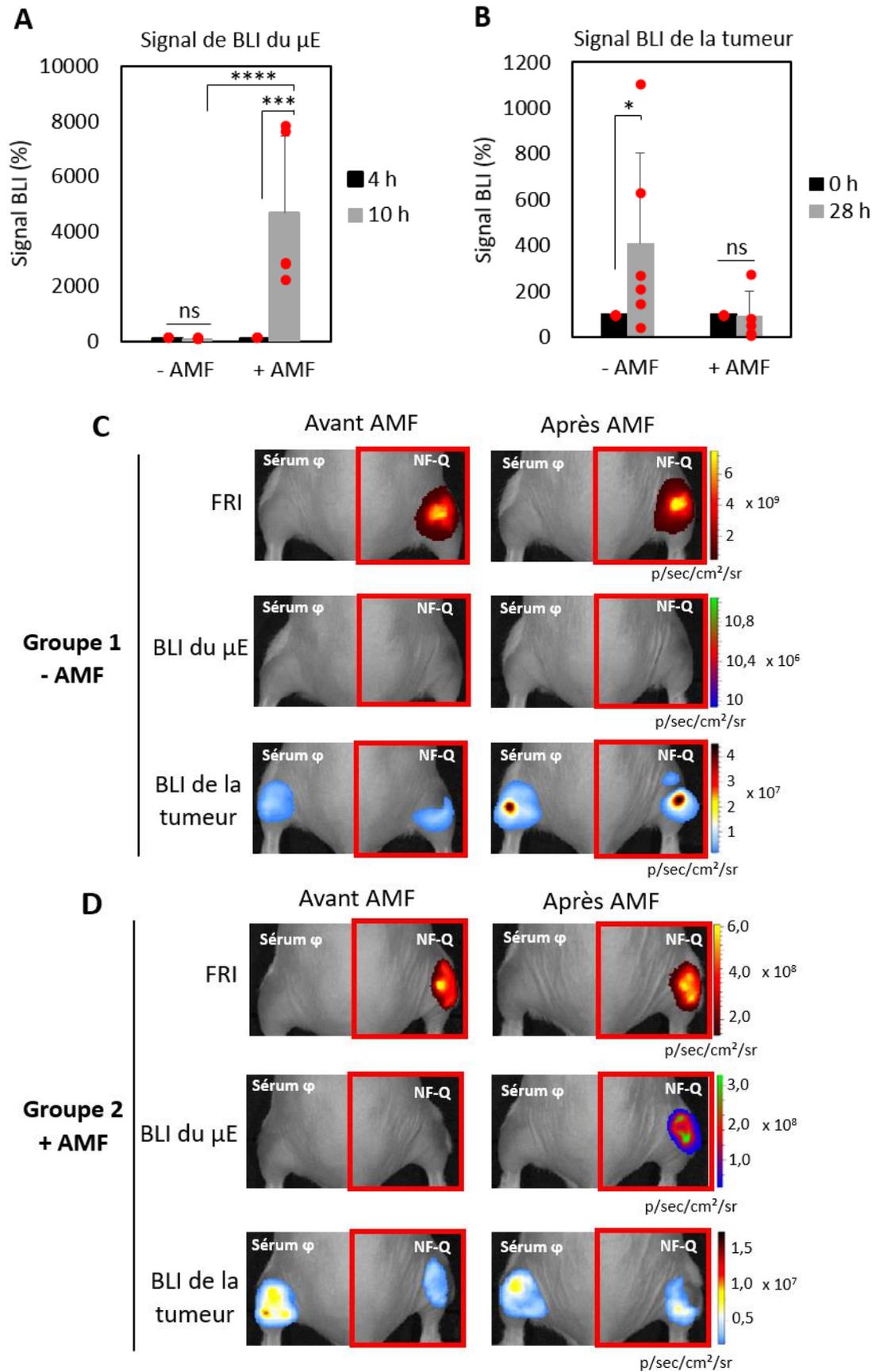


Figure 79 : Thermo-modulation du μE par hyperthermie magnétique *in vivo*. A – Signal BLI du μE mesuré avant et 6 heures après l’application du champ magnétique (soit,

respectivement, 4 et 10 heures après l'injection des NF-Q) pour les tumeurs contenant des NF-Q et soumises au champ magnétique (+ AMF) (N = 5) ou non (- AMF) (N = 6). **B** – Signal BLI de la tumeur mesuré avant et 24 heures après l'application du champ magnétique (soit, respectivement, au moment de l'injection des NF-Q et 28 heures après) pour les tumeurs contenant des NF-Q et soumises au champ magnétique (+ AMF) (N = 5) ou non (- AMF) (N = 6). **C et D** – Images de BLI de la tumeur et du μ E et images de FRI de souris non soumises (- AMF) (**C**) ou soumises (+ AMF) (**D**) au champ magnétique. Dans les graphes, les points rouges représentent le signal BLI de chaque souris et les histogrammes représentent la moyenne de ces signaux \pm SD pour chaque condition. Les analyses statistiques ont été effectuées avec un test ANOVA à 2 facteurs.

L'effet thérapeutique induit par l'hyperthermie magnétique dépend de la température atteinte lors de l'application du champ magnétique. Plus la température est élevée et plus la thermoablation est efficace et plus le pourcentage de rechute (persistance d'un signal BLI) est faible (Tableau 15). L'élévation de la température dépend du pouvoir chauffant des NPMs (SAR). Il dépend aussi de la concentration des NPMs dans la tumeur. Ainsi, la température des tumeurs injectées à volume égal avec 1,3 mg d'oxyde de fer (55 °C) est supérieure à celle des tumeurs injectées avec 0,6 mg d'oxyde de fer (45 °C), pour un même temps d'application du champ magnétique (15 minutes). Ces résultats expliquent la différence d'efficacité de la thérapie et le pourcentage de rechute à la fin de l'étude. On constate aussi que l'effet thérapeutique dépend de la répartition des NPMs dans la tumeur (Figure 73), avec une perte de signal BLI dans la zone d'accumulation des NPMs (visualisée en FRI) et une persistance du signal dans les zones contenant moins de NPMs. La répartition des NPMs dans la tumeur influence la concentration et donc l'augmentation de température. Enfin, il a été montré que la distribution spatiale des NPMs influence la température atteinte lors de l'hyperthermie magnétique (Sandre *et al.*, 2017).

	Cellules tumorales	Quantité d'oxyde de fer (mg/tumeur)	V _{oxyde de fer} (μL/tumeur)	Nombre d'AMF	T° max atteinte (°C)		Rechutes (%)	
					Tumeurs – NF-Q	Tumeurs + NF-Q		
Figure 73	U87-CMV-LucF	1,3	10	4	AMF 1 AMF 2 AMF 3 AMF 4	<u>Tumeurs – NF-Q</u> 35,5 ± 0,21 36,2 ± 0,09 36,5 ± 0,14 36,4 ± 0,07	<u>Tumeurs + NF-Q</u> 49,9 ± 0,16 48,2 ± 0,18 49,6 ± 0,09 48,5 ± 0,12	66,7
	RM1-CMV-LucF	1,3	40	4	AMF 1 AMF 2 AMF 3 AMF 4	<u>Tumeurs – NF-Q</u> 39,1 ± 0,43 37,9 ± 0,52 39,8 ± 0,17 38,5 ± 0,37	<u>Tumeurs + NF-Q</u> 54,3 ± 0,52 53,7 ± 0,56 55,9 ± 0,20 55,3 ± 0,38	50
Figure 77	RM1-CMV-LucF	0,6	40	1		<u>Tumeurs – NF-Q</u> 34,1 ± 0,10	<u>Tumeurs + NF-Q</u> 45,1 ± 0,10	100
Figure 79	RM1-CMV-Nluc	0,6	40	1		<u>Tumeurs – NF-Q</u> 34,3 ± 0,10	<u>Tumeurs + NF-Q</u> 45,6 ± 0,11	/

Tableau 15 : Tableau récapitulatif des données obtenues lors des études *in vivo* menées sur les NF-Q. Pour chaque étude est mentionnée la lignée cellulaire utilisée, la quantité d'oxyde de fer injectée dans la tumeur et dans quel volume, le nombre d'application du champ magnétique la température maximale atteinte et le suivi de la croissance tumorale. V : volume ; T° : température

DISCUSSION GENERALE

L'objectif de cette étude était de déterminer, à l'aide de 3 types de NPMs, quels sont les paramètres essentiels à l'utilisation thérapeutique de l'hyperthermie magnétique notamment pour les applications de thermoablation tumorale et d'hyperthermie modérée aussi bien pour des NPMs intracellulaires que extracellulaires.

Les NPMs utilisées sont des oxydes de fer mais elles diffèrent sur leur pouvoir chauffant (SAR) et par les molécules liées à leur surface. Pour une fréquence de $f = 473,5$ kHz et une amplitude de $H = 12$ kA/m, les IONPs-Tat et IONPs-PEG ont une SAR = 167 W/g, les SPC ont une SAR = 50 W/g et les NF-Q ont une SAR = 236 W/g. A la surface des NPMs, trois molécules ont été sélectionnées pour y être fixées : le peptide Tat, la protamine et des groupements d'ammoniums quaternaires. Le peptide Tat et la protamine appartiennent à la famille des CPPs, de petits peptides de 30 acides aminés capables de traverser la membrane plasmique sans reconnaître spécifiquement un récepteur de surface et sans induire de cytotoxicité. Pour cela, ils sont chargés positivement et possèdent une séquence d'arginine essentielle à la liaison du peptide à la membrane plasmique (Bechara Chérine & Sagan Sandrine, 2013). Le peptide Tat est retrouvé dans le VIH-1 (Richard *et al.*, 2003) et la protamine est présente dans le sperme de saumon (Arbab *et al.*, 2004; Xia *et al.*, 2011). Le greffage des groupements d'ammoniums quaternaires a été utilisé pour charger positivement les NPMs à pH physiologique (cette modification de surface fait l'objet d'un dépôt de brevet). La membrane cellulaire étant chargée négativement, les molécules chargées positivement s'internalisent facilement. Ces études ont montré que la modification de surface des NPMs permet d'améliorer leur internalisation dans les cellules. Les deux CPPs induisent une internalisation des NPMs dans les cellules cancéreuses puis une accumulation dans les lysosomes, alors que les groupements d'ammoniums quaternaires conduisent à une internalisation massive dans des vésicules cellulaires de grands diamètres qui ne sont pas des lysosomes.

L'hyperthermie magnétique induite par les NPMs intracellulaires a fait l'objet de plusieurs travaux de recherche qui ont permis de mettre en évidence la voie de signalisation activée conduisant à la mort des cellules cancéreuses. L'hyperthermie modérée induit la production de ROS par la réaction de Fenton. Les ROS peroxydent les lipides de la membrane lysosomale conduisant à la libération des enzymes lysosomales dans le cytosol telles que la

Cathepsine B. Ces enzymes entraînent ensuite la mort des cellules cancéreuses (Domenech *et al.*, 2013; Clerc *et al.*, 2018) (Publication des travaux de Master). Dans ce projet, lorsque l'hyperthermie magnétique est induite avec les NPMs localisées dans les compartiments intracellulaires, seules les IONPs sont capables de conduire à la mort des cellules cancéreuses *in vitro*. Les NF-Q, qui possèdent pourtant un pouvoir chauffant supérieur, n'induisent pas la mort des cellules cancéreuses. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer ces différentes observations :

- les SPC-protamine et les NF-Q ne peuvent pas catalyser la réaction de Fenton. Cette réaction nécessite un apport d'ions Fe^{2+} . Lorsque le champ magnétique est appliqué, la chaleur conduit à une dégradation partielle des NPMs et à une libération des ions Fe^{2+} . Cette situation est celle qui intervient avec les IONPs-Tat et IONPs-PEG. Pour les SPC-protamine et les NF-Q, la couche de silice bi-fluorescente à la surface piège les ions Fe^{2+} qui ne sont pas disponibles pour la réaction de Fenton. La mort cellulaire n'a donc pas lieu.
- Une seconde hypothèse repose sur la localisation subcellulaire des NPMs. La réaction de Fenton intervient préférentiellement à pH acide, situation que l'on retrouve essentiellement dans les lysosomes. Puisque les NF-Q sont majoritairement localisées dans des vésicules différentes des lysosomes, la réaction de Fenton ne peut pas intervenir. Les IONPs-Tat et IONPs-PEG ont une localisation intra-lysosomale, possèdent une SAR élevée et peuvent induire la réaction de Fenton. Les SPC-protamine sont localisées dans les lysosomes mais ne peuvent pas induire la réaction de Fenton parce que leur SAR n'est pas suffisante ou à cause du rôle protecteur de la couche de silice.

Ainsi, le pouvoir chauffant des NPMs n'est pas le seul paramètre à prendre en compte pour induire la mort des cellules par hyperthermie magnétique intracellulaire. La localisation intra-lysosomale, la concentration des NPMs dans ce compartiment de même que l'accessibilité des ions Fe^{2+} pour induire la réaction de Fenton sont des paramètres qui semblent être essentiels. Ces hypothèses nécessitent néanmoins d'être validées expérimentalement.

L'hyperthermie magnétique induite avec des NPMs localisées dans les espaces extracellulaires ne répond pas aux mêmes exigences que l'hyperthermie magnétique intracellulaire. L'injection et l'application du champ magnétique sur les IONPs-Tat injectées dans la tumeur conduit à un ralentissement de la croissance tumorale. Leur faible pouvoir chauffant ne permettrait pas d'induire une thermoablation tumorale. Au contraire, l'application

du champ magnétique sur les NF-Q injectées dans la tumeur conduit à la thermoablation totale ou partielle de la tumeur car leur pouvoir chauffant est plus élevé et donc l'élévation de la température est plus importante. Pour une même durée de traitement, la dose thermique délivrée par les NF-Q est supérieure à celle des IONPs. La société MagForce utilise l'hyperthermie magnétique combinée à la radiothérapie pour le traitement du glioblastome. Les NPMs qu'ils utilisent (NanoTherm™) n'ont pas un pouvoir chauffant suffisant pour induire directement la mort des cellules cancéreuses par la chaleur. De plus, les concentrations en oxyde de fer injectées dans les tumeurs avec NanoTherm™ (Maier-Hauff *et al.*, 2007, 2011) sont beaucoup plus importantes (160 g/L d'oxyde de fer dans la tumeur) que celles mises en œuvre avec les NF-Q (12 g/L d'oxyde de fer dans les tumeurs RM1 et 29,8 g/L d'oxyde de fer dans les tumeurs U87). Les NF-Q pourraient avantageusement remplacer les NPMs actuellement utilisées en clinique.

Les NPMs injectées dans les tumeurs résident majoritairement dans les espaces extracellulaires. Néanmoins, certaines NPMs peuvent être internalisées dans les cellules cancéreuses et/ou dans les cellules du μ E. Dans notre travail, le temps entre l'injection des NPMs et l'application du champ magnétique est court. L'internalisation dans les cellules est donc faible et la contribution des NPMs intracellulaires est probablement négligeable. Par contre, les modifications de surface des NPMs pourraient intervenir dans la diffusion des NPMs dans la tumeur ce qui influence leur distribution et leur concentration dans les tissus. Le rôle de la distribution et de la concentration des NPMs dans les tissus sur l'efficacité d'une hyperthermie magnétique a pu être démontré *in vivo*, en injectant des NPMs dans du Matrigel pour générer des pseudotumeurs sous cutanées chez la souris thermosensible, et a également pu être modélisé par informatique (Sandre *et al.*, 2017).

Plusieurs axes de recherche restent nécessaires pour une meilleure compréhension des mécanismes de l'hyperthermie magnétique et sa maîtrise à des fins thérapeutiques.

Pour la thermoablation par injection locale des NPMs, le pouvoir chauffant est fondamental. Une étude actuellement menée au laboratoire vise à améliorer le pouvoir chauffant des NPMs en utilisant des nano-émulsions à cœur lipidique contenant des nanofleurs. Grâce aux propriétés de l'huile, l'élévation de la température est plus rapide, le refroidissement après traitement est plus lent et le transfert thermique entre les nano-émulsions et les tissus biologiques est augmenté. Ainsi, les nano-émulsions chauffent mieux et devraient induire des

dommages cytotoxiques plus importants (les nano-émulsions magnétiques font actuellement l'objet d'un dépôt de brevet).

La thermoablation d'une tumeur doit induire la destruction de l'ensemble des cellules tumorales par la chaleur. Toutefois, la destruction par la chaleur concerne également les cellules du μE , intrinsèquement associées aux cellules tumorales, et elle peut aussi induire des dommages cellulaires au niveau des tissus sains environnants. Il est difficile de maîtriser la dispersion des NPMs, l'augmentation de la température ainsi que la diffusion de la chaleur dans la tumeur. A l'inverse, une destruction insuffisante conduit à la reprise de la pousse tumorale localement. Afin de limiter les rechutes dues aux cellules cancéreuses à la périphérie de la tumeur qui n'auraient pas été touchées par le traitement d'hyperthermie, une combinaison de thermoablation centrale et d'hyperthermie modérée périphérique peut être appliquée. Nos résultats, basés sur l'activation du promoteur Hsp70 dans le μE , montrent que cette double approche de thérapie anticancéreuse est possible. La zone d'hyperthermie modérée périphérique pourrait permettre la libération contrôlée d'agents cytotoxiques. Des nanoparticules pourraient être composées d'un cœur magnétique avec un fort pouvoir chauffant (nanofleurs recouvertes d'une couche de silice mésoporeuse contenant l'agent cytotoxique libérable par hyperthermie modérée). Cette stratégie permettrait d'associer la thermoablation avec une libération locale d'agent de chimiothérapie, tout en limitant les effets secondaires induits par les administrations systémiques. La libération locale de médicament par hyperthermie magnétique modérée a récemment été décrite dans la littérature (Guisasola *et al.*, 2018). Nous avons procédé à des essais préliminaires mettant en œuvre la libération d'un fluorophore mais un bruit de fond trop élevé ne nous a pas permis de mettre en évidence la libération thermo-induite.

La voie d'administration des NPMs pour une hyperthermie magnétique ciblée reste une question ouverte. L'injection par voie intraveineuse est la moins invasive. L'adressage spécifique des NPMs grâce à des agents de ciblage portés par les particules permettrait de cibler la tumeur primaire et d'éventuelles métastases. Si cette stratégie a fait l'objet d'études *in vitro* (Domenech *et al.*, 2013; Hemery *et al.*, 2017a; Clerc *et al.*, 2018), il faut néanmoins signaler, qu'à ce jour, elle n'a pas été démontrée *in vivo*. Nos résultats ont permis de proposer plusieurs hypothèses (SAR, localisation subcellulaire, réaction de Fenton) qu'il conviendrait de valider *in vivo*.

Dans la circulation sanguine, les NPMs, comme la plupart des nanoparticules de taille comparable, sont soumises au phénomène d'opsonisation puis à la reconnaissance par le système immunitaire. Ce phénomène a été mis en évidence lors de l'injection des IONPs dans la circulation sanguine qui se sont préférentiellement accumulées dans le foie au lieu de la tumeur. Dans ces conditions, l'application du champ magnétique sur l'ensemble de la souris conduirait à la destruction des cellules hépatiques. Il est désormais possible d'appliquer localement un champ magnétique grâce à la technologie MPI (magnetic particle imaging) (Gleich & Weizenecker, 2005). L'application de deux champs magnétiques de directions différentes permet à cette technique d'induire l'élévation de la température par les NPMs présentes dans la tumeur uniquement. La MPI a été proposée dans un premier temps comme une nouvelle modalité d'imagerie permettant la détection et la quantification des NPMs *in vivo*. Elle a ensuite été transposée en modalité de thérapie pour induire une hyperthermie magnétique locale (Tay *et al.*, 2018). La MPI offre de nouvelles perspectives pour les thérapies basées sur l'utilisation de NPMs ciblées pour l'hyperthermie magnétique anti-tumorale.

CHAPITRE 2

INDUCTION D'UNE HYPERTHERMIE

***IN VIVO* PAR MRGHIFU**

OBJECTIFS

Parmi les différents procédés induisant une hyperthermie, seuls les ultrasons focalisés de haute intensité (HIFU) sont capables de pénétrer dans les tissus de façon non invasive sans utiliser un applicateur. Les HIFU n'induisent pas de lésions sur le trajet du faisceau ultrasonore et peuvent être appliqués à tous les types de tumeurs (Grenier *et al.*, 2008). La taille de la zone traitée correspond à la taille du point focal des ultrasons ce qui permet un ciblage précis lors du traitement d'hyperthermie. Les HIFU peuvent être couplés à plusieurs modalités d'imagerie notamment l'IRM, on parle alors de MRgHIFU. La combinaison à un système d'imagerie optimise le placement du point focal des ultrasons dans la zone cible. Elle permet également un suivi et un contrôle de la dose thermique délivrée en temps réel au niveau du point focal tout en surveillant la diffusion de la chaleur dans les tissus sains environnants. En mesurant la température pendant l'application des ultrasons, les MRgHIFU autorisent un contrôle spatio-temporel extrêmement précis de la thérapie.

Cette étude vise à faire la preuve de concept, par imagerie *in vivo* chez la souris, que la thermoablation tumorale par MRgHIFU est possible et qu'elle peut être associée à une hyperthermie modérée péri-tumorale compatible avec des traitements adjuvants. La première partie de ce chapitre met en évidence les difficultés à induire une hyperthermie par HIFU chez la souris en absence de guidage par imagerie. La seconde partie est consacrée aux performances des MRgHIFU à induire une thermoablation et une hyperthermie modérée ciblées des tumeurs ainsi qu'à leur efficacité dans la mise en œuvre de thérapies anticancéreuses ciblant simultanément la tumeur et le μE .

RESULTATS ET DISCUSSION

1. HIFU

Dans une première série d'expérience, nous avons utilisé un dispositif HIFU ne disposant pas de système de guidage par imagerie.

1.1. Protocole d'hyperthermie par HIFU

Pour tester les potentialités et la reproductibilité du système HIFU Benchtop composé d'un transducteur d'ultrasons mono-élément interchangeable de 1,5 ou 2,5 MHz sur un protocole d'hyperthermie, les souris thermosensibles ont été utilisées. Ces souris génétiquement modifiées pour exprimer la LucF sous le contrôle du promoteur Hsp70, ont été caractérisées pour leur réponse au choc thermique qui induit, 6 heures après chauffage, une augmentation drastique du signal BLI au niveau de la zone chauffée (Deckers *et al.*, 2009, 2012). Si la dose thermique est trop élevée, l'hyperthermie conduit à la mort des cellules et aucun signal BLI n'est détectable. Cette souris est donc un témoin physiologique du chauffage modéré *in vivo*.

Plusieurs protocoles d'hyperthermie ont été établis afin de déterminer les conditions expérimentales optimales. Pour le transducteur de 1,5 MHz, les HIFU ont été appliqués à une intensité comprise entre 2,5 et 25 % de l'intensité maximale du transducteur pendant 20 secondes à 10 minutes. Pour le transducteur de 2,5 MHz, ils ont été appliqués à une intensité comprise entre 18 et 25 % de l'intensité maximale du transducteur pendant 20 à 40 secondes. Le point focal des HIFU a été positionné au niveau de la cuisse face ventrale de la souris et une application a été effectuée au niveau de chaque patte arrière pour l'ensemble des souris. L'activation du promoteur Hsp70 sur la peau de la souris a ensuite été observée par BLI, 6 heures après chauffage.

1.2. Induction d'une hyperthermie par HIFU *in vivo*

Dans 55 % des chauffages par HIFU, un signal BLI a été détecté 6 heures après chauffage. Alors que le point focal a toujours été placé au niveau de la cuisse face ventrale (Figure 80-A), le signal BLI a été détecté au niveau ventral (24,7 %), dorsal (25,3 %) ou au

niveau du genou (5,8 %) des souris. L'augmentation du signal BLI au niveau dorsal est probablement due à la sortie des ultrasons (Figure 80-B). Malgré le gel d'échographie, ils ont été réfléchis sur la peau de la souris et ont induit un point de chauffage. L'activation au niveau du genou est probablement dû à l'absorption de l'énergie ultrasonore par les os ; absorption qui est beaucoup plus importante que les autres tissus. Par ailleurs, au niveau du genou, l'os est proche de la peau. A son tour, elle peut être activée par l'échauffement de l'os et émettre un signal BLI dont les photons sont facilement détectables car ils se trouvent en surface (pas soumis à l'absorption par les tissus) (Figure 80-C). Dans 31,2 % des chauffages par HIFU, aucune augmentation du signal BLI n'a été observée mettant en évidence que la dose thermique délivrée n'est pas assez importante pour activer le promoteur Hsp70 dans les tissus. Enfin, dans 13 % des chauffages par HIFU, la souris a été euthanasiée rapidement après le traitement d'hyperthermie car le nerf sciatique a été touché entraînant une paralysie de la pàte (Figure 80). Dans l'ensemble de l'étude, l'augmentation du signal BLI au niveau du point focal présumé des HIFU représente uniquement 25 % des applications effectuées.

	Position	Nombre d'application des HIFU	Pourcentage d'application des HIFU (%)
Augmentation du signal BLI	Ventre (A)	38	24,7
	Dos (B)	39	25,3
	Genou (C)	9	5,8
Pas d'augmentation du signal BLI	/	48	31,2
Euthanasiées	/	20	13

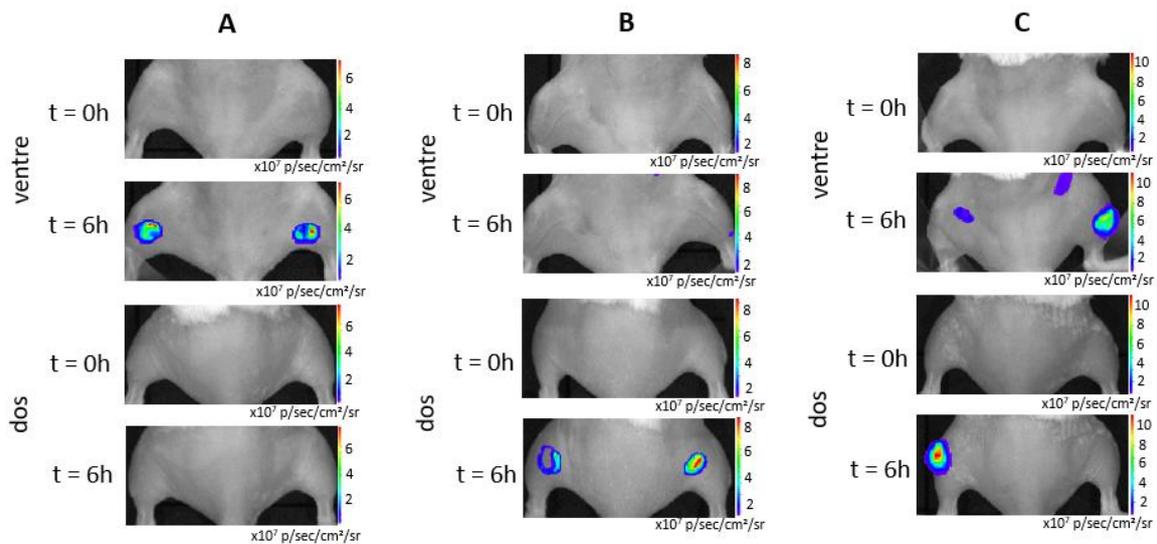


Figure 80 : Différentes localisations de l'activation du promoteur Hsp70 *in vivo* suite à un chauffage par HIFU. Tableau rapportant les différentes localisations de l'activation du promoteur Hsp70 par les HIFU et le pourcentage d'obtention. Augmentation du signal BLI = activation du promoteur Hsp70 ; Pas d'augmentation du signal BLI = pas d'activation. **A ; B et C** – Images de BLI avant et 6 heures après chauffage par HIFU avec une prise dorsale ou ventrale de la souris. L'activation du promoteur Hsp70 est située sur la partie ventrale (A), dorsale (B) ou au niveau du genou (C). (N = 77).

Ces résultats mettent en évidence la faible reproductibilité de cette technique de thérapie en absence de guidage par imagerie. Sans imagerie, il est difficile de contrôler la localisation précise du point focal des ultrasons. Il est, par ailleurs, impossible de contrôler l'intensité du chauffage, la dose thermique délivrée et la diffusion de la chaleur dans les tissus avoisinants. Le manque de reproductibilité et de fiabilité du dispositif nous a conduit à abandonner ce protocole.

2. MRgHIFU

Les résultats présentés dans ce chapitre sont regroupés dans un manuscrit intitulé :

« Imaging MRgHIFU heating for tumor thermo-ablation and tumor microenvironment mild hyperthermia »

Pauline Jeanjean, Dounia El Hamrani*, Coralie Genevois, Bruno Quesson, Franck Couillaud*

** Co-premiers auteurs*

Afin de surmonter ces difficultés, un système HIFU couplé à un aimant IRM a été utilisé pour la suite de l'étude.

2.1. Mise au point et validation du protocole

Comme précédemment, le protocole d'hyperthermie a d'abord été testé sur les souris thermosensibles. Le point focal des ultrasons a été placé au niveau du flanc gauche de la souris afin d'éviter les os (forte absorption des ultrasons). La boucle de rétrocontrôle de la température a été divisée en trois parties : une augmentation progressive de la température pour atteindre la température souhaitée, le traitement d'hyperthermie à une température constante pendant un intervalle de temps défini puis le suivi du refroidissement de la zone chauffée. Le système de rétrocontrôle a ensuite été totalement automatisé permettant une boucle de contrôle automatique entre la variation de la température mesurée par IRM et l'intensité des HIFU délivrée par le transducteur. L'effet de l'hyperthermie a été évalué par BLI avant et 6 heures après le traitement. Dix souris thermosensibles ont été nécessaires pour mettre au point et valider le protocole d'hyperthermie. Pour 5 souris, des problèmes techniques ont conduit au décès de la souris lors de la procédure ou ont empêché de réaliser le rétrocontrôle de la température. Un traitement d'hyperthermie modérée a été réalisé sur les 5 autres souris avec différents temps d'application (4 ; 5 et 8 minutes) et différentes températures (45 °C ; 46 °C et 47 °C). Parmi ces 5 souris, 2 ont eu une élévation du signal BLI à un endroit différent du point focal des ultrasons. Le lit thermostaté peut être responsable de l'activation du promoteur Hsp70 sur la partie ventrale d'une souris (Figure 81-A). Pour éviter cet effet, le lit thermostaté a été recouvert d'une

alèse pour que la peau de la souris ne soit pas en contact direct dans le lit. La diffraction des ultrasons lors du chauffage est probablement responsable de l'activation du promoteur Hsp70 sur la partie ventrale de la seconde souris (Figure 81-B). Les 3 autres souris ont eu une augmentation du signal BLI au niveau du point focal des ultrasons 6 heures après la procédure (Figure 81-C).

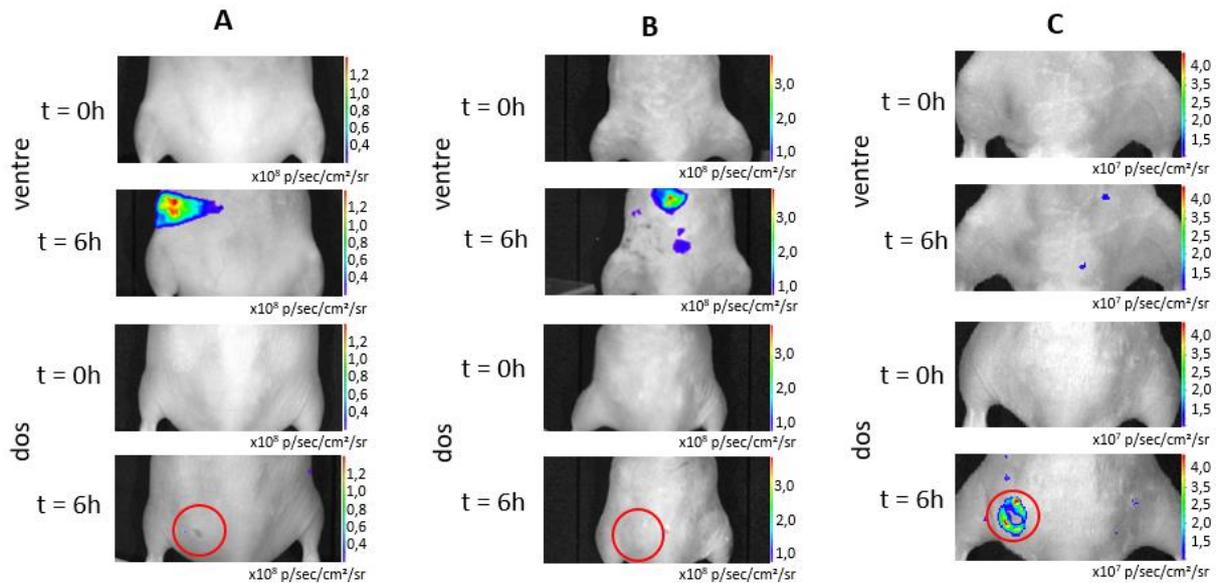


Figure 81 : Application des MRgHIFU sur la peau de souris thermosensibles. A et B - Pas d'augmentation du signal BLI au point focal des ultrasons mais un fort signal sur la partie ventrale. C- Signal BLI au niveau du point focal des ultrasons uniquement. Cercle rouge = position du point focal. (N = 10).

2.2. Hyperthermie modérée des tumeurs par MRgHIFU

Dans cette étude, l'objectif était d'induire une hyperthermie modérée dans une tumeur. L'hyperthermie modérée est caractérisée par une dose thermique suffisante pour conduire à des phénomènes thermosensibles dans la tumeur (activer le promoteur Hsp70 dans notre modèle cellulaire thermosensible) tout en préservant la viabilité cellulaire (mis en évidence par un signal BLI). Pour cela, des cellules RM1 exprimant la LucF sous le contrôle du promoteur Hsp70 (RM1-Hsp-LucF) ont été caractérisées *in vitro* puis utilisées pour générer des tumeurs destinées à être chauffées par MRgHIFU *in vivo*.

2.4.1. Caractérisation *in vitro* de la réponse de la lignée cellulaire au choc thermique

La lignée RM1-Hsp70-LucF a été caractérisée pour sa réponse aux chocs thermiques. Pour cela, les cellules en culture ont été chauffées à différentes doses thermiques (Figure 82-A) à l'aide d'un bain marie. Pour rappel, la dose thermique est calculée grâce au CEM 43°C :

$$CEM43^{\circ C} = \sum_{i=1}^n t_i \cdot R^{(43-T_i)}$$

R est une constante : $R = 1/4$ pour des températures inférieures à 43 °C et $R = 1/2$ pour des températures supérieures à 43 °C et T_i est la température moyenne pendant l'intervalle de temps. L'unité utilisée est « CEM₄₃ ».

Avant de poser la boîte sur l'eau, le milieu de culture a été remplacé par du milieu préalablement chauffé pour une meilleure maîtrise de la dose thermique. L'activité de la LucF a été déterminée 6 heures après chauffage sur le lysat cellulaire en mesurant l'émission de photons au luminomètre.

On observe une augmentation progressive de l'activité LucF avec un maximum pour une dose thermique comprise entre 20 et 40 CEM₄₃ puis une diminution du signal à partir de 50 CEM₄₃ (Figure 82-B). La dose thermique optimale *in vitro* est donc située entre 20 et 40 CEM₄₃.

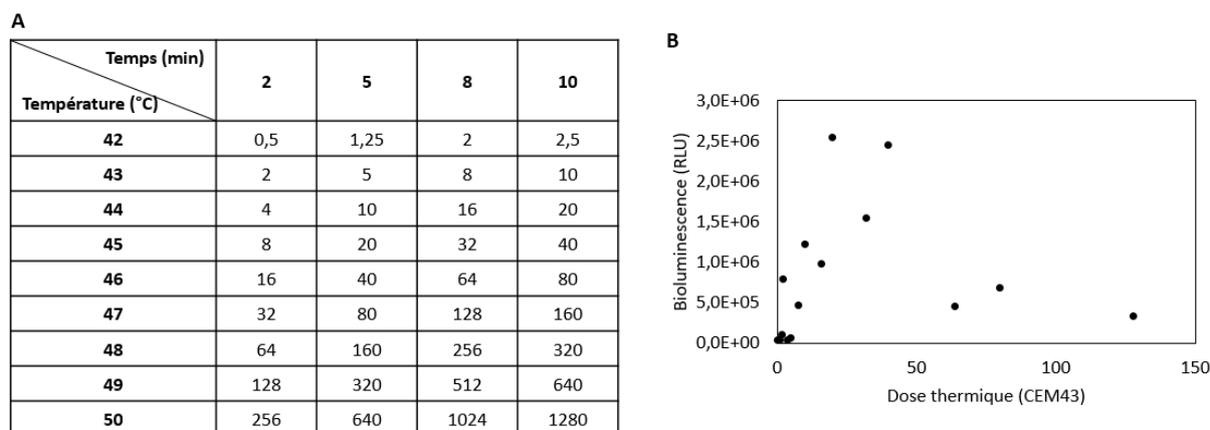


Figure 82 : Détermination de la dose thermique pour induire l'activation du promoteur Hsp70 dans les cellules RM1-Hsp70-LucF *in vitro*. A – Doses thermiques testées *in vitro* : calcul de la dose thermique en fonction de la température et du temps d'application.

Les doses thermiques sont exprimées en CEM₄₃. **B** – Signal BLI en fonction de la dose thermique. Les signaux BLI pour des doses thermiques supérieures à 150 CEM₄₃ ne sont pas montrés car ils sont proches de 0. (N = 3)

A partir de ces résultats, des doses thermiques comprises entre 5 CEM₄₃ (43 °C pendant 5 minutes) et 80 CEM₄₃ (47 °C pendant 5 minutes) ont été sélectionnées pour les études *in vivo*. Le temps 5 minutes a été sélectionné car c'est un temps court pour le traitement d'hyperthermie sans nécessiter d'atteindre des températures très élevées par rapport à la température corporelle de la souris (37 °C). Ces doses thermiques sont en accord avec les études d'hyperthermie précédemment effectuées au laboratoire sur différentes lignées cellulaires (Deckers *et al.*, 2009; Fortin *et al.*, 2015).

2.4.2. Induction d'une hyperthermie modérée *in vivo*

Les cellules RM1-Hsp70-LucF ont été implantées ($2 \cdot 10^6$ cellules/mL) en sous-cutané à des souris immunocompétentes. Pour une meilleure visualisation des tumeurs par IRM, le traitement d'hyperthermie a été appliqué 7 jours après implantation. Lors de l'application des HIFU, le système de rétrocontrôle automatisé s'est efforcé d'atteindre la température de consigne mais elle n'a pas toujours été atteinte. La figure 83 résume les différences observées entre la consigne et la mesure effective (moyenne des températures, température maximale et dose thermique). Uniquement deux souris ont été soumises à la dose thermique 10 CEM₄₃, la moyenne des températures et des doses thermiques \pm SD n'a pas pu être calculée et représentée dans un graphique, comme pour les trois autres conditions.

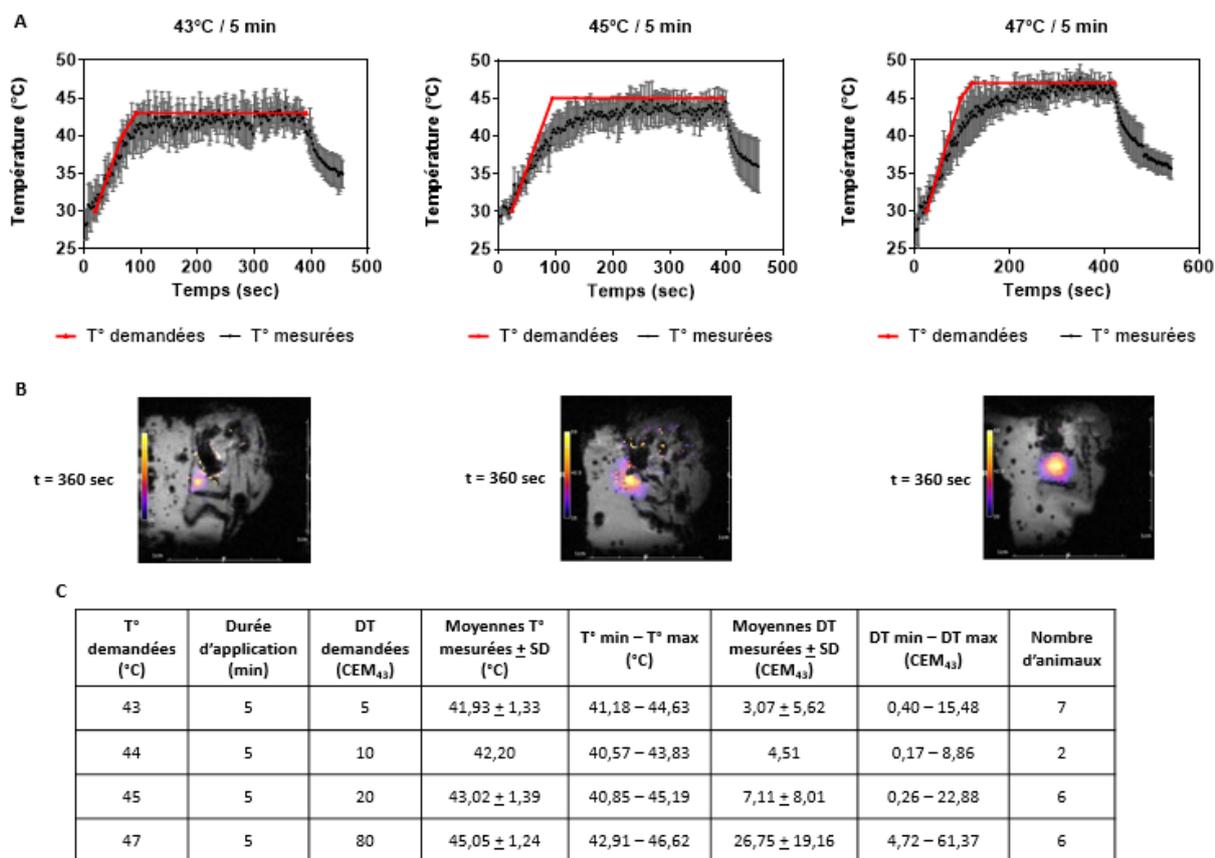


Figure 83 : Suivi de la température tumorale par IRM lors d'une hyperthermie modérée induite par HIFU. A – Moyennes (\pm SD) des températures mesurées (courbes grises) et des températures demandées (courbes rouges) pour chaque dose thermique : 43 °C, 45 °C et 47 °C pendant 5 minutes. B - Images de thermométrie sur une coupe coronale 360 secondes après le début du rétrocontrôle. C – Tableau récapitulatif pour chaque condition du traitement d'hyperthermie. DT = dose thermique

L'efficacité du chauffage a été évaluée en comparant le signal BLI avant et 6 heures après chauffage. Pour chaque souris, l'augmentation du signal BLI après le traitement d'hyperthermie est associée à la dose thermique appliquée sur la tumeur. Cependant, aucune corrélation franche entre l'intensité du signal BLI 6 heures après chauffage et la dose thermique appliquée n'est notée (Figure 84-A).

Pour des doses thermiques comprises entre 0,17 et 0,45 CEM₄₃ (Figure 84-A, points noirs), une activation du signal BLI est observée au niveau du point d'entrée des ultrasons pour 3 tumeurs (Figure 84-B et C). Pour une tumeur, un signal BLI dans l'ensemble de la tumeur est observé mais de faible intensité et pour une autre tumeur, aucun signal BLI n'est observé. Ces résultats démontrent que la dose thermique délivrée dans la tumeur est trop faible pour activer le promoteur Hsp70 dans l'ensemble de la tumeur.

Pour des doses thermiques comprises entre 3,78 et 4,71 CEM₄₃ (Figure 84-A, points violets), le signal BLI de 4 tumeurs est uniforme dans toute la tumeur. L'intensité de ces signaux BLI est élevée mais hétérogène entre les tumeurs. Pour ces doses thermiques, la répartition des photons sur l'image BLI est « en cloche » et représente la projection 2D d'un signal sphérique affecté par la profondeur (absorption des photons par les tissus) (Figure 84-B et C). Pour une tumeur ayant reçu une dose thermique équivalente, le signal BLI est très faible après application des MRgHIFU.

Pour les doses thermiques comprises entre 8,86 et 27,35 CEM₄₃ (Figure 84-A, points rouges), le signal BLI est très hétérogène dans la tumeur. L'examen de l'image BLI révèle une activation « en anneau » (Eker *et al.*, 2011) correspondant à une zone centrale non lumineuse et une zone périphérique avec un fort signal BLI (Figure 84-B et C). La zone centrale représente une zone de nécrose tumorale au niveau du point focal des ultrasons. L'hyperthermie induit la mort des cellules responsable de l'absence de signal BLI. A la périphérie du point de chauffage, un gradient de température permet l'activation du promoteur Hsp70 et l'apparition d'un signal BLI. La mesure du signal BLI global (imagerie plane et affectée par la profondeur) avec des profils d'expressions « en anneau » ne peut pas être comparée à un signal BLI « en cloche » observé pour les doses thermiques plus faibles.

Pour la dose thermique de 61,37 CEM₄₃ (Figure 84-A, point vert), le signal BLI a quasiment disparu dans la totalité de la tumeur mettant en évidence la mort des cellules cancéreuses (Figure 84-B et C).

Pour induire une hyperthermie modérée par MRgHIFU, la dose thermique appliquée doit être comprise entre 3,78 et 4,71 CEM₄₃.

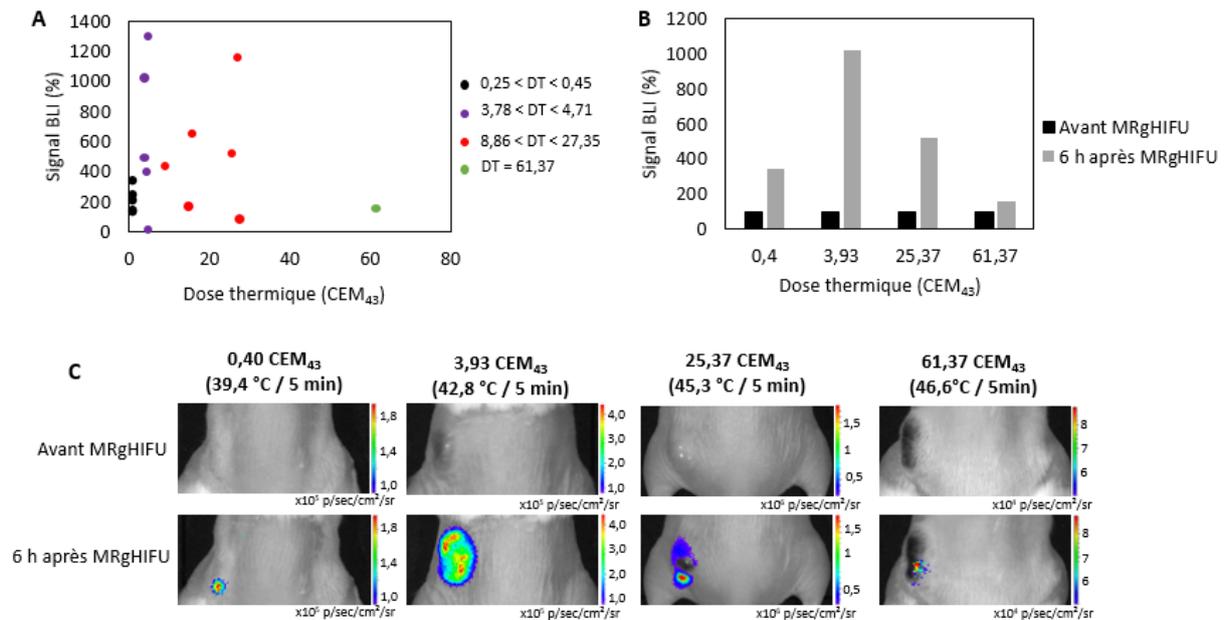


Figure 84 : Induction d'une hyperthermie modérée par MRgHIFU *in vivo*. **A** – Nuage de points représentant l'augmentation du signal BLI (en %) 6 heures après chauffage en fonction de la dose thermique appliquée. **B** – Quatre exemples de signaux BLI avant et 6 heures après application des MRgHIFU en fonction de la dose thermique. **C** - Images de BLI avant et 6 heures correspondant au quatre exemples présentés dans la partie B.

Pour valider nos conclusions expérimentales et nos hypothèses quant à la réponse des tumeurs à l'hyperthermie modérée, l'activation du promoteur Hsp70 par MRgHIFU a été comparée à son activation par chauffage au bain marie, beaucoup plus simple à mettre en place. Lors du chauffage par MRgHIFU, la tumeur a été placée sur le flanc gauche car la patte de la souris est trop petite, il est donc plus difficile de l'observer en IRM. Lors du chauffage au bain marie, la tumeur a été placée sur la patte arrière droite pour éviter de chauffer les viscères. Six heures après chauffage, une forte augmentation du signal BLI est observée pour les doses thermiques de 5 et 10 CEM₄₃ alors que le signal BLI pour les doses thermiques de 20 et 80 CEM₄₃ reste très faible (Figure 85).

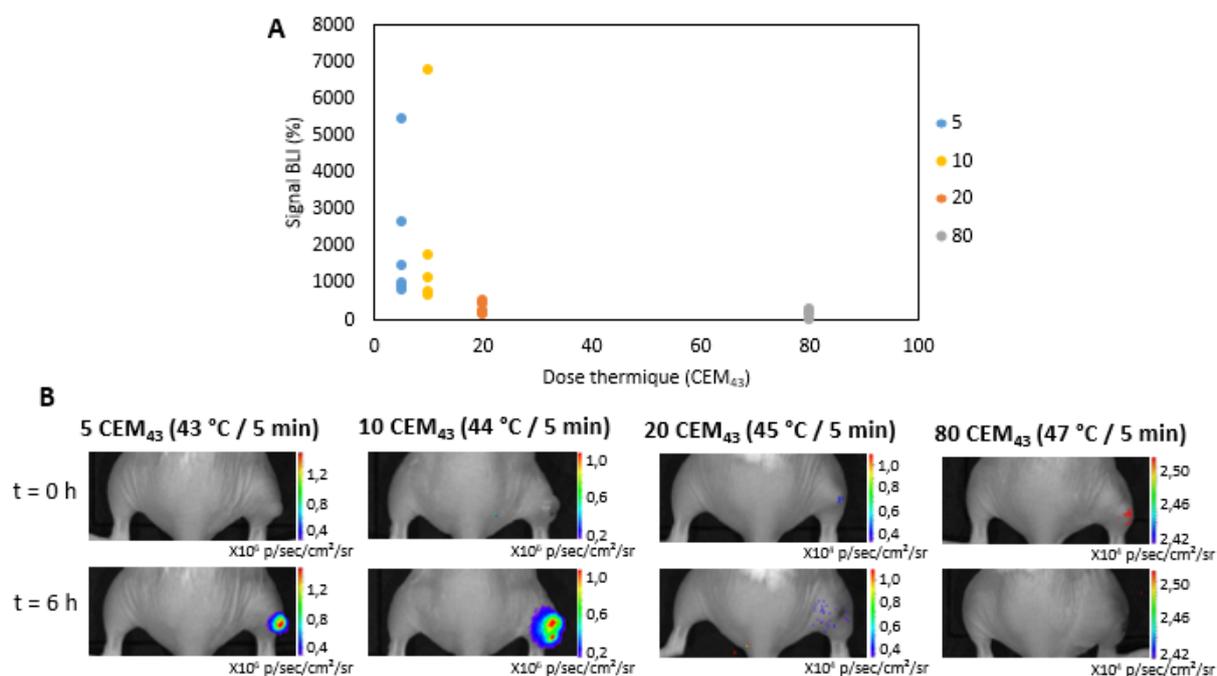


Figure 85 : Induction d'une hyperthermie modérée au bain-marie *in vivo*. **A** – Signal BLI en fonction de la dose thermique appliquée sur la tumeur par chauffage au bain-marie (N = 5). **B** – Images BLI avant et 6 heures après chauffage pour chacune des conditions de chauffage.

Le chauffage au bain-marie et par MRgHIFU est différent. En utilisant les MRgHIFU, la source de chaleur se situe au niveau du point focal des ultrasons localisé au centre de la tumeur. La source de chaleur peut être considérée comme endogène et elle diffuse du centre de la tumeur vers l'extérieur. Au contraire, lors du chauffage au bain-marie, la source de chaleur est externe à l'animal (exogène). La chaleur diffuse donc de l'extérieur de la tumeur vers l'intérieur. De ce fait, une dose thermique plus faible suffit pour induire une hyperthermie modérée par MRgHIFU (entre 3,78 et 4,71 CEM₄₃) en comparaison avec celle nécessaire pour induire une hyperthermie modérée par bain-marie (entre 5 et 10 CEM₄₃).

2.4.3. Dommages cellulaires induits par MRgHIFU lors d'une hyperthermie modérée

Les dommages cellulaires induits par le traitement d'hyperthermie par MRgHIFU ont été étudiés par IRM dès la fin du chauffage et par histologie sur des coupes de tumeurs prélevées 6 heures après le traitement. Aucune différence n'est visible entre les images IRM anatomiques

prises avant et après la procédure pour les trois doses thermiques (Figure 86-A). L'excellente résolution spatiale de l'imagerie IRM permet de bien visualiser la tumeur mais l'image après traitement a probablement été prise trop précocement pour observer une modification de signal liée à la mortalité cellulaire. La coloration à l'hématoxyline, à l'éosine et au safran, plus communément appelée coloration HES, a été effectuée sur des coupes de tumeurs prélevées 6 heures après chauffage permettant ainsi d'observer d'éventuels effets délétères sur les cellules. L'hématoxyline colore les noyaux en violet foncé, l'éosine colore le cytoplasme en rose et le safran colore les fibres de collagène en orange. Dans la tumeur contrôle, on observe de petites zones de mort cellulaire caractérisées par un marquage nucléaire plus petit et foncé dû à la condensation de la chromatine (Figure 86-B). Ces zones sont probablement dues à la grande taille des tumeurs RM1 qui a volontairement été choisie pour faciliter la localisation de la tumeur par IRM et le chauffage par les HIFU. Elles sont retrouvées dans les trois conditions de traitement. Toutefois, pour la tumeur traitée par MRgHIFU avec une dose thermique de 5 CEM₄₃, la proportion de zones de mort cellulaire semble identique à celle de la tumeur contrôle. Plus la dose thermique délivrée est élevée et plus la proportion de zones de mort cellulaire semble augmenter.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus en BLI qui montrent une mortalité cellulaire (partielle ou totale) pour les tumeurs chauffées avec une dose thermique supérieure à 8,86 CEM₄₃. Les petites zones de mort cellulaire observées pour la condition contrôle et la dose thermique 5 CEM₄₃ (43 °C pendant 5 minutes) ne sont pas observées en BLI. Le signal BLI est fortement influencé par la profondeur de la tumeur et les photons mesurés sont majoritairement les photons émis par les cellules situées à la surface de la tumeur. Si ces zones sont localisées en profondeur, l'absence de signal émis par ces cellules est masquée dans le signal émis par les cellules en surface et ne peut donc pas être observé. Pour la dose thermique de 80 CEM₄₃, l'absence totale de signal BLI suggère que les cellules sont mortes. Cette mort cellulaire est intervenue de manière instantanée (assimilable à un processus de fixation) puisque les atteintes nucléaires ne sont pas observées dans l'ensemble de la coupe. Ces résultats seront confirmés grâce à l'analyse d'un plus grand nombre d'échantillon.

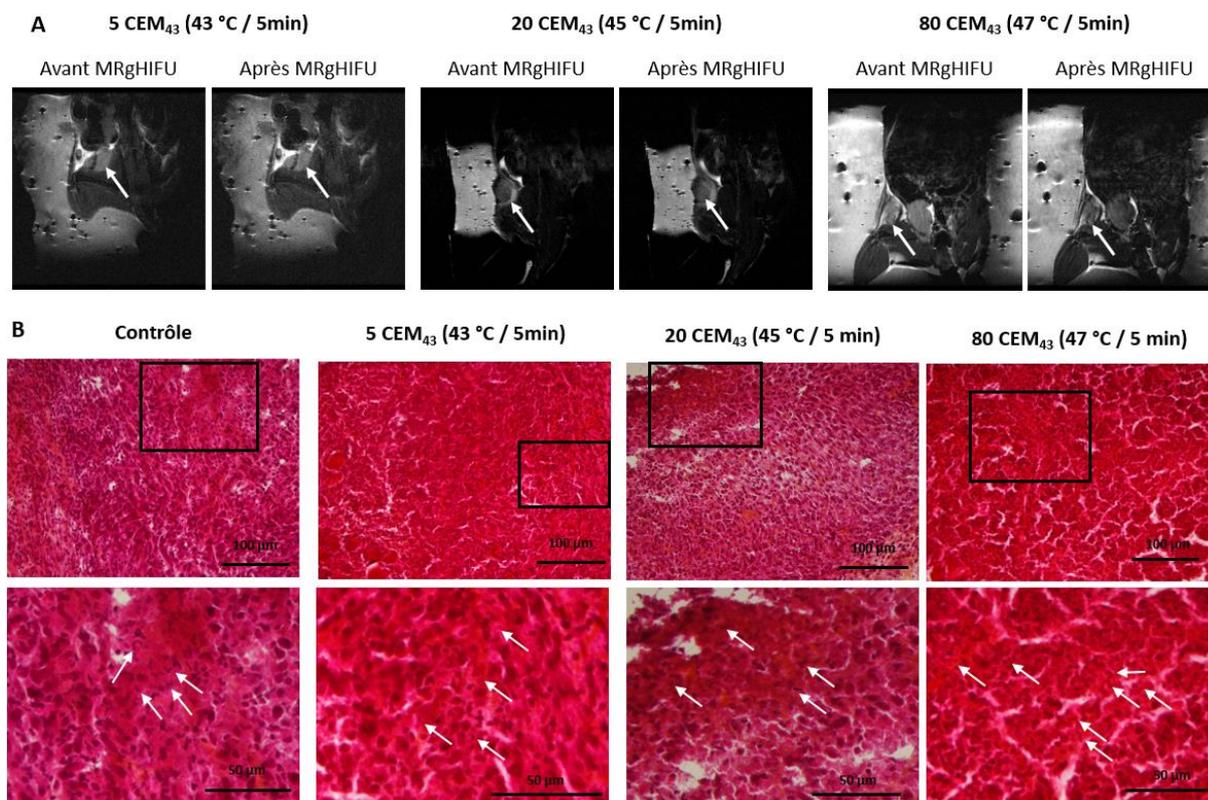


Figure 86 : Effet de l’hyperthermie modérée sur les tumeurs. **A** – Images d’IRM anatomiques prises avant et après application des MRgHIFU aux différentes doses thermiques. La tumeur est repérée grâce à la flèche blanche. **B** – Coloration HES effectuée sur des coupes de 10 µm sur les tumeurs congelées pour chaque condition d’hyperthermie (5 ; 20 et 80 CEM₄₃) et sur une tumeur contrôle non soumise au traitement d’hyperthermie. L’hématoxyline colore les noyaux en violet foncé, l’éosine colore le cytoplasme en rose et le safran colore les fibres de collagène en orange. Les flèches blanches représentent les zones de mort cellulaire.

Une hyperthermie modérée des tumeurs par MRgHIFU peut donc être réalisée sans effet majeur sur la viabilité des cellules tumorales pour des doses thermiques comprises entre 3,78 et 4,71 CEM₄₃. L’hyperthermie modérée est suffisante pour induire des processus physiologiques thermo-dépendants et pourrait être utilisée pour libérer localement et de manière contrôlée des agents de chimiothérapie à partir de nanoparticules thermosensibles ou pour potentialiser l’effet d’autres thérapies comme la radiothérapie et la chimiothérapie.

2.3. Thermoablation tumorale par MRgHIFU

Contrairement à l’hyperthermie modérée, une augmentation importante de la température induit directement la mort des cellules cancéreuses et permet de réaliser une

thermoablation des tissus. Associée au monitoring de la température par IRM, cette stratégie fait l'objet de nombreuses recherches et elle est d'ores et déjà en clinique pour des pathologies différentes du cancer, comme par exemple, pour le traitement du fibrome utérin (Voogt *et al.*, 2012; Thiburce *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018) ou le traitement du tremblement essentiel (Chang *et al.*, 2015a, 2015b). En oncologie, les MRgHIFU sont utilisés en clinique uniquement pour le traitement des métastases osseuses douloureuses (Lieberman *et al.*, 2009). Elle fait, par ailleurs, l'objet d'essais cliniques notamment pour le traitement du cancer du sein (Etude BRIFU, collaboration Institut Bergonié, IHU Lyric, Université d'Arizona ; actuellement en cours) et le cancer de la prostate (Napoli *et al.*, 2013b; Chin *et al.*, 2016).

2.5.1. Induction d'une thermoablation *in vivo*

Dans notre travail, pour mettre en évidence une thermoablation par MRgHIFU, les cellules RM1 génétiquement modifiées pour exprimer de manière constitutive la LucF (RM1-CMV-LucF) ont été utilisées. Dans cette étude, le signal BLI a été utilisé comme indicateur de viabilité cellulaire. Les cellules ont été implantées ($2 \cdot 10^6$ cellules/ 100 μ L de PBS) en sous-cutané sur le flanc gauche des souris immunocompétentes et le traitement d'hyperthermie a été effectué 7 jours après, lorsque la taille de la tumeur était d'environ 8 x 4 mm. Deux doses thermiques ont été étudiées : 4096 CEM₄₃ (55 °C pendant 1 minute) et 131072 CEM₄₃ (60 °C pendant 1 minute) (Figure 87-A et B). Un temps court a été choisi afin d'avoir une meilleure maîtrise de la température lors du rétrocontrôle. Cependant, la température mesurée n'a pas toujours atteint la température demandée dans le programme de rétrocontrôle de la température (ce point sera discuté à la fin du chapitre). Pour la dose thermique de 4096 CEM₄₃, la température de consigne était de 55 °C mais la moyenne des températures atteintes est de 49 °C, correspondant à une dose thermique moyenne de 453 CEM₄₃. Pour la dose thermique de 131072 CEM₄₃, la température demandée était de 60 °C mais la moyenne des températures atteintes est de 57,6 °C, correspondant à une dose thermique de 97212 CEM₄₃. Pour deux souris traitées pour la dose thermique de 131072 CEM₄₃, la température mesurée est restée inférieure à 55 °C, dès lors la dose thermique appliquée était proche du groupe 4096 CEM₄₃ et ces deux souris ont été rattachées à ce groupe (Figure 87-C).

L'intérêt du monitoring de la température par IRM est qu'il permet de faire l'analyse non pas en fonction de la consigne mais en fonction de la dose thermique réellement appliquée aux tissus. A partir de la figure 87 C, on observe que les doses thermiques appliquées sont

inférieures ou supérieures à 1024 CEM₄₃ (53 °C pendant 1 minute). Les résultats ont donc été analysés en fonction de la dose thermique réellement appliquée en formant deux groupes : un groupe dont la dose thermique délivrée est inférieure à 1024 CEM₄₃ et un groupe dont la dose thermique délivrée est supérieure à 1024 CEM₄₃.

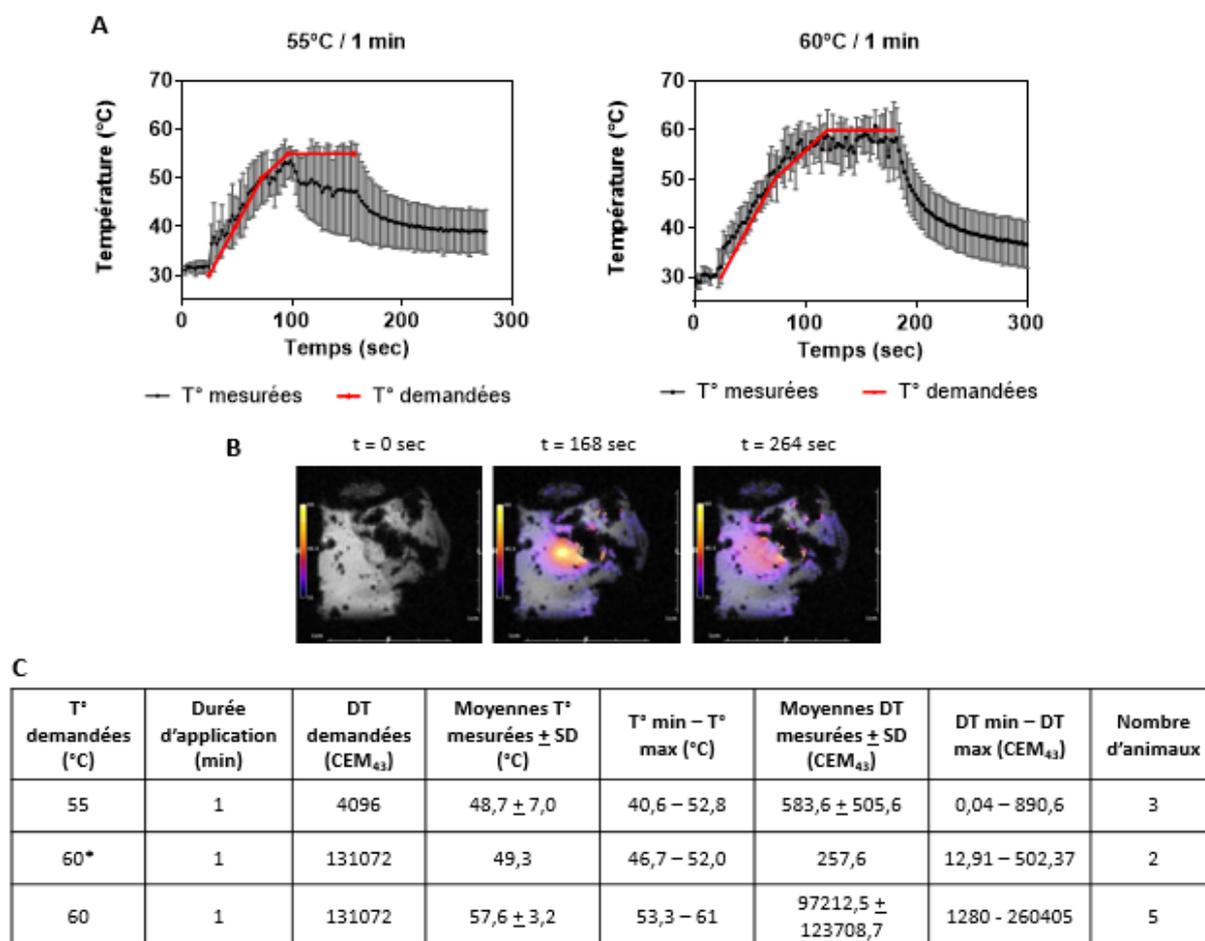


Figure 87 : Suivi de la température tumorale par IRM lors de la thermoablation induite par HIFU. **A** – Moyennes (\pm SD) des températures mesurées (courbes grises) et des températures demandées (courbes rouges) pour les deux consignes étudiées. **B** – Coupes coronale au niveau du point focal des ultrasons à différents temps du rétrocontrôle (0 ; 168 et 264 secondes). **C** – Tableau récapitulatif des données obtenues lors du traitement de thermoablation par MRgHIFU. * : 2 souris dont la dose thermique est proche de 4096 CEM₄₃ et rattachées à ce groupe ; DT = dose thermique

La viabilité cellulaire a été évaluée avant et 24 heures après le traitement d'hyperthermie par BLI. Comme discuté précédemment pour les tumeurs thermosensibles, l'analyse globale

des photons émis par la tumeur n'est pas pertinente. Nous avons choisi d'étudier le profil du signal BLI de chaque tumeur.

Pour un traitement d'hyperthermie induit avec des doses thermiques inférieures à 1024 CEM₄₃ (53 °C pendant 1 minute), le profil BLI montre une augmentation du signal dans la totalité de la tumeur 24 heures après le chauffage (Figure 88). Cet effet est dû à la prolifération rapide des cellules RM1 *in vivo*. Le traitement d'hyperthermie n'a donc pas d'effet sur la viabilité cellulaire à cette dose thermique.

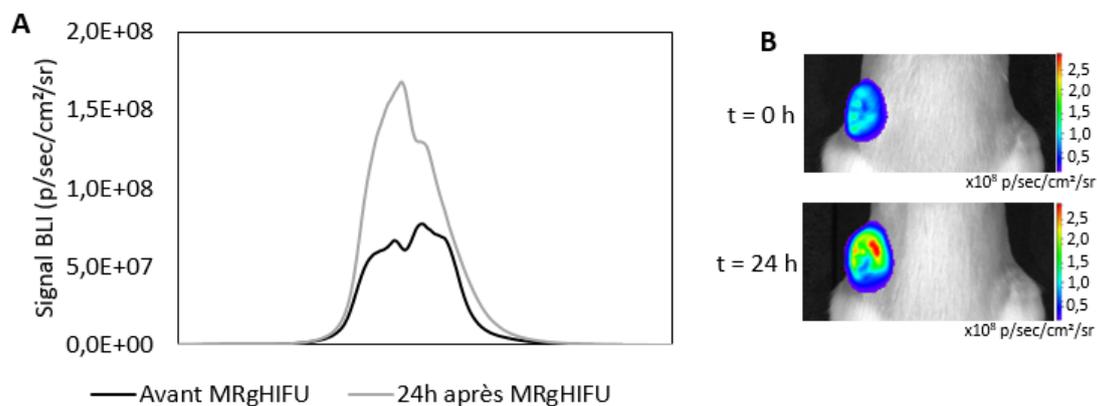


Figure 88 : Effet d'un traitement d'hyperthermie induit par MRgHIFU à une dose thermique inférieure à 1024 CEM₄₃. **A-** Profil du signal BLI avant et 24 heures après chauffage aux MRgHIFU d'une souris soumise à ces conditions d'hyperthermie. **B -** Images de BLI avant et 24 heures après chauffage aux MRgHIFU.

Pour des doses thermiques supérieures à 1024 CEM₄₃, 2 profils du signal BLI sont observés. Dans un cas, le profil BLI montre une diminution du signal dans la totalité de la tumeur, 24 heures après le traitement d'hyperthermie (Figure 89-A et B). La disparition complète du signal BLI correspond à une thermoablation totale de la tumeur. Dans un second cas, le profil BLI montre une diminution du signal dans une partie de la tumeur (Figure 89-C et D). La disparition partielle du signal BLI correspond à une thermoablation partielle ou incomplète de la tumeur.

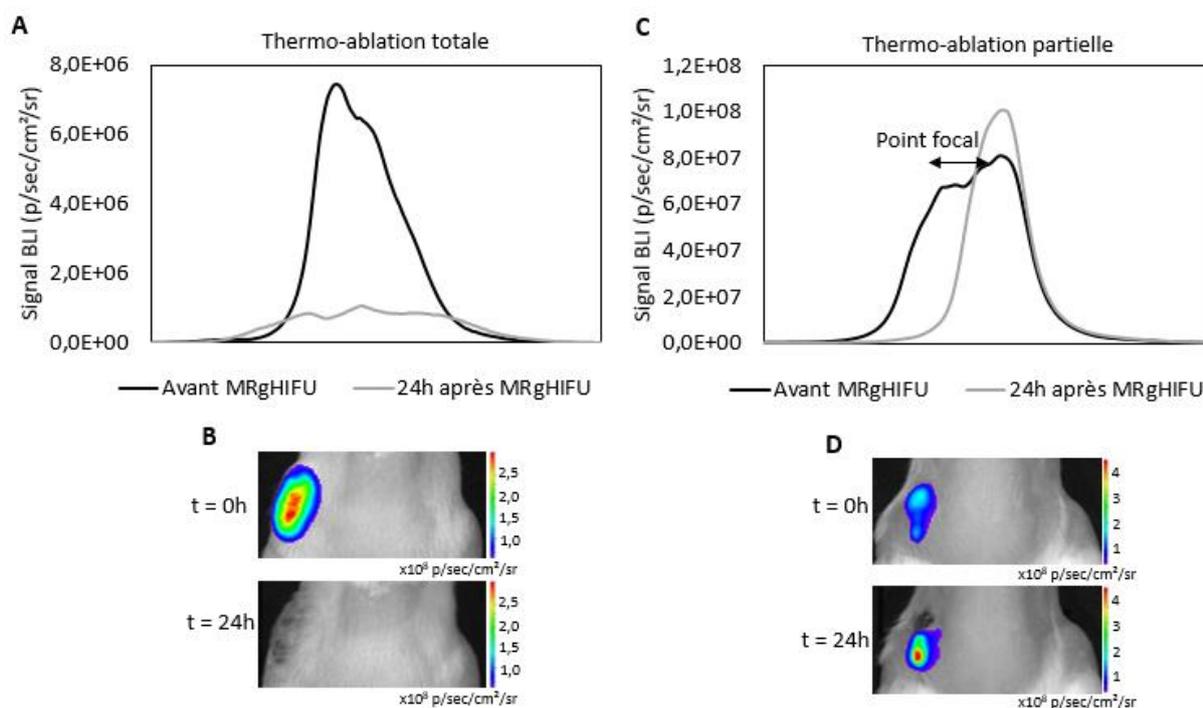


Figure 89 : Effet d'un traitement d'hyperthermie induit par MRgHIFU avec une dose thermique supérieure à 1024 CEM₄₃. A et C – Profils du signal BLI avant et 24 heures après le chauffage aux MRgHIFU conduisant à une thermoablation totale (A) (N = 2) ou partielle (C) (N = 3) de la tumeur. B et D - Images de BLI d'une souris avec une thermoablation tumorale totale (B) et d'une souris avec une thermoablation partielle de la tumeur (D).

A dose thermique semblable, l'effet dépend du positionnement du point focal au niveau de la tumeur. Dans certains cas, la proximité d'os ou de viscères a empêché de positionner le point focal des ultrasons au centre de la tumeur et a conduit à des ablations partielles. Parfois, le point focal était placé au centre de la tumeur mais la tumeur était trop grosse, la chaleur induite par le traitement n'était pas suffisante pour diffuser dans l'ensemble de la tumeur et permettre une thermoablation totale. Cette dernière situation est également retrouvée en clinique lors du traitement de grosses tumeurs. Dans ce cas, plusieurs traitements d'hyperthermie sont appliqués successivement de manière à traiter l'ensemble de la tumeur.

2.5.2. Dommages cellulaires induits par MRgHIFU lors d'une thermoablation

A la suite du traitement de thermoablation, les dommages cellulaires induits par les HIFU ont été détectés par imagerie IRM et en histologie par coloration HES sur des coupes de tumeurs. L'image IRM prise dès la fin du chauffage ne montre aucune différence avec celle

prise avant le traitement. Le délai entre l'hyperthermie et l'imagerie était trop court et ne permet pas de mettre en évidence des effets délétères macroscopiques sur la tumeur (Figure 90-A). Après ablation totale, le prélèvement des tumeurs n'a pas été possible. Comme observé précédemment, la tumeur contrôle comporte des zones de mort cellulaire probablement dues à la grande taille de la tumeur. Après ablation partielle, l'histologie révèle (Figure 90-B) des zones de cellules vivantes avec une morphologie normale caractérisée par un marquage nucléaire et cytoplasmique bien distinct. On remarque aussi des zones de cellules mortes où la morphologie cellulaire a disparu, le marquage nucléaire est quasi inexistant et seul persiste le marquage cytoplasmique à l'éosine (Figure 90-B). Néanmoins, ces zones sont beaucoup plus larges que celles observées dans la tumeur contrôle. Toute la partie zoomée dans la tumeur traitée aux MRgHIFU à une dose thermique de 131072 CEM₄₃ correspond à une zone de mort cellulaire (Figure 90-B). Ces résultats seront confirmés grâce à l'analyse d'un plus grand nombre d'échantillon.

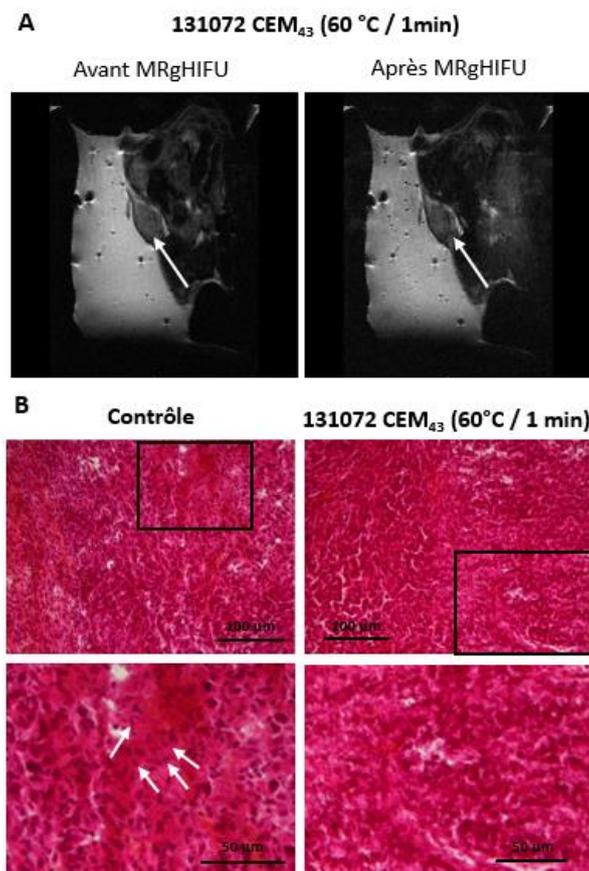


Figure 90 : Effet du traitement d'hyperthermie sur la tumeur. **A** – Images d'IRM anatomiques acquises avant et après l'application des MRgHIFU. La tumeur est montrée par la flèche blanche. **B** – Coloration HES sur coupes d'une tumeur contrôle (sans application des

MRgHIFU) et d'une tumeur chauffée aux MRgHIFU et ayant subi une thermoablation tumorale partielle (131 072 CEM₄₃ soit 60 °C / 1 min). La coloration HES marque les noyaux en bleu foncé avec l'hématoxyline, le cytoplasme en rose avec l'éosine et les fibres de collagène en orange avec le safran. Les flèches blanches représentent les zones de mort cellulaire. Pour la condition 131072 CEM₄₃, toute la partie zoomée est une zone de mort cellulaire.

L'ensemble de ces résultats montre que les MRgHIFU peuvent être contrôlés pour induire une thermoablation tumorale sélective pour des doses thermiques supérieures à 1024 CEM₄₃ (53 °C pendant 1 minute). Le placement du point focal des ultrasons est primordial et déterminant pour l'efficacité du traitement.

2.4. Induction d'une thermo-modulation du microenvironnement tumoral combinée à une thermoablation tumorale par MRgHIFU

Lors d'une thermoablation, le positionnement optimal du point focal n'est pas toujours possible et l'ablation tumorale est imparfaite. La récurrence locale et le développement de métastases sont à l'origine de plus de 90 % des décès par cancer (Chaffer & Weinberg, 2011). Il est donc souvent souhaitable d'associer l'ablation tumorale à des traitements adjuvants. Lors des thermoablations par MRgHIFU, comme précédemment décrit, la chaleur diffuse dans et hors de la tumeur et affecte à la fois les cellules tumorales et les cellules du μ E. L'idée explorée dans ce chapitre consiste à combiner l'ablation tumorale et l'hyperthermie modérée du μ E par MRgHIFU. L'effet sur le μ E a été étudié grâce aux souris thermosensibles qui expriment la LucF sous le contrôle du promoteur Hsp70. L'effet impliquant les cellules tumorales a été étudié grâce à une lignée tumorale RM1 exprimant la Nluc de manière constitutive (RM1-CMV-Nluc). Les deux luciférases, Nluc et LucF, possèdent des substrats différents, respectivement la Furimazine et la D-Luciférine, et ont été étudiées avec des cinétiques différentes afin de différencier les deux activités enzymatiques (Figure 91-A).

Un premier programme de thermorégulation (n°1) avec une dose thermique de 131072 CEM₄₃ (60 °C pendant 1 minute) a été utilisé pour induire une thermoablation tumorale (identique au programme de rétrocontrôle de la température utilisé dans le chapitre précédent). Avec ce programme, la différence observée entre la température de consigne et la température mesurée était de 7 °C. Cette anomalie est probablement due à un problème de transducteur incapable de suivre la consigne. Pour tenter de résoudre ce problème, un second programme de

thermorégulation (n°2) prévoyant une pente d'élévation de la température plus douce a été utilisé (Figure 91-B et C). Cependant, une différence de 7 °C est toujours observée entre les températures demandées et les températures mesurées (Figure 91-D). La figure 91 B illustre les résultats obtenus avec les 2 programmes.

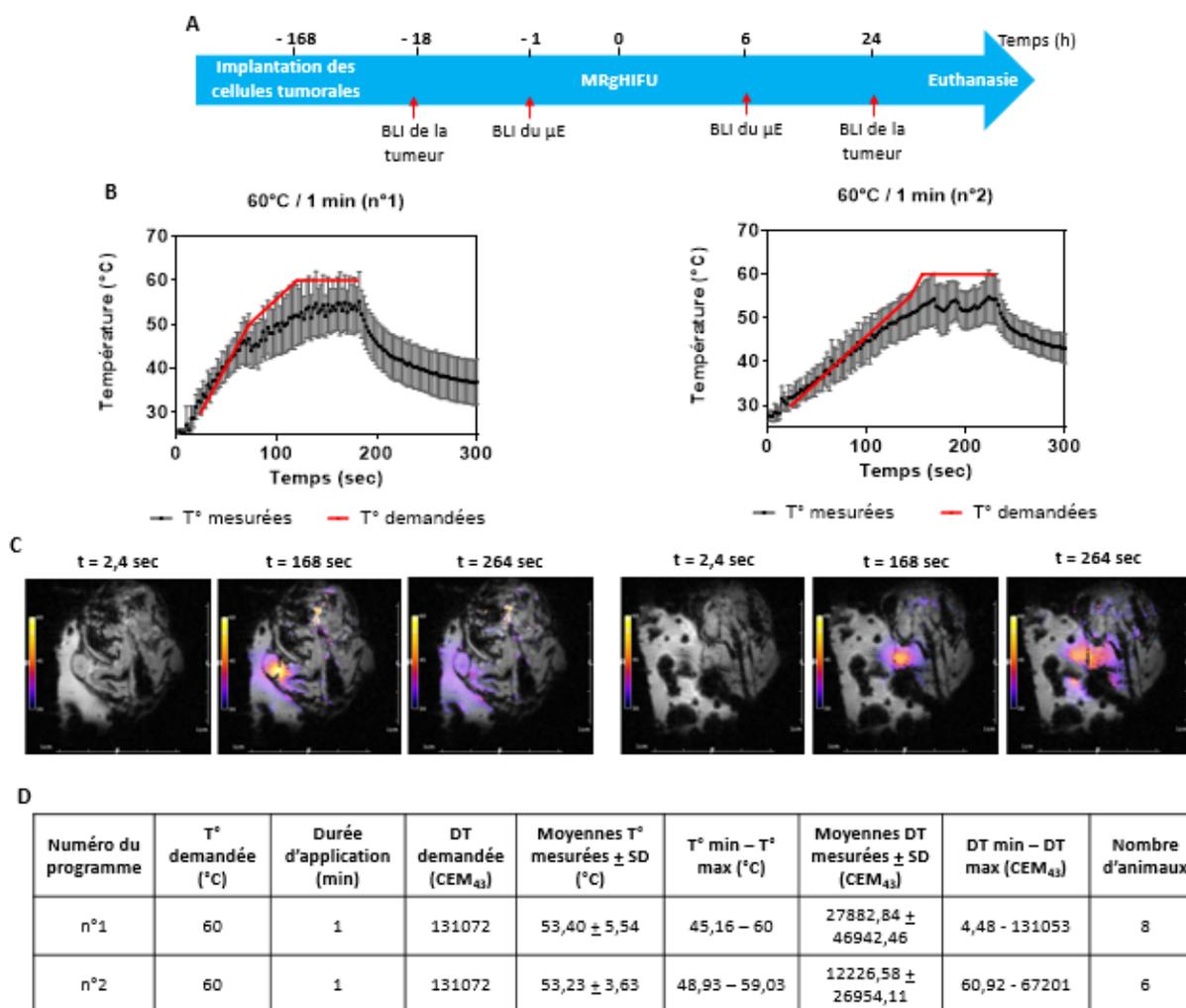


Figure 91 : Suivi de la température tumorale lors de l'étude des effets induits par MRgHIFU sur le µE. **A** – Chronologie expérimentale : Les cellules RM1-CMV-Nluc sont implantées par voie sous-cutanée au niveau du flanc gauche des souris thermosensibles. Le signal BLI de la tumeur est mesuré 18 heures avant et 24 heures après chauffage aux MRgHIFU. Le signal BLI du µE est mesuré 1 heure avant et 6 heures après le chauffage aux MRgHIFU. **B** – Moyennes (± SD) des températures mesurées (courbes grises) et des températures demandées (courbes rouges) pour les deux programmes de thermorégulation. **C** – Coupes coronales au début (t = 2,4 secondes) et pendant (t = 168 secondes) le rétrocontrôle de la température et pendant la phase de refroidissement (t = 264 secondes) pour les deux programmes de thermorégulation. **D** – Tableau récapitulatif des données obtenues lors de l'étude sur l'ensemble des souris. DT = doses thermiques

Les doses thermiques effectives appliquées aux tumeurs sont comprises entre 4 et 131053 CEM₄₃. Conformément aux résultats du chapitre précédent, les résultats obtenus ont été séparés en deux groupes (Dose thermique inférieure à 1024 CEM₄₃ ou supérieure à 1024 CEM₄₃) (Tableau 16).

Groupes DT effective (CEM ₄₃)	T° demandée (°C)	Durée d'application (min)	DT demandée (CEM ₄₃)	Moyennes T° mesurées ± SD (°C)	T° min – T° max (°C)	Moyennes DT mesurées ± SD (CEM ₄₃)	DT min – DT max (CEM ₄₃)	Nombre d'animaux
< 1024	60	1	131072	48,10 ± 1,76	45,16 – 49,81	51,48 ± 39,76	4,48 - 112	5
> 1024	60	1	131072	56,23 ± 2,64	53,41 – 60	32907,20 ± 45316,07	1360 – 131053	9

Tableau 16 : Tableau récapitulatif des données obtenues lors de l'étude des effets induits MRgHIFU sur le µE. DT = dose thermique

Comme précédemment décrit, l'application des MRgHIFU à des doses thermiques inférieures à 1024 CEM₄₃ n'a pas induit de thermoablation tumorale. Le profil du signal BLI de la tumeur montre une augmentation globale 24 heures après chauffage à cause de la prolifération des cellules (Figure 92-A). Toutefois, cette élévation de température a également induit une élévation du signal BLI du µE mettant en évidence une activation du promoteur Hsp70 (Figure 92-B). Le signal BLI du µE forme un anneau autour du point d'entrée des ultrasons. A son centre se trouve une zone de nécrose où les cellules mortes ne sont pas luminescentes. La diffusion de la chaleur autour du point d'entrée des ultrasons entraîne une forte activation du promoteur Hsp70 conduisant à un signal BLI élevé. La diffusion de la température dans les tissus étant faible, le diamètre de l'anneau du signal BLI est petit (Figure 92-C).

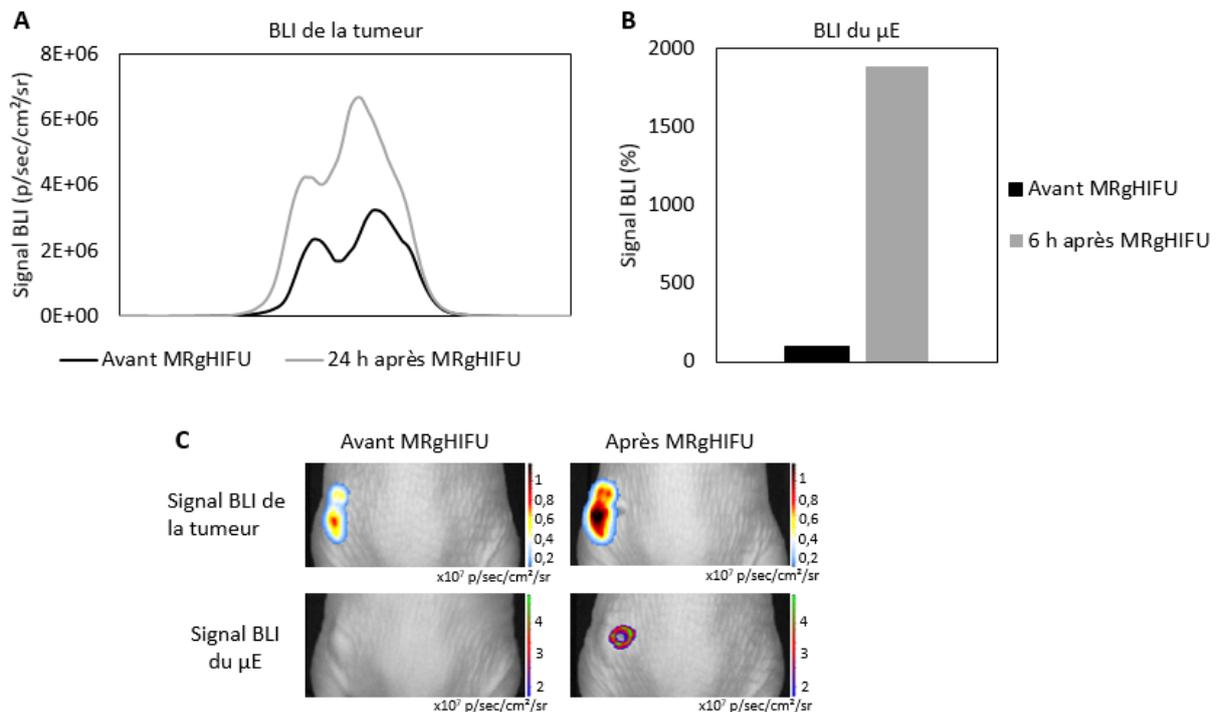


Figure 92 : Effet d'une hyperthermie induite par MRgHIFU à une dose thermique inférieure à 1024 CEM₄₃ sur la tumeur et le μ E. A – Profil du signal BLI de la tumeur avant (courbe noire) et 24 heures après (courbe grise) application des MRgHIFU. B – Signal BLI du μ E avant et 6 heures après application des MRgHIFU. C – Images de BLI de la tumeur et du μ E avant et après application des MRgHIFU.

L'application des MRgHIFU à des doses thermiques supérieures à 1024 CEM₄₃ a conduit à une thermoablation tumorale totale (Figure 93) ou partielle (Figure 94) suivant la localisation du point focal des ultrasons dans la tumeur. Lorsque le traitement d'hyperthermie conduit à une thermoablation tumorale totale, le signal BLI du μ E augmente également (Figure 93-B). Le signal BLI du μ E forme un anneau mais d'un diamètre supérieur à celui obtenu lors d'une hyperthermie à des doses thermiques inférieures à 1024 CEM₄₃. La dose thermique délivrée était plus élevée donc la chaleur a diffusé plus largement dans les tissus. Ainsi, la zone de nécrose cellulaire est plus importante et l'épaisseur de l'anneau du signal BLI reste fin (Figure 93-C).

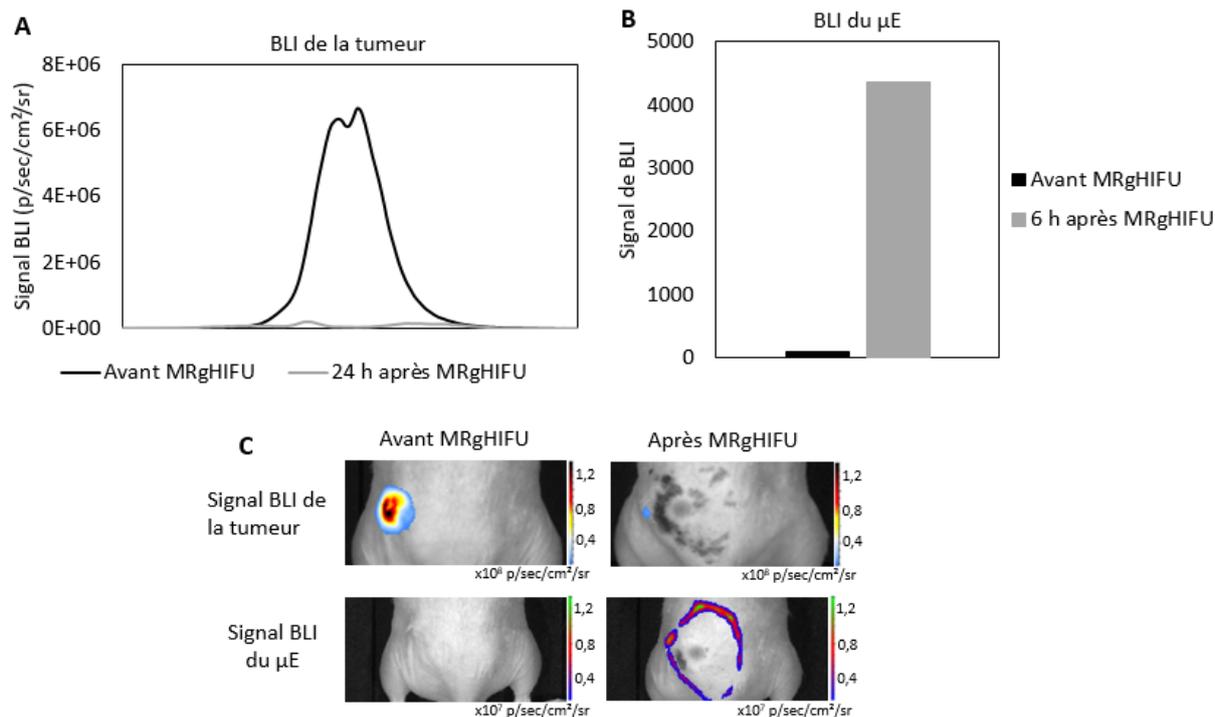


Figure 93 : Effet d'une hyperthermie induite par MRgHIFU sur le μ E suite à une thermoablation tumorale totale *in vivo*. **A** – Profil du signal BLI de la tumeur avant (courbe noire) et 24 heures après (courbe grise) l'application des MRgHIFU. **B** – Signal BLI du μ E avant et 6 heures après application des MRgHIFU. **C** – Images de BLI de la tumeur et du μ E dont le traitement aux MRgHIFU induit une thermoablation tumorale totale (N = 4).

Lorsque le traitement d'hyperthermie induit par les MRgHIFU conduit à une thermoablation tumorale partielle (Figure 94-A), le signal BLI du μ E est fortement augmenté 6 heures après chauffage (Figure 94-B). L'anneau de BLI contient une zone de nécrose de la même taille que la zone tumorale ablatée. La diffusion de la chaleur a conduit à l'activation du promoteur Hsp70 marquée par l'augmentation du signal BLI du μ E autour de la tumeur (Figure 94-C).

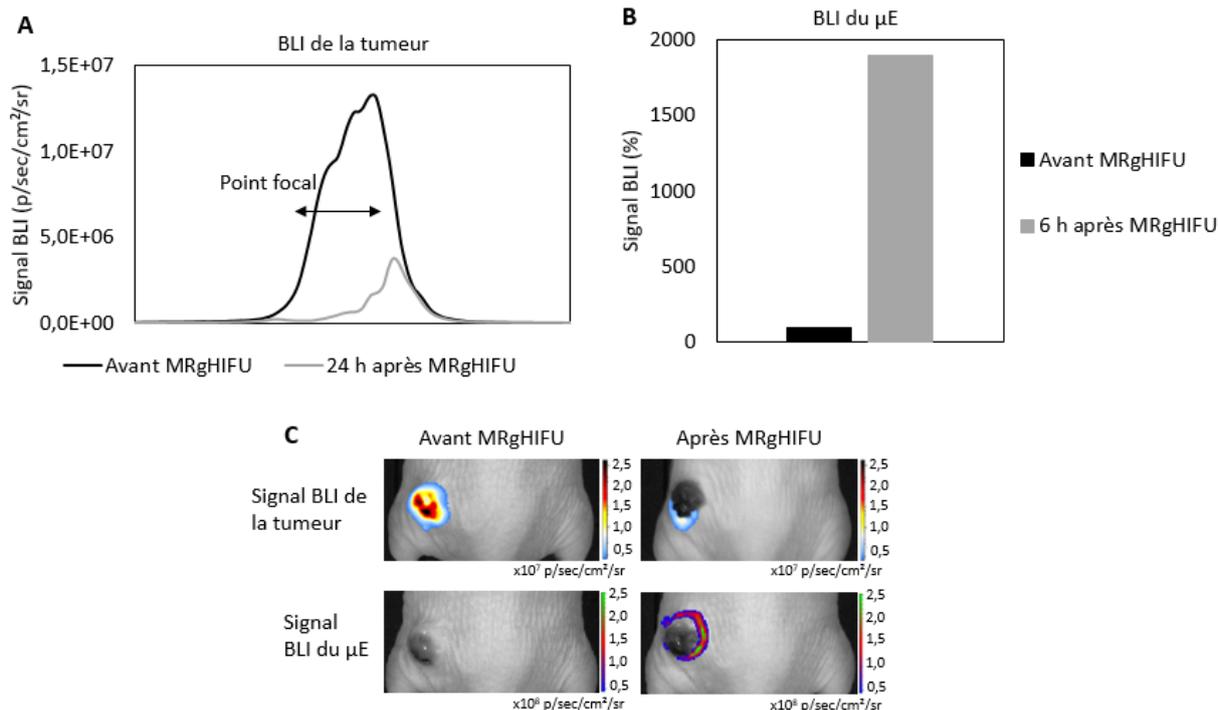


Figure 94 : Effet d'une hyperthermie induite par MRgHIFU sur le μ E lors d'une thermoablation tumorale partielle *in vivo*. **A** – Profil du signal BLI de la tumeur avant (courbe noire) et 24 heures après (courbe grise) application des MRgHIFU. **B** – Signal BLI du μ E avant et 6 heures après l'application des MRgHIFU. **C** – Images de BLI de la tumeur et du μ E avant et après application des MRgHIFU (N = 5).

Pour chaque condition (doses thermiques inférieures à 1024 CEM₄₃, doses thermiques supérieures à 1024 CEM₄₃ induisant une thermoablation tumorale totale ou partielle), une hyperthermie modérée caractérisée par une activation du promoteur Hsp70 dans le μ E est observée. Cependant, la taille de l'anneau du signal BLI diffère. Lorsque la dose thermique est faible (inférieure à 1024 CEM₄₃), il est de petite taille avec une faible zone de nécrose et une hyperthermie modérée autour du point d'entrée des ultrasons. Lorsque la dose thermique est élevée (supérieure à 1024 CEM₄₃), la zone de nécrose est plus importante. La diffusion de la chaleur est donc plus grande pour des températures élevées. Cependant, l'épaisseur de l'anneau du signal BLI du μ E reste comparable. De plus, lors d'une thermoablation totale, la zone de nécrose est plus importante que celle d'une thermoablation partielle mettant en évidence une meilleure diffusion de la chaleur.

L'ensemble des résultats met en évidence que la thermoablation de la tumeur par MRgHIFU s'accompagne d'une hyperthermie modérée périphérique. La zone d'hyperthermie

modérée périphérique dépend de la dose thermique appliquée et de la diffusion de chaleur dans les tissus.

DISCUSSION GENERALE

La thérapie par HIFU est très prometteuse car elle est totalement non invasive et peut être adaptée à tous les types de tumeurs, même les tumeurs profondes difficilement accessibles. La taille minimale de la zone traitée correspond à la taille du point focal qui est dépendante des propriétés du transducteur ultrasonore. Le point focal a souvent la forme d'un grain de riz avec une longueur de 1,5 mm environ (Kennedy, 2005; Haar & Coussios, 2007).

Si l'utilisation des HIFU pour l'ablation tissulaire est très répandue et est d'ores et déjà en clinique (Kennedy, 2005; Grenier *et al.*, 2008; Liberman *et al.*, 2009; Napoli *et al.*, 2013a; Hsiao *et al.*, 2016), son utilisation pour l'hyperthermie modérée pour des applications de type thermo-modulation est peu documentée (Partanen *et al.*, 2012; Frazier *et al.*, 2016, 2017). L'objectif de cette étude était de faire la preuve de concept, par imagerie *in vivo*, que la thermoablation et l'hyperthermie modérée pouvaient être combinées pour le traitement des tumeurs solides. Notre première approche a consisté à utiliser un dispositif HIFU sans guidage par imagerie. L'utilisation de souris thermosensibles, génétiquement modifiées pour une expression thermo-induite de la LucF, nous a permis de mettre en évidence une hyperthermie modérée par une activation uniforme du promoteur Hsp70 dans la zone traitée. Plusieurs protocoles de chauffage ont été étudiés mais l'élément le plus marquant est l'absence de reproductibilité des résultats. Il résulte de l'imprécision du placement du point focal d'ultrasons et de l'absence de rétrocontrôle de la température. De plus, la diffraction des faisceaux ultrasonores est responsable de la formation de points de chauffage secondaires incontrôlés. Ces résultats mettent clairement en évidence la nécessité d'un guidage par imagerie, à la fois pour contrôler le positionnement du point focal mais aussi pour suivre l'évolution de la température.

Les HIFU peuvent être couplés à un système d'imagerie notamment l'IRM, l'échographie et la tomographie X. Un couplage des HIFU avec un échographe permet un positionnement correct du point focal et d'apprécier l'effet du traitement d'hyperthermie au niveau de la zone chauffée. Cependant, il ne permet pas de suivre en temps réel l'élévation de la température dans la zone ciblée. La tomographie X est peu développée pour son utilisation en combinaison avec un système d'hyperthermie car elle expose le patient à des

rayons ionisants. Le couplage des HIFU avec l'IRM (MRgHIFU) est la combinaison la plus utilisée. Malgré une accessibilité difficile pour le patient et l'obligation d'avoir un système d'HIFU amagnétique (IRM compatible), l'IRM permet d'optimiser le placement du point focal d'ultrasons dans la zone à traiter et de détecter d'éventuelle diffraction des faisceaux ultrasonores. Elle est également capable d'effectuer une boucle de rétrocontrôle de l'intensité des ultrasons en fonction de l'élévation de la température qu'elle mesure lors du traitement d'hyperthermie (Kennedy, 2005; Haar & Coussios, 2007; Moonen, 2007).

Le dispositif MRgHIFU utilisé est nouveau. Un système HIFU pour petit animal composé de 8 canaux est installé dans une IRM préclinique à 9,4 T et est piloté par le logiciel Thermoguide dédié. Plusieurs problèmes ont été rencontrés lors de l'utilisation de ce système (hypothermie de la souris, présence de bulle d'air dans le gel échographique sur le chemin des ultrasons, mauvais positionnement du transducteur par rapport à la tumeur). La majorité de ces problèmes a rapidement été résolue lors de la mise au point et de la validation du protocole sur les souris thermosensibles. Toutefois, à la fin des expérimentations, deux problèmes ont été relevés :

- La dose thermique demandée n'a pu être atteinte dans la plupart des expérimentations. Une différence de 1 à 2 °C a été mesurée entre la température de consigne et la température mesurée avec des conséquences majeures sur la dose thermique appliquée aux tissus. Par ailleurs, cette défaillance s'est accrue vers la fin de l'étude (7 °C de différence). Aucun problème technique n'a été détecté au niveau du transducteur. Pour protéger le transducteur d'une éventuelle réflexion des faisceaux ultrasonores qui pourrait l'endommager, certains canaux peuvent être inactivés par le logiciel. A plusieurs reprises, 2 canaux sur 8 ont été éteints pendant le chauffage ce qui pourrait expliquer le manque de puissance pour atteindre la température demandée. L'inactivation des canaux peut notamment être due à la présence de bulles d'air dans le gel d'échographie. Une attention particulière sera prise sur la présence de ces bulles d'air dans les prochaines études afin d'éviter l'arrêt automatique des canaux. Un transducteur d'ultrasons plus puissant pourrait peut-être permettre de compenser le manque de puissance après extinction de certains canaux.
- L'étude histologique a montré des zones de mort cellulaire dans les tumeurs contrôles (non chauffées aux MRgHIFU) qui sont probablement dues au grand diamètre des tumeurs. Ce diamètre a été choisi pour faciliter la localisation de la tumeur par IRM et pour limiter les

effets délétères du chauffage aux tissus sains avoisinants la tumeur. Cependant, pour réaliser une étude histologique pertinente, aucune zone de mort cellulaire ne doit apparaître dans les tumeurs contrôles. Pour la suite des expérimentations, les tumeurs auront un diamètre inférieur.

La mesure de la température au niveau du tissu cible permet de déterminer la dose thermique réellement délivrée et donc de s'affranchir des problèmes de rétrocontrôle. La thermoablation résulte de la destruction des cellules tumorales par la chaleur (Avedian *et al.*, 2011). La dose thermique délivrée impacte directement le volume tumoral ablaté. L'hyperthermie modérée est caractérisée par l'application d'une dose thermique faible qui n'induit pas directement la mort des cellules cancéreuses. Elle permet d'améliorer l'efficacité des thérapies anticancéreuses. Elle est également capable de conduire à la libération contrôlée d'agents cytotoxiques à partir de nanoparticules thermosensibles (Ranjan *et al.*, 2012; Grill & Langereis, 2012; Hijnen *et al.*, 2017; Farr *et al.*, 2017) ou d'induire une expression thermo-réglée de gènes ou de miRNA par les cellules tumorales (Guilhon *et al.*, 2003; Moonen, 2007; Deckers *et al.*, 2009; Pinel *et al.*, 2018) ou par les cellules du μE (Fortin *et al.*, 2015). Notre étude a montré qu'une hyperthermie modérée peut être générée par MRgHIFU dans une tumeur pour des doses thermiques comprises entre 3,78 et 4,71 CEM₄₃ en préservant la viabilité cellulaire. Cette stratégie peut être intéressante lorsque la destruction directe des cellules tumorales n'est pas souhaitable (présence de structure à conserver proche) et que des stratégies indirectes (thermo-activables) sont préférables. Notre étude a également montré qu'une thermoablation tumorale par MRgHIFU est possible avec des doses thermiques supérieures à 1024 CEM₄₃ (53 °C pendant 1 minute).

Si le point focal est placé au centre de la tumeur, l'ablation totale peut être réalisée. Toutefois, selon la proximité de la tumeur avec des os, les viscères ou une structure à préserver, le point focal des ultrasons ne peut pas être placé au centre de la tumeur. Dans ce cas, les MRgHIFU induisent une thermoablation tumorale partielle. Chez la souris, le positionnement du point focal est souvent compliqué à cause de la taille du point focal par rapport à celle de l'animal et de la tumeur. Dans notre étude, les tumeurs ont été délibérément placées sur le flanc de l'animal et malgré cela, la présence d'os, de la cavité péritonéale et des viscères est parfois problématique, interdisant l'ablation totale. La situation clinique est différente avec souvent la

nécessité de traiter des grosses tumeurs mais les difficultés de positionnement persistent avec la présence d'os sur le trajet des ultrasons et la présence de structure à préserver à la périphérie de la tumeur. Malgré les nombreuses recherches pour tenter d'apporter des solutions à ces différents problèmes, il est probable que l'ablation tumorale totale ne sera pas toujours possible.

La thermoablation est toujours associée à une zone d'hyperthermie modérée autour de la zone chauffée. Elle résulte de la diffusion de la chaleur et induit un gradient de dose thermique capable d'induire des phénomènes thermo-dépendants comme le révèle l'expression thermo-induite de la luciférase. Ainsi, il est possible, par MRgHIFU, de combiner en un seul traitement la thermoablation tumorale totale ou partielle avec une hyperthermie modérée périphérique. Sur nos images, la zone d'hyperthermie modérée à la périphérie de la zone ablatée est matérialisée par la zone de BLI qui apparaît relativement constante mais la résolution de cette modalité d'imagerie est faible. Il serait intéressant de voir si le protocole de chauffage (temps, température, fractionnement de la dose thermique, répétition) peut influencer l'étendue spatiale de la zone d'hyperthermie modérée.

Associée à l'hyperthermie modérée, l'injection de nanoparticules thermosensibles contenant un agent de chimiothérapie devrait permettre une meilleure efficacité de traitement. Les nanoparticules thermosensibles ne sont pas encore disponibles en clinique mais font l'objet de plusieurs essais cliniques comme par exemple des liposomes thermosensibles contenant de la doxorubicine (Lyon *et al.*, 2017). Cette double thérapie permettrait à la fois de surmonter la contrainte rencontrée avec le placement du point focal des ultrasons mais également d'atteindre d'éventuelles cellules périphériques au bord de la tumeur en limitant les effets délétères au niveau des tissus sains environnants. Elle augmenterait ainsi la probabilité d'atteindre toutes les cellules cancéreuses formant la tumeur et diminuerait le risque de récurrence.

CONCLUSION GENERALE

L'hyperthermie magnétique et les MRgHIFU sont actuellement utilisés en clinique. L'hyperthermie magnétique améliore les effets de la radiothérapie dans le traitement du glioblastome (Maier-Hauff *et al.*, 2007, 2011) et les MRgHIFU sont utilisés dans le traitement des métastases osseuses douloureuses (Lieberman *et al.*, 2009). Par ailleurs, de nombreux essais cliniques ciblent d'autres cancers comme, par exemple, le cancer du sein par MRgHIFU (projet BRIFU actuellement en cours, Bordeaux) et le cancer de la prostate par MRgHIFU (Napoli *et al.*, 2013b; Chin *et al.*, 2016) ou par hyperthermie magnétique (Johannsen *et al.*, 2007a, 2007b). Le bénéfice thérapeutique de ces traitements reste faible et, actuellement, ces thérapies ne sont pas approuvées par les autorités de santé nationales ou internationales dans la prise en charge des patients. L'efficacité de ces traitements peut et doit encore être améliorée. L'objectif de ce projet de thèse était de faire la preuve de concept, par imagerie *in vivo* chez la souris, de l'efficacité de ces deux thermo thérapies mais aussi de développer des modèles précliniques pertinents pour permettre une approche expérimentale dédiée à l'amélioration de ces techniques. Pour cela, les modèles murins que nous avons développés et les modalités d'imagerie que nous avons mises en œuvre permettent de tester de nouvelles hypothèses pour évaluer l'efficacité de ces thérapies. Entre autre, ces techniques ont permis de mettre en évidence l'effet des thermo thérapies sur les tumeurs, la diffusion de la chaleur dans les tissus et la dose thermique à appliquer suivant l'effet thérapeutique recherché. Nos résultats confirment le potentiel de l'hyperthermie magnétique et des MRgHIFU mais ils soulignent aussi les points faibles à améliorer pour une utilisation plus répandue de ces techniques en clinique.

Tout d'abord, l'accessibilité des tumeurs. En hyperthermie magnétique, elle dépend de la localisation des NPMs dans l'organisme qui peuvent être injectées dans la circulation sanguine afin d'atteindre la tumeur primaire et d'éventuelles métastases. Cependant, le phénomène d'opsonisation augmente la reconnaissance des NPMs par le système immunitaire limitant ainsi leur accumulation dans la tumeur et, à l'heure actuelle, le pourcentage d'adressage à la tumeur des NPMs est très faible. L'amélioration de l'efficacité et de la spécificité est actuellement un challenge majeur de la nano-médecine. La seconde voie d'injection est la voie intra-tumorale qui est principalement utilisée pour les tumeurs accessibles. Toutefois,

l'utilisation de dispositifs médicaux, l'endoscopie et la cathétérisation, couplés à un guidage par imagerie offrent des possibilités nouvelles pour l'injection de NPMs dans les tumeurs profondes. Pour les MRgHIFU, le faisceau d'ultrasons se propage à travers les tissus pour se focaliser au niveau de la tumeur. Cependant, la proximité d'os et de viscères peut gêner le placement du point focal car les os absorbent fortement l'énergie ultrasonore en comparaison avec les autres tissus et les viscères sont responsables d'artefacts de mouvements lors du rétrocontrôle de la température. Ces problèmes, qui existent en clinique, sont exacerbés sur les modèles murins à cause de la réduction de la taille. De plus, les souris sont très sensibles à l'élévation de la température dans les viscères, entraînant souvent le décès de l'animal.

Le suivi spatio-temporel de la température est essentiel pour le contrôle des thérapies. De ce point de vue, les HIFU bénéficient avantageusement des propriétés de l'IRM capable de mesurer les variations de la température et d'effectuer un rétrocontrôle automatique de l'intensité des ultrasons en fonction de l'élévation de la température mesurée. De ce point de vue, le système MRgHIFU, que nous avons utilisé, mérite quelques améliorations afin de réduire l'écart entre la température demandée et la température mesurée. Toutefois, la mesure précise de la dose thermique déposée dans les tissus a permis d'interpréter les effets thérapeutiques obtenus. Elle a permis également de visualiser la diffusion de la chaleur autour du point de chauffage et les éventuelles diffractions du faisceau d'ultrasons responsables de points de chauffage secondaires pouvant être délétères. Le contrôle de la température en hyperthermie magnétique est plus problématique puisque l'utilisation de NPMs à fortes concentrations a un impact sur l'image IRM. Des systèmes de rétrocontrôle du champ magnétique par la température sont implémentés sur les machines mais aucune méthode de mesure thermique non invasive n'est disponible. L'élévation de la température peut être suivie à l'aide de sonde optique (invasive) ou d'une caméra thermique (qui ne mesure que la température en surface de l'animal et qui peut être utilisée uniquement pour les tumeurs sous-cutanées). La dose thermique réellement déposée dans les tissus ne peut pas être contrôlée. La caractérisation des NPMs, de leur pouvoir chauffant en fonction du couple fréquence/amplitude, leur répartition spatiale, leur concentration tissulaire (facilement accessible par IRM ou MPI) et la modélisation devraient permettre une bonne prédiction. Enfin, il est possible de concevoir des NPMs capables de perdre leur propriété d'échauffement dans un champ magnétique à une température prédéfinie permettant d'éviter les problèmes de surchauffe (Natividad *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2017).

Une préoccupation majeure de notre travail concerne l'hyperthermie modérée. Elle est induite par une faible dose thermique. En MRgHIFU, le dispositif de rétrocontrôle permet d'appliquer de faibles doses thermiques grâce à une énergie ultrasonore de faible intensité. En hyperthermie magnétique, l'hyperthermie modérée résulte d'une faible accumulation de NPMs dans la tumeur, de l'utilisation de NPMs avec un faible pouvoir thermique et/ou de la modulation des paramètres d'application du champ magnétique. L'hyperthermie modérée est intéressante et très prometteuse pour diverses raisons : (1) elle potentialise les effets de nombreuses thérapies anticancéreuses (chimiothérapie, radiothérapie), (2) elle conduit à la libération locale et contrôlée d'agents thérapeutiques à partir de nanoparticules thermosensibles ou active l'expression thermo-inductible d'un gène et (3) elle permet d'associer localement les thermoablations aux nouvelles approches de thérapies anticancéreuses. Nous avons montré que la thermoablation tumorale induisait systématiquement une hyperthermie modérée en périphérie de la zone ablatée, ce qui implique que les thermoablations pourraient facilement et systématiquement être associées à des stratégies adjuvantes basées sur la thermo-modulation. Cette double thérapie fournirait un avantage décisif pour l'utilisation des thermothérapies dans la destruction physique des tumeurs par rapport aux stratégies actuelles telles que la chirurgie et la radiothérapie. La libération locale permettrait d'augmenter considérablement la concentration des agents thérapeutiques au niveau de la cible tout en réduisant les effets secondaires systémiques. Dans ce contexte, les NPMs sont particulièrement avantageuses puisqu'elles peuvent être à la fois l'élément chauffant et le nano-véhicule contenant le médicament. A contrario, la proximité de l'élément chauffant et de l'agent thérapeutique augmente le risque de dénaturation du médicament. Actuellement, des hydrogels et liposomes thermosensibles sont en cours d'essais précliniques et cliniques (Affram *et al.*, 2015; Xie *et al.*, 2017; Lyon *et al.*, 2017) mais aucun produit thermosensible n'est actuellement approuvé pour l'usage clinique. Les agents thérapeutiques libérés sont majoritairement des agents de chimiothérapie (doxorubicine) ciblant les cellules tumorales selon des mécanismes « classiques ».

BIBLIOGRAPHIE

- Adams GP & Weiner LM (2005). Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* **23**, 1147–1157.
- Adumeau L, Genevois C, Roudier L, Schatz C, Couillaud F & Mornet S (2017). Impact of surface grafting density of PEG macromolecules on dually fluorescent silica nanoparticles used for the in vivo imaging of subcutaneous tumors. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj* **1861**, 1587–1596.
- Affram K, Udofot O, Cat A & Agyare E (2015). In vitro and in vivo antitumor activity of gemcitabine loaded thermosensitive liposomal nanoparticles and mild hyperthermia in pancreatic cancer. *Int J Adv Res* **3**, 859–874.
- Almåsbaek H, Aarvak T & Vemuri MC (2016). CAR T Cell Therapy: A Game Changer in Cancer Treatment. *J Immunol Res*; DOI: 10.1155/2016/5474602.
- Anon (2005). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *The Lancet* **365**, 1687–1717.
- Aoki H, Kakinuma K, Morita K, Kato M, Uzuka T, Igor G, Takahashi H & Tanaka R (2004). Therapeutic efficacy of targeting chemotherapy using local hyperthermia and thermosensitive liposome: evaluation of drug distribution in a rat glioma model. *Int J Hyperthermia* **20**, 595–605.
- Arbab AS, Yocum GT, Kalish H, Jordan EK, Anderson SA, Khakoo AY, Read EJ & Frank JA (2004). Efficient magnetic cell labeling with protamine sulfate complexed to ferumoxides for cellular MRI. *Blood* **104**, 1217–1223.
- Avedian RS, Gold G, Ghanouni P & Pauly KB (2011). Magnetic resonance guided high-intensity focused ultrasound ablation of musculoskeletal tumors. *Curr Orthop Pract* **22**, 303–308.
- Bajwa R, Cheema A, Khan T, Amirpour A, Paul A, Chaughtai S, Patel S, Patel T, Bramson J, Gupta V, Levitt M, Asif A & Hossain MA (2019). Adverse Effects of Immune Checkpoint Inhibitors (Programmed Death-1 Inhibitors and Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein-4 Inhibitors): Results of a Retrospective Study. *J Clin Med Res* **11**, 225–236.
- Bechara Chérine & Sagan Sandrine (2013). Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Lett* **587**, 1693–1702.
- Bertrand N, Wu J, Xu X, Kamaly N & Farokhzad OC (2014). Cancer Nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv Drug Deliv Rev* **66**, 2–25.
- Bojanac AK, Rogosic S, Sincic N, Juric-Lekic G, Vlahovic M, Serman L, Jezek D & Bulic-Jakus F (2018). Influence of hyperthermal regimes on experimental teratoma development in vitro. *Int J Exp Pathol* **99**, 131–144.

- Brezovich I (1988). Low frequency hyperthermia: Capacitive and ferromagnetic thermoseed methods. *Med Phys Monogr* **16**, 82–111.
- Brunello F, Veltri A, Carucci P, Pagano E, Ciccone G, Moretto P, Sacchetto P, Gandini G & Rizzetto M (2008). Radiofrequency ablation versus ethanol injection for early hepatocellular carcinoma: A randomized controlled trial. *Scand J Gastroenterol* **43**, 727–735.
- Calderwood SK (2018). Heat shock proteins and cancer: intracellular chaperones or extracellular signalling ligands? *Phil Trans R Soc B* **373**, 20160524.
- Caruntu D, Caruntu G, Chen Y, O'Connor CJ, Goloverda G & Kolesnichenko VL (2004). Synthesis of Variable-Sized Nanocrystals of Fe₃O₄ with High Surface Reactivity. *Chem Mater* **16**, 5527–5534.
- Cash BD, Johnston LR & Johnston MH (2007). Cryospray ablation (CSA) in the palliative treatment of squamous cell carcinoma of the esophagus. *World J Surg Oncol* **5**, 34.
- Chaffer CL & Weinberg RA (2011). A Perspective on Cancer Cell Metastasis. *Science* **331**, 1559–1564.
- Chang JW, Min B-K, Kim B-S, Chang WS & Lee Y-H (2015a). Neurophysiologic Correlates of Sonication Treatment in Patients with Essential Tremor. *Ultrasound Med Biol* **41**, 124–131.
- Chang WS, Jung HH, Kweon EJ, Zadicario E, Rachmilevitch I & Chang JW (2015b). Unilateral magnetic resonance guided focused ultrasound thalamotomy for essential tremor: practices and clinicoradiological outcomes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **86**, 257–264.
- Chen K, Zhu S, Xiang G, Duan X, He J & Chen G (2016). Ablation effects of noninvasive radiofrequency field-induced hyperthermia on liver cancer cells. *Saudi Pharm J SPJ* **24**, 329–332.
- Chifman J, Laubenbacher R & Torti SV (2014). A Systems Biology Approach to Iron Metabolism. *Adv Exp Med Biol* **844**, 201–225.
- Chin JL, Billia M, Relle J, Roethke MC, Popeneciu IV, Kuru TH, Hatiboglu G, Mueller-Wolf MB, Motsch J, Romagnoli C, Kassam Z, Harle CC, Hafron J, Nandalur KR, Chronik BA, Burtnyk M, Schlemmer H-P & Pahernik S (2016). Magnetic Resonance Imaging–Guided Transurethral Ultrasound Ablation of Prostate Tissue in Patients with Localized Prostate Cancer: A Prospective Phase 1 Clinical Trial. *Eur Urol* **70**, 447–455.
- Christians E, Champion E, Thompson EM & Renard JP (1995). Expression of the HSP 70.1 gene, a landmark of early zygotic activity in the mouse embryo, is restricted to the first burst of transcription. *Development* **121**, 113–122.
- Ciocca DR & Calderwood SK (2005). Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications. *Cell Stress Chaperones* **10**, 86–103.

- Cirri P & Chiarugi P (2012). Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: a diabolic liaison driving cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* **31**, 195–208.
- Clerc P, Jeanjean P, Hallalli N, Gougeon M, Pipy B, Carrey J, Fourmy D & Gigoux V (2018). Targeted Magnetic Intra-Lysosomal Hyperthermia produces lysosomal reactive oxygen species and causes Caspase-1 dependent cell death. *J Controlled Release* **270**, 120–134.
- Close DM, Xu T, Sayler GS & Ripp S (2011). In Vivo Bioluminescent Imaging (BLI): Noninvasive Visualization and Interrogation of Biological Processes in Living Animals. *Sensors* **11**, 180–206.
- Cooper IS & Lee AS (1961). Cryostatic congelation: a system for producing a limited, controlled region of cooling or freezing of biologic tissues. *J Nerv Ment Dis* **133**, 259–263.
- Cornelis F, Havez M, Lippa N, Al-Ammari S, Verdier D, Carteret T, Amoretti N, Gangi A, Palussiere J, Hauger O & Grenier N (2013). Radiologically guided percutaneous cryotherapy for soft tissue tumours: A promising treatment. *Diagn Interv Imaging* **94**, 364–370.
- Crocetti L, de Baere T & Lencioni R (2010). Quality Improvement Guidelines for Radiofrequency Ablation of Liver Tumours. *Cardiovasc Intervent Radiol* **33**, 11–17.
- Currie S, Hoggard N, Craven IJ, Hadjivassiliou M & Wilkinson ID (2013). Understanding MRI: basic MR physics for physicians. *Postgrad Med J* **89**, 209–223.
- Danhier F (2016). To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? *J Controlled Release* **244**, 108–121.
- Datta NR, Grobholz R, Puric E, Bode-Lesniewska B, Lomax N, Khan S, Gaipf US, Fuchs B & Bodis S (2015a). Enhanced tumour regression in a patient of liposarcoma treated with radiotherapy and hyperthermia: Hint for dynamic immunomodulation by hyperthermia. *Int J Hyperthermia* **31**, 574–577.
- Datta NR, Ordóñez SG, Gaipf US, Paulides MM, Crezee H, Gellermann J, Marder D, Puric E & Bodis S (2015b). Local hyperthermia combined with radiotherapy and/or chemotherapy: Recent advances and promises for the future. *Cancer Treat Rev* **41**, 742–753.
- Dawood S, Austin L & Cristofanilli M (2014). Cancer stem cells: implications for cancer therapy. *Oncol Williston Park N* **28**, 1101–1107, 1110.
- Deckers R, Debeissat C, Fortin P-Y, Moonen CTW & Couillaud F (2012). Arrhenius analysis of the relationship between hyperthermia and Hsp70 promoter activation: A comparison between ex vivo and in vivo data. *Int J Hyperthermia* **28**, 441–450.
- Deckers R, Quesson B, Arsaut J, Eimer S, Couillaud F & Moonen CTW (2009). Image-guided, noninvasive, spatiotemporal control of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 1175–1180.

- Domenech M, Marrero-Berrios I, Torres-Lugo M & Rinaldi C (2013). Lysosomal Membrane Permeabilization by Targeted Magnetic Nanoparticles in Alternating Magnetic Fields. *ACS Nano* **7**, 5091–5101.
- Dou J, Liang P & Yu J (2016). Microwave ablation for liver tumors. *Abdom Radiol* **41**, 650–658.
- Druker BJ et al. (2006). Five-Year Follow-up of Patients Receiving Imatinib for Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* **355**, 2408–2417.
- Duan X & Li Y (2013). Physicochemical Characteristics of Nanoparticles Affect Circulation, Biodistribution, Cellular Internalization, and Trafficking. *Small* **9**, 1521–1532.
- Dumot JA, Vargo JJ, Falk GW, Frey L, Lopez R & Rice TW (2009). An open-label, prospective trial of cryospray ablation for Barrett’s esophagus high-grade dysplasia and early esophageal cancer in high-risk patients. *Gastrointest Endosc* **70**, 635–644.
- Eker OF, Quesson B, Rome C, Arsaut J, Deminière C, Moonen CT, Grenier N & Couillaud F (2011). Combination of Cell Delivery and Thermoinducible Transcription for in Vivo Spatiotemporal Control of Gene Expression: A Feasibility Study. *Radiology* **258**, 496–504.
- El Hajj Diab D, Clerc P, Serhan N, Fourmy D & Gigoux V (2018). Combined Treatments of Magnetic Intra-Lysosomal Hyperthermia with Doxorubicin Promotes Synergistic Anti-Tumoral Activity. *Nanomaterials* **8**, 468.
- Ellis S, Rieke V, Kohi M & Westphalen AC (2013). Clinical applications for magnetic resonance guided high intensity focused ultrasound (MRgHIFU): Present and future. *J Med Imaging Radiat Oncol* **57**, 391–399.
- England CG, Ehlerding EB & Cai W (2016). NanoLuc: A Small Luciferase Is Brightening Up the Field of Bioluminescence. *Bioconjug Chem* **27**, 1175–1187.
- Farr N, Wang Y-N, D’Andrea S, Starr F, Partanen A, Gravelle KM, McCune JS, Risler LJ, Whang SG, Chang A, Hingorani SR, Lee D & Hwang JH (2017). Hyperthermia-enhanced targeted drug delivery using magnetic resonance-guided focussed ultrasound: a pre-clinical study in a genetic model of pancreatic cancer. *Int J Hyperthermia* **0**, 1–8.
- Fiévet F, Ammar-Merah S, Brayner R, Chau F, Giraud M, Mammeri F, Peron J, Piquemal J-Y, Sicard L & Viau G (2018). The polyol process: a unique method for easy access to metal nanoparticles with tailored sizes, shapes and compositions. *Chem Soc Rev* **47**, 5187–5233.
- Fortin P-Y, Genevois C, Koenig A, Heinrich E, Texier I & Couillaud F (2012). Detection of brain tumors using fluorescence diffuse optical tomography and nanoparticles as contrast agents. *J Biomed Opt* **17**, 126004.
- Fortin P-Y, Lepetit-Coiffé M, Genevois C, Debeissat C, Quesson B, Moonen CTW, Konsman JP & Couillaud F (2015). Spatiotemporal control of gene expression in bone-marrow derived cells of the tumor microenvironment induced by MRI guided focused ultrasound. *Oncotarget* **6**, 23417–23426.

- Frazier N, Payne A, de Bever J, Dillon C, Panda A, Subrahmanyam N & Ghandehari H (2016). High intensity focused ultrasound hyperthermia for enhanced macromolecular delivery. *J Controlled Release* **241**, 186–193.
- Frazier N, Payne A, Dillon C, Subrahmanyam N & Ghandehari H (2017). Enhanced Efficacy of Combination Heat Shock Targeted Polymer Therapeutics with High Intensity Focused Ultrasound. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med* **13**, 1235–1243.
- Fukuda K, Kobayashi A & Watabe K (2012). The role of tumor-associated macrophage in tumor progression. *Front Biosci Sch Ed* **4**, 787–798.
- Garanger E, MacEwan SR, Sandre O, Brûlet A, Bataille L, Chilkoti A & Lecommandoux S (2015). Structural Evolution of a Stimulus-Responsive Diblock Polypeptide Micelle by Temperature Tunable Compaction of its Core. ; DOI: 10.1021/acs.macromol.5b01371. Available at: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.macromol.5b01371> [Accessed April 16, 2018].
- Gas P (2017). Essential Facts on the History of Hyperthermia and their Connections with Electromedicine. *ArXiv171000652 Phys Q-Bio*. Available at: <http://arxiv.org/abs/1710.00652> [Accessed May 2, 2019].
- Gavilán H et al. (2017). Colloidal Flower-Shaped Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis Strategies and Coatings. *Part Part Syst Charact* **34**, 1700094.
- Gilchrist RK, Medal R, Shorey WD, Hanselman RC, Parrott JC & Taylor CB (1957). Selective Inductive Heating of Lymph Nodes. *Ann Surg* **146**, 596–606.
- Glazer ES & Curley SA (2011). The Ongoing History of Thermal Therapy for Cancer. *Surg Oncol Clin N Am* **20**, 229–235.
- Gleich B & Weizenecker J (2005). Tomographic imaging using the nonlinear response of magnetic particles. *Nature* **435**, 1214–1217.
- Graves EE, Weissleder R & Ntziachristos V (2004). Fluorescence molecular imaging of small animal tumor models. *Curr Mol Med* **4**, 419–430.
- Greenwald BD, Dumot JA, Abrams JA, Lightdale CJ, David DS, Nishioka NS, Yachimski P, Johnston MH, Shaheen NJ, Zfass AM, Smith JO, Gill KRS, Burdick JS, Mallat D & Wolfsen HC (2010). Endoscopic spray cryotherapy for esophageal cancer: safety and efficacy. *Gastrointest Endosc* **71**, 686–693.
- Grenier N, Trillaud H, Palussière J, Mougnot C, Quesson B, Senneville BD de & Moonen C (2008). Thérapies par ultrasons focalisés. *Datarevues02210363008811-C21787*. Available at: <https://www.em-consulte.com/en/article/133319> [Accessed July 16, 2019].
- Grivennikov SI, Greten FR & Karin M (2010). Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* **140**, 883–899.

- Grüll H & Langereis S (2012). Hyperthermia-triggered drug delivery from temperature-sensitive liposomes using MRI-guided high intensity focused ultrasound. *J Controlled Release* **161**, 317–327.
- Guilhon E, Voisin P, de Zwart JA, Quesson B, Salomir R, Maurange C, Bouchaud V, Smirnov P, de Verneuil H, Vekris A, Canioni P & Moonen CTW (2003). Spatial and temporal control of transgene expression in vivo using a heat-sensitive promoter and MRI-guided focused ultrasound. *J Gene Med* **5**, 333–342.
- Guisasola E, Asín L, Beola L, de la Fuente JM, Baeza A & Vallet-Regí M (2018). Beyond Traditional Hyperthermia: In Vivo Cancer Treatment with Magnetic-Responsive Mesoporous Silica Nanocarriers. *ACS Appl Mater Interfaces*; DOI: 10.1021/acsami.8b02398.
- Haar G ter & Coussios C (2007). High Intensity Focused Ultrasound: Past, present and future. *Int J Hyperthermia* **23**, 85–87.
- Hanahan D & Weinberg RA (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674.
- Harari CM, Magagna M, Bedoya M, Lee FT, Lubner MG, Hinshaw JL, Ziemlewicz T & Brace CL (2015). Microwave Ablation: Comparison of Simultaneous and Sequential Activation of Multiple Antennas in Liver Model Systems. *Radiology* **278**, 95–103.
- Hemery G, Genevois C, Couillaud F, Lacomme S, Gontier E, Ibarboure E, Lecommandoux S, Garanger E & Sandre O (2017a). Monocore vs. multicore magnetic iron oxide nanoparticles: uptake by glioblastoma cells and efficiency for magnetic hyperthermia. *Mol Syst Des Eng* **2**, 629–639.
- Hemery G, Keyes AC, Garaio E, Rodrigo I, Garcia JA, Plazaola F, Garanger E & Sandre O (2017b). Tuning Sizes, Morphologies, and Magnetic Properties of Monocore Versus Multicore Iron Oxide Nanoparticles through the Controlled Addition of Water in the Polyol Synthesis. *Inorg Chem* **56**, 8232–8243.
- Hergt R & Dutz S (2007). Magnetic particle hyperthermia—biophysical limitations of a visionary tumour therapy. *J Magn Magn Mater* **311**, 187–192.
- Hida K, Maishi N, Annan DA & Hida Y (2018). Contribution of Tumor Endothelial Cells in Cancer Progression. *Int J Mol Sci*; DOI: 10.3390/ijms19051272.
- Hijnen N, Kneepkens E, Smet M de, Langereis S, Heijman E & Grüll H (2017). Thermal combination therapies for local drug delivery by magnetic resonance-guided high-intensity focused ultrasound. *Proc Natl Acad Sci* **114**, E4802–E4811.
- Hildebrandt B, Wust P, Ahlers O, Dieing A, Sreenivasa G, Kerner T, Felix R & Riess H (2002). The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit Rev Oncol Hematol* **43**, 33–56.
- Hilger I (2013). In vivo applications of magnetic nanoparticle hyperthermia. *Int J Hyperthermia* **29**, 828–834.

- Hirata E & Sahai E (2017). Tumor Microenvironment and Differential Responses to Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med* **7**, a026781.
- Hodi FS et al. (2010). Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N Engl J Med* **363**, 711–723.
- Hojjat-Farsangi M (2014). Small-Molecule Inhibitors of the Receptor Tyrosine Kinases: Promising Tools for Targeted Cancer Therapies. *Int J Mol Sci* **15**, 13768–13801.
- Hsiao Y-H, Kuo S-J, Tsai H-D, Chou M-C & Yeh G-P (2016). Clinical Application of High-intensity Focused Ultrasound in Cancer Therapy. *J Cancer* **7**, 225–231.
- Hugounenq P, Levy M, Alloyeau D, Lartigue L, Dubois E, Cabuil V, Ricolleau C, Roux S, Wilhelm C, Gazeau F & Bazzi R (2012). Iron Oxide Monocrystalline Nanoflowers for Highly Efficient Magnetic Hyperthermia. *J Phys Chem C* **116**, 15702–15712.
- Ikwegbue PC, Masamba P, Oyinloye BE & Kappo AP (2017). Roles of Heat Shock Proteins in Apoptosis, Oxidative Stress, Human Inflammatory Diseases, and Cancer. *Pharmaceuticals* **11**, 2.
- Izadifar Z, Babyn P & Chapman D (2017). Mechanical and Biological Effects of Ultrasound: A Review of Present Knowledge. *Ultrasound Med Biol* **43**, 1085–1104.
- Janati Esfahani A, Mahdavi SR, Shiran MB & Khoei S (2017). The Role of Radiofrequency Hyperthermia in The Radiosensitization of A Human Prostate Cancer Cell Line. *Cell J Yakhteh* **19**, 86–95.
- Javed Y, Lartigue L, Hugounenq P, Vuong QL, Gossuin Y, Bazzi R, Wilhelm C, Ricolleau C, Gazeau F & Alloyeau D (2014). Biodegradation Mechanisms of Iron Oxide Monocrystalline Nanoflowers and Tunable Shield Effect of Gold Coating. *Small* **10**, 3325–3337.
- Johannsen M, Gneveckow U, Eckelt L, Feussner A, Waldöfner N, Scholz R, Deger S, Wust P, Loening SA & Jordan A (2005). Clinical hyperthermia of prostate cancer using magnetic nanoparticles: presentation of a new interstitial technique. *Int J Hyperth Off J Eur Soc Hyperthermic Oncol North Am Hyperth Group* **21**, 637–647.
- Johannsen M, Gneveckow U, Taymoorian K, Thiesen B, Waldöfner N, Scholz R, Jung K, Jordan A, Wust P & Loening SA (2007a). Morbidity and quality of life during thermotherapy using magnetic nanoparticles in locally recurrent prostate cancer: Results of a prospective phase I trial. *Int J Hyperthermia* **23**, 315–323.
- Johannsen M, Gneveckow U, Thiesen B, Taymoorian K, Cho CH, Waldöfner N, Scholz R, Jordan A, Loening SA, Wust P & Hurwitz M (2007b). Thermotherapy of Prostate Cancer Using Magnetic Nanoparticles: Feasibility, Imaging, and Three-Dimensional Temperature Distribution. *Eur Urol* **52**, 1653–1662.
- Joo WD, Visintin I & Mor G (2013). Targeted cancer therapy – Are the days of systemic chemotherapy numbered? *Maturitas* **76**, 308–314.

- Juang T, Stauffer PR, Craciunescu OA, Maccarini PF, Yuan Y, Das SK, Dewhirst MW, Inman BA & Vujaskovic Z (2014). Thermal dosimetry characteristics of deep regional heating of non-muscle invasive bladder cancer. *Int J Hyperthermia* **30**, 176–183.
- June CH, O'Connor RS, Kawalekar OU, Ghassemi S & Milone MC (2018). CAR T cell immunotherapy for human cancer. *Science* **359**, 1361–1365.
- Junttila MR & de Sauvage FJ (2013). Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature* **501**, 346–354.
- Kafina MD & Paw BH (2017). Intracellular iron and heme trafficking and metabolism in developing erythroblasts. *Metallomics* **9**, 1193–1203.
- Kashima M, Yamakado K, Takaki H, Kodama H, Yamada T, Uraki J & Nakatsuka A (2011). Complications After 1000 Lung Radiofrequency Ablation Sessions in 420 Patients: A Single Center's Experiences. *Am J Roentgenol* **197**, W576–W580.
- Kennedy JE (2005). High-intensity focused ultrasound in the treatment of solid tumours. *Nat Rev Cancer* **5**, 321.
- Kolosnjaj-Tabi J, Di Corato R, Lartigue L, Marangon I, Guardia P, Silva AKA, Luciani N, Clément O, Flaud P, Singh JV, Decuzzi P, Pellegrino T, Wilhelm C & Gazeau F (2014). Heat-Generating Iron Oxide Nanocubes: Subtle “Destructurators” of the Tumoral Microenvironment. *ACS Nano* **8**, 4268–4283.
- Kolosnjaj-Tabi J, Javed Y, Lartigue L, Volatron J, Elgrabli D, Marangon I, Pugliese G, Caron B, Figuerola A, Luciani N, Pellegrino T, Alloyeau D & Gazeau F (2015). The One Year Fate of Iron Oxide Coated Gold Nanoparticles in Mice. *ACS Nano* **9**, 7925–7939.
- Koppolu V & Rekha Vasigala VK (2018). Checkpoint immunotherapy by nivolumab for treatment of metastatic melanoma. *J Cancer Res Ther* **14**, 1167–1175.
- Kostopoulou A, Brintakis K, Fragogeorgi E, Anthousi A, Manna L, Begin-Colin S, Billotey C, Ranella A, Loudos G, Athanassakis I & Lappas A (2018). Iron Oxide Colloidal Nanoclusters as Theranostic Vehicles and Their Interactions at the Cellular Level. *Nanomaterials* **8**, 315.
- Kostopoulou A, Brintakis K, Vasilakaki M, Trohidou KN, Douvalis AP, Lascialfari A, Manna L & Lappas A (2014). Assembly-mediated interplay of dipolar interactions and surface spin disorder in colloidal maghemite nanoclusters. *Nanoscale* **6**, 3764–3776.
- Kregel KC (2002). Invited Review: Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol* **92**, 2177–2186.
- Kremkau FW (1979). Cancer therapy with ultrasound: A historical review. *J Clin Ultrasound* **7**, 287–300.
- Kubista B, Trieb K, Blahovec H, Kotz R & Micksche M (2002). Hyperthermia increases the susceptibility of chondro- and osteosarcoma cells to natural killer cell-mediated lysis. *Anticancer Res* **22**, 789–792.

- Kwok G, Yau TCC, Chiu JW, Tse E & Kwong Y-L (2016). Pembrolizumab (Keytruda). *Hum Vaccines Immunother* **12**, 2777–2789.
- Lakshmi Narendra B, Eshvendar Reddy K, Shantikumar S & Ramakrishna S (2013). Immune system: a double-edged sword in cancer. *Inflamm Res* **62**, 823–834.
- Lamers CHJ, Sleijfer S, Vulto AG, Kruit WHJ, Kliffen M, Debets R, Gratama JW, Stoter G & Oosterwijk E (2006). Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma With Autologous T-Lymphocytes Genetically Retargeted Against Carbonic Anhydrase IX: First Clinical Experience. *J Clin Oncol* **24**, e20–e22.
- Lartigue L, Hugounenq P, Alloyeau D, Clarke SP, Lévy M, Bacri J-C, Bazzi R, Brougham DF, Wilhelm C & Gazeau F (2012). Cooperative Organization in Iron Oxide Multi-Core Nanoparticles Potentiates Their Efficiency as Heating Mediators and MRI Contrast Agents. *ACS Nano* **6**, 10935–10949.
- Leahy AB, Elgarten CW, Grupp SA, Maude SL & Teachey DT (2018). Tisagenlecleucel for the treatment of B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther* **18**, 959–971.
- Lian H, Yang R, Lin T, Wang W, Zhang G & Guo H (2016). Salvage cryotherapy with third-generation technology for locally recurrent prostate cancer after radiation therapy. *Int Urol Nephrol* **48**, 1461–1466.
- Liberman B, Gianfelice D, Inbar Y, Beck A, Rabin T, Shabshin N, Chander G, Hengst S, Pfeffer R, Chechick A, Hanannel A, Dogadkin O & Catane R (2009). Pain Palliation in Patients with Bone Metastases Using MR-Guided Focused Ultrasound Surgery: A Multicenter Study. *Ann Surg Oncol* **16**, 140–146.
- Lin S-M, Lin C-J, Lin C-C, Hsu C-W & Chen Y-C (2004). Radiofrequency ablation improves prognosis compared with ethanol injection for hepatocellular carcinoma ≤ 4 cm. *Gastroenterology* **127**, 1714–1723.
- Lin S-M, Lin C-J, Lin C-C, Hsu C-W & Chen Y-C (2005). Randomised controlled trial comparing percutaneous radiofrequency thermal ablation, percutaneous ethanol injection, and percutaneous acetic acid injection to treat hepatocellular carcinoma of 3 cm or less. *Gut* **54**, 1151–1156.
- Lyon PC, Griffiths LF, Lee J, Chung D, Carlisle R, Wu F, Middleton MR, Gleeson FV & Coussios CC (2017). Clinical trial protocol for TARDOX: a phase I study to investigate the feasibility of targeted release of lyso-thermosensitive liposomal doxorubicin (ThermoDox®) using focused ultrasound in patients with liver tumours. *J Ther Ultrasound* **5**, 28.
- Maemondo M et al. (2010). Gefitinib or Chemotherapy for Non-Small-Cell Lung Cancer with Mutated EGFR. *N Engl J Med* **362**, 2380–2388.
- Magee MS & Snook A (2014). Challenges to Chimeric Antigen Receptor (CAR)-T Cell Therapy for Cancer. *Discov Med* **18**, 265–271.

- Maier-Hauff K, Rothe R, Scholz R, Gneveckow U, Wust P, Thiesen B, Feussner A, Deimling A von, Waldoefner N, Felix R & Jordan A (2007). Intracranial Thermotherapy using Magnetic Nanoparticles Combined with External Beam Radiotherapy: Results of a Feasibility Study on Patients with Glioblastoma Multiforme. *J Neurooncol* **81**, 53–60.
- Maier-Hauff K, Ulrich F, Nestler D, Niehoff H, Wust P, Thiesen B, Orawa H, Budach V & Jordan A (2011). Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *J Neurooncol* **103**, 317–324.
- Matsumoto Y, Nichols JW, Toh K, Nomoto T, Cabral H, Miura Y, Christie RJ, Yamada N, Ogura T, Kano MR, Matsumura Y, Nishiyama N, Yamasoba T, Bae YH & Kataoka K (2016). Vascular bursts enhance permeability of tumour blood vessels and improve nanoparticle delivery. *Nat Nanotechnol* **11**, 533–538.
- Mazuel F, Espinosa A, Radtke G, Bugnet M, Neveu S, Lalatonne Y, Botton GA, Abou-Hassan A & Wilhelm C (2017). Magneto-Thermal Metrics Can Mirror the Long-Term Intracellular Fate of Magneto-Plasmonic Nanohybrids and Reveal the Remarkable Shielding Effect of Gold. *Adv Funct Mater* **27**, 1605997.
- Meloni M, Chiang J, Laeseke P, Dietrich C, Sannino A, Solbiati M, Nocerino E, Brace C & Lee F (2017). MICROWAVE ABLATION IN PRIMARY AND SECONDARY LIVER TUMORS: TECHNICAL AND CLINICAL APPROACHES. *Int J Hypertherm Off J Eur Soc Hyperthermic Oncol North Am Hypertherm Group* **33**, 15–24.
- Mensel B, Weigel C & Hosten N (2006). Laser-Induced Thermotherapy. In *Minimally Invasive Tumor Therapies*, ed. Stroszczyński C, Recent Results in Cancer Research, pp. 69–75. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. Available at: https://doi.org/10.1007/3-540-28137-1_5 [Accessed July 31, 2019].
- Mertz D, Sandre O & Bégin-Colin S (2017). Drug releasing nanoplatforms activated by alternating magnetic fields. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj* **1861**, 1617–1641.
- Mezquita L & Planchard D (2018). Durvalumab for the treatment of non-small cell lung cancer. *Expert Rev Respir Med* **12**, 627–639.
- Mikkilineni L & Kochenderfer JN (2017). Chimeric antigen receptor T-cell therapies for multiple myeloma. *Blood* **130**, 2594–2602.
- Miura Y & Horie S (2019). The role of hormone therapy and chemotherapy in oligometastatic prostate cancer. *ESMO Open*; DOI: 10.1136/esmoopen-2018-000471.
- Moonen CTW (2007). Spatio-Temporal Control of Gene Expression and Cancer Treatment Using Magnetic Resonance Imaging–Guided Focused Ultrasound. *Clin Cancer Res* **13**, 3482–3489.
- Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM & Rosenberg SA (2010). Case Report of a Serious Adverse Event Following the Administration of T Cells Transduced With a Chimeric Antigen Receptor Recognizing ERBB2. *Mol Ther* **18**, 843–851.

- Morimoto RI (1998). Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* **12**, 3788–3796.
- Moros M, Ambrosone A, Stepien G, Fabozzi F, Marchesano V, Castaldi A, Tino A, de la Fuente JM & Tortiglione C (2015). Deciphering intracellular events triggered by mild magnetic hyperthermia in vitro and in vivo. *Nanomed* **10**, 2167–2183.
- Nadobny J, Klopffleisch R, Brinker G & Stoltenburg-Didinger G (2015). Experimental investigation and histopathological identification of acute thermal damage in skeletal porcine muscle in relation to whole-body SAR, maximum temperature, and CEM43 °C due to RF irradiation in an MR body coil of birdcage type at 123 MHz. *Int J Hyperthermia* **31**, 409–420.
- Napoli A, Anzidei M, Ciolina F, Marotta E, Cavallo Marincola B, Brachetti G, Di Mare L, Cartocci G, Boni F, Noce V, Bertaccini L & Catalano C (2013a). MR-Guided High-Intensity Focused Ultrasound: Current Status of an Emerging Technology. *Cardiovasc Intervent Radiol* **36**, 1190–1203.
- Napoli A, Anzidei M, Nunzio CD, Cartocci G, Panebianco V, Dominicis CD, Catalano C, Petrucci F & Leonardo C (2013b). Real-time Magnetic Resonance-guided High-intensity Focused Ultrasound Focal Therapy for Localised Prostate Cancer: Preliminary Experience. *Eur Urol* **63**, 395–398.
- Nassar D & Blanpain C (2016). Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. *Annu Rev Pathol Mech Dis* **11**, 47–76.
- Natfji AA, Ravishankar D, Osborn HMI & Greco F (2017). Parameters Affecting the Enhanced Permeability and Retention Effect: The Need for Patient Selection. *J Pharm Sci* **106**, 3179–3187.
- Natividad E, Castro M, Goglio G, Andreu I, Epherre R, Duguet E & Mediano A (2012). New insights into the heating mechanisms and self-regulating abilities of manganese perovskite nanoparticles suitable for magnetic fluid hyperthermia. *Nanoscale* **4**, 3954–3962.
- Neelapu SS et al. (2017). Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1707447>; DOI: 10.1056/NEJMoa1707447. Available at: https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1707447?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dwww.ncbi.nlm.nih.gov [Accessed October 17, 2019].
- Ngoune R, Peters A, von Elverfeldt D, Winkler K & Pütz G (2016). Accumulating nanoparticles by EPR: A route of no return. *J Controlled Release* **238**, 58–70.
- Ni W, Chen W & Lu Y (2018). Emerging findings into molecular mechanism of brain metastasis. *Cancer Med* **7**, 3820–3833.

- Norton K-A, Gong C, Jamalian S & Popel AS (2019). Multiscale Agent-Based and Hybrid Modeling of the Tumor Immune Microenvironment. *Process Basel Switz*; DOI: 10.3390/pr7010037.
- Oldham RK & Dillman RO (2016). Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy: 25 Years of Progress. *J Clin Oncol*; DOI: 10.1200/JCO.2007.15.7438.
- Ortega D & Pankhurst QA (2012). Magnetic hyperthermia. In *Nanoscience*, pp. 60–88. Available at: <http://pubs.rsc.org/en/content/chapter/bk9781849734356-00060/978-1-84973-435-6> [Accessed January 29, 2018].
- Owens DE & Peppas NA (2006). Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm* **307**, 93–102.
- Paley MA & Prescher JA (2014). Bioluminescence: a versatile technique for imaging cellular and molecular features. *MedChemComm* **5**, 255–267.
- Palussière J, Catena V, Gaubert J-Y, Buy X & de Baere T (2017). Thermo-ablation pulmonaire percutanée. *Bull Cancer (Paris)* **104**, 417–422.
- Pardoll DM (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* **12**, 252–264.
- Partanen A, Yarmolenko PS, Viitala A, Appanaboyina S, Haemmerich D, Ranjan A, Jacobs G, Woods D, Enholm J, Wood BJ & Dreher MR (2012). Mild hyperthermia with magnetic resonance-guided high-intensity focused ultrasound for applications in drug delivery. *Int J Hyperthermia* **28**, 320–336.
- Pérido EA, Hemery G, Sandre O, Ortega D, Garaio E, Plazaola F & Teran FJ (2015). Fundamentals and advances in magnetic hyperthermia. *Appl Phys Rev* **2**, 041302.
- Pinel K, Genevois C, Debeissat C & Couillaud F (2018). Imaging of conditional gene silencing in vivo using a bioluminescence-based method with thermo-inducible microRNAs. *Sci Rep* **8**, 1–7.
- Postow MA, Callahan MK & Wolchok JD (2015). Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J Clin Oncol* **33**, 1974–1982.
- Prabhakar U, Maeda H, Jain RK, Sevick-Muraca EM, Zamboni W, Farokhzad OC, Barry ST, Gabizon A, Grodzinski P & Blakey DC (2013). Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention (EPR) effect for nanomedicine drug delivery in oncology. *Cancer Res* **73**, 2412–2417.
- Pronzato P & Rondini M (2005). Hormonotherapy of advanced prostate cancer. *Ann Oncol* **16**, iv80–iv84.
- Rad AM, Janic B, Iskander A, Soltanian-Zadeh H & Arbab AS (2007). Measurement of quantity of iron in magnetically labeled cells: comparison among different UV/VIS spectrometric methods. *BioTechniques* **43**, 627–636.
- Ranjan A, Jacobs G, Woods DL, Negussie AH, Partanen A, Yarmolenko PS, Gacchina CE, Sharma KV, Frenkel V, Wood BJ & Dreher MR (2012). Image-guided drug delivery

- with magnetic resonance guided high intensity focused ultrasound and temperature sensitive liposomes in a rabbit Vx2 tumor model. *J Controlled Release* **158**, 487–494.
- Rehemtulla A, Stegman LD, Cardozo SJ, Gupta S, Hall DE, Contag CH & Ross BD (2000). Rapid and Quantitative Assessment of Cancer Treatment Response Using In Vivo Bioluminescence Imaging. *Neoplasia N Y N* **2**, 491–495.
- Reinhardt N, Adumeau L, Lambert O, Ravaine S & Mornet S (2015). Quaternary Ammonium Groups Exposed at the Surface of Silica Nanoparticles Suitable for DNA Complexation in the Presence of Cationic Lipids. *J Phys Chem B* **119**, 6401–6411.
- van Rhoon GC, Samaras T, Yarmolenko PS, Dewhurst MW, Neufeld E & Kuster N (2013). CEM43°C thermal dose thresholds: a potential guide for magnetic resonance radiofrequency exposure levels? *Eur Radiol* **23**, 2215–2227.
- Richard JP, Melikov K, Vives E, Ramos C, Verbeure B, Gait MJ, Chernomordik LV & Lebleu B (2003). Cell-penetrating Peptides A REEVALUATION OF THE MECHANISM OF CELLULAR UPTAKE. *J Biol Chem* **278**, 585–590.
- Ritossa F (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Experientia* **18**, 571–573.
- Robert C et al. (2011). Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1104621>; DOI: 10.1056/NEJMoa1104621. Available at: https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1104621?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dwww.ncbi.nlm.nih.gov [Accessed October 17, 2019].
- Rome C, Couillaud F & Moonen CTW (2005). Spatial and temporal control of expression of therapeutic genes using heat shock protein promoters. *Methods* **35**, 188–198.
- Röntgen WC (1898). Ueber eine neue Art von Strahlen. *Ann Phys* **300**, 12–17.
- de la Rosa X, Santalucía T, Fortin P-Y, Purroy J, Calvo M, Salas-Perdomo A, Justicia C, Couillaud F & Planas AM (2013). In vivo imaging of induction of heat-shock protein-70 gene expression with fluorescence reflectance imaging and intravital confocal microscopy following brain ischaemia in reporter mice. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **40**, 426–438.
- Roti JLR (2008). Cellular responses to hyperthermia (40–46°C): Cell killing and molecular events. *Int J Hyperthermia* **24**, 3–15.
- Rustagi T & Chhoda A (2017). Endoscopic Radiofrequency Ablation of the Pancreas. *Dig Dis Sci* **62**, 843–850.
- Ryan TP & Brace CL (2017). Interstitial microwave treatment for cancer: historical basis and current techniques in antenna design and performance. *Int J Hyperthermia* **33**, 3–14.
- Saccomandi P, Schena E, Giurazza F, Vescovo RD, Caponero MA, Mortato L, Panzera F, Cazzato RL, Grasso FR, Matteo FMD, Silvestri S & Zobel BB (2014). Temperature

- monitoring and lesion volume estimation during double-applicator laser-induced thermotherapy in ex vivo swine pancreas: a preliminary study. *Lasers Med Sci* **29**, 607–614.
- Salas G, Camarero J, Cabrera D, Takacs H, Varela M, Ludwig R, Dähring H, Hilger I, Miranda R, Morales M del P & Teran FJ (2014). Modulation of Magnetic Heating via Dipolar Magnetic Interactions in Monodisperse and Crystalline Iron Oxide Nanoparticles. *J Phys Chem C* **118**, 19985–19994.
- Sandre O, Genevois C, Garaio E, Adumeau L, Mornet S & Couillaud F (2017). In Vivo Imaging of Local Gene Expression Induced by Magnetic Hyperthermia. *Genes*; DOI: 10.3390/genes8020061.
- Santini FC & Rudin CM (2017). Atezolizumab for the treatment of non-small cell lung cancer. *Expert Rev Clin Pharmacol* **10**, 935–945.
- Sapareto SA & Dewey WC (1984). Thermal dose determination in cancer therapy. *Int J Radiat Oncol* **10**, 787–800.
- Scheen A (2009). Nomenclature internationale des différents types d'anticorps monoclonaux. *Rev Médicale Liège*. Available at: <https://orbi.uliege.be/handle/2268/23559> [Accessed October 16, 2019].
- Schena E, Saccomandi P & Fong Y (2017). Laser Ablation for Cancer: Past, Present and Future. *J Funct Biomater*; DOI: 10.3390/jfb8020019.
- Scott AM, Wolchok JD & Old LJ (2012). Antibody therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* **12**, 278–287.
- Shah TT, Ahmed H, Kanthabalan A, Lau B, Ghei M, Maraj B & Arya M (2014). Focal cryotherapy of localized prostate cancer: a systematic review of the literature. *Expert Rev Anticancer Ther* **14**, 1337–1347.
- Shiina S, Teratani T, Obi S, Sato S, Tateishi R, Fujishima T, Ishikawa T, Koike Y, Yoshida H, Kawabe T & Omata M (2005). A Randomized Controlled Trial of Radiofrequency Ablation With Ethanol Injection for Small Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* **129**, 122–130.
- Shirley M (2018). Avelumab: A Review in Metastatic Merkel Cell Carcinoma. *Target Oncol* **13**, 409–416.
- Simon CJ, Dupuy DE & Mayo-Smith WW (2005). Microwave Ablation: Principles and Applications. *RadioGraphics* **25**, S69–S83.
- Tay ZW, Chandrasekharan P, Chiu-Lam A, Hensley DW, Dhavalikar R, Zhou XY, Yu EY, Goodwill PW, Zheng B, Rinaldi C & Conolly SM (2018). Magnetic Particle Imaging-Guided Heating in Vivo Using Gradient Fields for Arbitrary Localization of Magnetic Hyperthermia Therapy. *ACS Nano*; DOI: 10.1021/acsnano.8b00893.
- Tempel N van den, Horsman MR & Kanaar R (2016). Improving efficacy of hyperthermia in oncology by exploiting biological mechanisms. *Int J Hyperthermia* **32**, 446–454.

- Theodorescu D (2004). Cancer Cryotherapy: Evolution and Biology. *Rev Urol* **6**, S9–S19.
- Thiburce AC, Frulio N, Hocquelet A, Maire F, Salut C, Balageas P, Bouzgarrou M, Hocké C & Trillaud H (2015). Magnetic resonance-guided high-intensity focused ultrasound for uterine fibroids: Mid-term outcomes of 36 patients treated with the Sonalleve system. *Int J Hyperthermia* **31**, 764–770.
- Titsworth WL, Murad GJA, Hoh BL & Rahman M (2014). Fighting Fire with Fire: The Revival of Thermotherapy for Gliomas. *Anticancer Res* **34**, 565–574.
- Topalian SL, Drake CG & Pardoll DM (2015). Immune Checkpoint Blockade: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy. *Cancer Cell* **27**, 450–461.
- Toraya-Brown S & Fiering S (2014). Local tumour hyperthermia as immunotherapy for metastatic cancer. *Int J Hyperthermia* **30**, 531–539.
- Tsai FC, Ghorbani S, Greenwald BD, Jang S, Dumot JA, McKinley MJ, Shaheen NJ, Habr F, Wolfsen HC, Abrams JA, Lightdale CJ, Nishioka NS, Johnston MH, Zfass A & Coyle WJ (2017). Safety and efficacy of endoscopic spray cryotherapy for esophageal cancer. *Dis Esophagus* **30**, 1–7.
- Vogl TJ, Nour-Eldin N-EA, Albrecht MH, Kaltenbach B, Hohenforst-Schmidt W, Lin H, Panahi B, Eichler K, Gruber-Rouh T & Roman A (2017a). Thermal Ablation of Lung Tumors: Focus on Microwave Ablation. *RöFo - Fortschritte Auf Dem Geb Röntgenstrahlen Bildgeb Verfahr* **189**, 828–843.
- Vogl TJ, Nour-Eldin N-EA, Hammerstingl RM, Panahi B & Naguib NNN (2017b). Microwave Ablation (MWA): Basics, Technique and Results in Primary and Metastatic Liver Neoplasms – Review Article. *RöFo - Fortschritte Auf Dem Geb Röntgenstrahlen Bildgeb Verfahr* **189**, 1055–1066.
- Voogt MJ, Trillaud H, Kim YS, Mali WPT, Barkhausen J, Bartels LW, Deckers R, Frulio N, Rhim H, Lim HK, Eckey T, Nieminen HJ, Mougenot C, Keserci B, Soini J, Vaara T, Köhler MO, Sokka S & van den Bosch MAAJ (2012). Volumetric feedback ablation of uterine fibroids using magnetic resonance-guided high intensity focused ultrasound therapy. *Eur Radiol* **22**, 411–417.
- Vuagnat P & Champiat S (2018). Immunothérapies anti-checkpoints : aspects fondamentaux. *MISE AU POINT*6.
- Wang P (2017). Evaluation of MR thermometry with proton resonance frequency method at 7T. *Quant Imaging Med Surg* **7**, 259–266.
- Wang Y, Wang Z-B & Xu Y-H (2018). Efficacy, Efficiency, and Safety of Magnetic Resonance-Guided High-Intensity Focused Ultrasound for Ablation of Uterine Fibroids: Comparison with Ultrasound-Guided Method. *Korean J Radiol* **19**, 724–732.
- Ward RC, Healey TT & Dupuy DE (2013). Microwave ablation devices for interventional oncology. *Expert Rev Med Devices* **10**, 225–238.

- Wei X, Jing L, Liu C, Hou Y, Jiao M & Gao M (2018). Molecular mechanisms for delicately tuning the morphology and properties of Fe₃O₄ nanoparticle clusters. *CrystEngComm* **20**, 2421–2429.
- Weissleder R & Pittet MJ (2008). Imaging in the era of molecular oncology. *Nature* **452**, 580–589.
- Wright AS, Lee FT & Mahvi DM (2003). Hepatic microwave ablation with multiple antennae results in synergistically larger zones of coagulation necrosis. *Ann Surg Oncol* **10**, 275–283.
- Wu P, Nielsen TE & Clausen MH (2015). FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends Pharmacol Sci* **36**, 422–439.
- Xia H, Gao X, Gu G, Liu Z, Zeng N, Hu Q, Song Q, Yao L, Pang Z, Jiang X, Chen J & Chen H (2011). Low molecular weight protamine-functionalized nanoparticles for drug delivery to the brain after intranasal administration. *Biomaterials* **32**, 9888–9898.
- Xie W, Gao Q, Guo Z, Wang D, Gao F, Wang X, Wei Y & Zhao L (2017). Injectable and Self-Healing Thermosensitive Magnetic Hydrogel for Asynchronous Control Release of Doxorubicin and Docetaxel to Treat Triple-Negative Breast Cancer. *ACS Appl Mater Interfaces* **9**, 33660–33673.
- Xing F, Saidou J & Watabe K (2010). Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Front Biosci J Virtual Libr* **15**, 166–179.
- Yang X, Ye X, Zhang L, Geng D, Du Z, Yu G, Ren H, Wang J, Huang G, Wei Z, Ni Y, Li W & Han X (2018). Microwave ablation for lung cancer patients with a single lung: Clinical evaluation of 11 cases. *Thorac Cancer*; DOI: 10.1111/1759-7714.12611.
- Yao Z, Zhang BS & Prescher JA (2018). Advances in bioluminescence imaging: New probes from old recipes. *Curr Opin Chem Biol* **45**, 148–156.
- Yarmolenko PS, Moon EJ, Landon C, Manzoor A, Hochman DW, Viglianti BL & Dewhirst MW (2011). Thresholds for thermal damage to normal tissues: An update. *Int J Hyperth Off J Eur Soc Hyperthermic Oncol North Am Hyperth Group* **27**, 320–343.
- Yu C-H, Lin H-P, Cheng S-J, Sun A & Chen H-M (2014). Cryotherapy for oral precancers and cancers. *J Formos Med Assoc* **113**, 272–277.
- Zelmer A & Ward TH (2013). Noninvasive fluorescence imaging of small animals. *J Microsc* **252**, 8–15.
- Zhang B, Moser M, Zhang E & Zhang WJ (2013). Radiofrequency ablation technique in the treatment of liver tumours: review and future issues. *J Med Eng Technol* **37**, 150–159.
- Zhang W, Zuo X, Niu Y, Wu C, Wang S, Guan S & Silva SRP (2017). Novel nanoparticles with Cr³⁺ substituted ferrite for self-regulating temperature hyperthermia. *Nanoscale* **9**, 13929–13937.

Thermothérapies guidées par imagerie pour le traitement des cancers

Ce travail de thèse prouve que la combinaison de la thermoablation et de l'hyperthermie modérée peut être utilisée pour le traitement des tumeurs solides. La preuve de concept a été établie par imagerie moléculaire *in vitro* sur des cellules en culture et *in vivo* sur des modèles murins.

La viabilité des cellules cancéreuses en culture et au sein des tumeurs implantées a été suivie par imagerie de bioluminescence grâce à l'expression constitutive de luciférase. De la même manière, l'utilisation d'un promoteur thermo-inductible couplé à un gène rapporteur d'imagerie a permis d'identifier les zones d'hyperthermie modérée. L'élévation de la température a été réalisée de manière non invasive par hyperthermie magnétique et ultrasons focalisés guidés par IRM. L'hyperthermie magnétique a été effectuée à l'aide de nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer placées dans un champ magnétique alternatif et l'élévation de température a été monitorée par imagerie infrarouge. La distribution des nanoparticules magnétiques a été suivie par microscopie photonique et électronique, cytométrie en flux et imagerie de fluorescence. Les ultrasons focalisés ont également été utilisés pour le chauffage des tumeurs. Les variations de températures ont été mesurées par IRM et l'information de température a été utilisée pour contrôler en temps réel la puissance des ultrasons. Ces approches expérimentales *in vivo* ont permis de démontrer qu'une thermoablation tumorale centrale peut être combinée à une hyperthermie modérée périphérique du microenvironnement tumoral.

Parce que l'hyperthermie magnétique et les ultrasons focalisés guidés par IRM sont actuellement en clinique, nos résultats ouvrent des perspectives de thérapie anticancéreuse en associant à la thermoablation des stratégies de thérapies innovantes basées sur la libération contrôlée de médicament encapsulé dans des nanoparticules thermosensibles ou l'expression thermo-inductible de gènes thérapeutiques.

Mots clés : cancer, thérapies innovantes, hyperthermie magnétique, ultrasons focalisés guidés par IRM, imagerie moléculaire, études précliniques *in vitro* et *in vivo*

Imaging-guided thermotherapies for cancer treatment

This present work demonstrates that thermal ablation and mild hyperthermia could be combined for solid tumor treatment. Proof of concept was established by molecular imaging in cell culture *in vitro* and using mouse models *in vivo*.

Cancer cell viability in culture and in the tumor was followed by bioluminescence imaging using luciferase constitutive expression. Imaging reporter genes were also coupled with thermo-induced promoter to visualize mild hyperthermia areas in mice. The temperature rise was achieved using non-invasive techniques such as magnetic hyperthermia and MR-guided focused ultrasounds. Magnetic hyperthermia was performed using iron oxide magnetic nanoparticles placed in an alternating magnetic field to induce an increase of temperature monitored by infrared imaging. Magnetic nanoparticles distribution was followed by photonic and electronic microscopy, flow cytometry and fluorescence imaging. Focused ultrasounds have also been used for tumor heating. Temperature changes were followed by MR and temperature used to control in real time the ultrasonic power. These *in vivo* experimental approaches demonstrated that central tumor thermal ablation could be combined with peripheric mild hyperthermia of tumor microenvironment.

As magnetic hyperthermia and MR-guided focused ultrasounds are currently in clinic, our results reveal new opportunities for cancer therapies combining thermal ablation with innovative strategies based on controlled drug release from thermo-sensitive nanoparticles or thermo-induced therapeutic gene expression.

Key words: cancer, innovative therapies, magnetic hyperthermia, MR-guided focused ultrasounds, molecular imaging, preclinical *in vitro* and *in vivo* studies