



HAL
open science

Ciblage thérapeutique de l'adénocarcinome pancréatique par hyperthermie magnétique ou ablation magnéto-mécanique

Justine Journaux-Duclos

► **To cite this version:**

Justine Journaux-Duclos. Ciblage thérapeutique de l'adénocarcinome pancréatique par hyperthermie magnétique ou ablation magnéto-mécanique. Cancer. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2023. Français. NNT : 2023TOU30360 . tel-04619849

HAL Id: tel-04619849

<https://theses.hal.science/tel-04619849>

Submitted on 21 Jun 2024

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.

Doctorat de l'Université de Toulouse

préparé à l'Université Toulouse III - Paul Sabatier

Ciblage thérapeutique de l'adénocarcinome pancréatique
par hyperthermie magnétique ou ablation magnéto-
mécanique.

Thèse présentée et soutenue, le 20 décembre 2023 par

Justine JOURNAUX-DUCLOS

École doctorale

BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies

Spécialité

PHARMACOLOGIE

Unité de recherche

CRCT - Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse

Thèse dirigée par

Véronique GIGOUX

Composition du jury

M. Damien MERTZ, Rapporteur, CNRS de Strasbourg - IPCMS

M. Bertrand LIAGRE, Rapporteur, Université de Limoges

Mme Florence GAZEAU, Rapporteur, CNRS de Paris - MSC

M. Olivier SANDRE, Examineur, CNRS - LCPO Pessac

Mme Véronique GIGOUX, Directrice de thèse, INSERM de Toulouse - CRCT

M. Julian CARREY, Président, INSA de Toulouse

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu Véronique Gigoux, ma directrice de thèse, pour la confiance qu'elle m'a accordée, sa disponibilité, son implication et tout ce qu'elle m'a appris au cours de ces années de thèse et également pour son aide précieuse lors de la rédaction de ce manuscrit. En plus de tout ce qu'elle m'a apporté d'un point de vue scientifique, j'ai énormément apprécié mes années de thèse avec Véronique du fait de ses qualités humaines. Tout étudiant devrait pouvoir avoir un encadrement aussi bienveillant. Pour tout cela merci !

Je remercie Corinne Bousquet qui m'a accueilli dans son équipe, pour ses remarques constructives et l'attention qu'elle a porté à l'évolution de mon projet de thèse.

Je remercie aussi tous les membres du jury : Florence Gazeau, Bertrand Liagre, Damien Mertz, Julian Carrey et Olivier Sandre, de me faire l'honneur d'évaluer mes travaux de thèse.

Merci à Pascal pour son aide, ses remarques pertinentes, pour toutes ses connaissances de façon générale, qu'il aime tant partager et pour tous ces moments de rigolades. J'ai beaucoup apprécié travailler à ses côtés durant ma thèse.

Merci à tous ceux et qui étaient là pour apporter leur bonne humeur et avec qui j'ai aimé travailler mes collègues de Ranguel, Ahmed, Loubna, Angela, Doha. Angela, ces quelques mois où nous avons travaillé ensemble étaient vraiment top et je suis ravie de savoir que cela va pouvoir se prolonger ! A toute mon équipe du CRCT : Yvan, Christine, Marjorie, Ludmilla, Jacobo, Chloé, Alexia, Ismahane, Medhi, Claire, Hippolyte, Maxime, Petnoi, Morgane, Evangelia, merci pour leur aide et leurs conseils, notamment pendant nos réunions d'équipe tout au long de ma thèse.

Je remercie Olivier Sandre et Megi Bejko du laboratoire de chimie de Bordeaux qui ont synthétisé les nanoparticules utilisées dans ce projet.

Je remercie également Julian Carrey, Geraldine Ballon et Ahmed Abdelhamid, qui ont fait les dosages en fer des nanoparticules du projet.

Merci aussi à Elodie et Alexia pour leur grande gentillesse et leur expertise lors des manip de cytométrie.

Je remercie de tout cœur La Ligue contre le cancer et tous les généreux donateurs qui ont financé mes travaux de thèse et j'ai une pensée particulière pour tous les patients qui vivent des moments difficiles à cause de cette maladie...

Bien évidemment je remercie, ceux sans qui je n'en serais pas là, mes parents. Maman, toi qui, malgré la distance géographique et ton travail, essaye toujours de te rendre disponible si on a besoin de toi, besoin pour les enfants, etc. Papa, tu es le plus grand modèle de persévérance et de courage à mes yeux, je t'admire tellement. Merci d'avoir toujours cru en moi, pour ce que vous êtes et tout ce que vous faites pour moi, pour nous... Vous êtes mes exemples, merci pour votre soutien sans faille, merci d'être vous !

Je remercie également mes petites sœurs, Chloé et Louise, mes grands-parents, toute ma famille et mes amis pour leur intérêt, leur envie de comprendre mon sujet de thèse et leur soutien au quotidien. Merci aussi à ma belle-famille et plus particulière à Bernard, ton courage et ton combat ont été dans mes pensées tout au long de la rédaction de cette thèse.

Un grand merci à Cédric, mon mari, ma moitié, mon binôme, qui partage ma vie depuis plus de 10 ans. Merci de m'avoir toujours soutenue tout au long de mes études, de supporter mes doutes et de m'aimer comme tu le fais. Merci d'avoir "enduré", avec plaisir je le sais, toutes mes répétitions la veille d'oraux. Merci d'être présent dans ma vie. En 10 ans on en aura fait des choses... et j'aime tellement tout ce que l'on a construit ensemble, notre famille et la vie que l'on mène.

Pour finir, je remercie ceux qui, du haut de leurs 5 ans et demi et 2 ans et demi, n'ont même pas conscience de tout ce qu'ils m'apportent au quotidien, mes fils. Timéo, toi qui m'accompagnais déjà sur les bancs de la fac en L3 quand tu étais encore dans mon ventre et qui a donc connu maman en master et en doctorat ("maman elle écrit la thèse"). Antoine, mon amour de "bébé" qui grandi trop vite. J'espère que vous serez fiers de votre maman...

Sommaire

Résumé.....	5
Abstract	8
Liste des abréviations.....	11
Introduction générale.....	12
Chapitre 1 : Nanomédecine en cancérologie	15
I – Les Nanoparticules	15
I.1 - Définition d'une nanoparticule	15
I.2 - Différentes familles de nanoparticules	16
I.2.a – Les nanoparticules organiques	16
I.2.b – Les nanoparticules inorganiques.....	20
I.2.c – Les nanoparticules hybrides et nanocomposites.....	22
I.3 – Biodistribution des nanoparticules.....	23
I.4 – Ciblage des nanoparticules.....	25
I.4.a – Le ciblage passif : effet EPR	26
I.4.b – Le ciblage actif par vectorisation.....	27
I.4.c – Guidage magnétique.....	29
I.5 - Internalisation cellulaire.....	30
I.6 – Elimination / dégradation.....	32
I.7 - Applications	33
I.7.a -Applications en diagnostic.....	33
I.7.b – Applications thérapeutiques	35
I.7.c – Potentiel théranostique	41
II – Les nanoparticules magnétiques en nanomédecine	42
II.1 - Nanoparticule d'oxyde de fer.....	42
II.2 - Applications : outil théranostic	45
II.2.a - Agent de diagnostic	45
II.2.b – Agent de Thérapie	47
Chapitre 2 : Cancer du pancréas	63
I - Le pancréas sain	63

I.1 - Anatomie, composition	63
I.2 - Fonction du pancréas	64
I.2.a - Endocrine.....	64
I.2.b - Exocrine	65
II - Cancer pancréatique	65
II.1 - Généralité, épidémiologie	66
II.2 - Développement du cancer	68
II.3 - Caractéristique, rôle du microenvironnement.....	69
II.3.a - Les CAF.....	70
II.3.b - Les cellules immunitaires	77
II.4 - Diagnostic	80
II.5 – Thérapie.....	81
II.5.a - Chirurgie	82
II.5.b - Radiothérapie	84
II.5.c - Chimiothérapies.....	84
II.5.d - Immunothérapie	86
II.5.e - Mort cellulaire immunogène.....	87
II.6 - Nanomédecine et adénocarcinome pancréatique.....	91
Résultats.....	95
Partie I :	96
Origine des ions fer impliqués dans la production de ROS responsables de la mort des cellules cancéreuses par hyperthermie magnétique intra-lysosomale	96
Partie II :	131
Thermal or mechanical energy released by magnetic nanoparticles upon high or low frequency magnetic field induce immunogenic cell death in pancreatic adenocarcinoma	131
Partie III :	159
Impact de l’hyperthermie magnétique et de l’ablation magneto-mécanique sur le phénotype des caf	159
Conclusion générale et perspectives.....	167
Références bibliographiques.....	173

Résumé

La nanomédecine est en plein essor ces dernières années. L'oncologie est l'un des principaux domaines qui se penche sur l'utilisation de nanoparticules en clinique. En effet, les nanoparticules représentent un outil innovant qui peut être façonné de sorte à être utilisé en tant qu'agent diagnostique et/ou thérapeutique. Grâce à leurs propriétés physico-chimiques, les nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer offrent de nombreux avantages. Elles sont biocompatibles et fonctionnalisables et ont déjà été utilisées en tant qu'agent de contraste pour le diagnostic par IRM.

De nombreuses études, *in vitro* ou pré-cliniques, ont également permis de démontrer que les nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer pouvaient constituer des agents thérapeutiques antitumoraux, lorsqu'elles sont exposées à un champ magnétique alternatif à haute fréquence (AMF) ; cette stratégie s'appelle l'hyperthermie magnétique. Des essais cliniques utilisant le principe de l'hyperthermie magnétique médiée par l'utilisation de nanoparticules d'oxyde de fer soumises à l'application externe de champ AMF ont été menés sur le glioblastome et le cancer de la prostate en association avec la radiothérapie. Néanmoins, le bénéfice sur l'espérance de vie était négligeable et des effets indésirables ont été relevés sur les tissus sains adjacents, en raison de la diffusion de l'énergie thermique générée par la forte concentration de nanoparticules injectées directement dans la tumeur. Afin de trouver d'autres solutions permettant de s'affranchir de ces effets indésirables, plusieurs équipes ont montré qu'il était possible d'induire spécifiquement la mort de cellules tumorales ou de cellules du microenvironnement grâce à l'utilisation de faibles concentrations de nanoparticules magnétiques vectorisées qui s'accumulent spécifiquement dans les lysosomes des cellules ciblées. L'application ultérieure du champ AMF induit alors spécifiquement la mort des cellules-cibles par hyperthermie magnétique intra-lysosomale ciblée (MILH). Les mécanismes conduisant à la mort de ces cellules ont été caractérisés et montrent qu'elle est initiée dans les lysosomes par la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) selon la réaction de Fenton qui nécessite des ions Fe et peut être catalysée par un pH acide et une augmentation de la température (optimale à 40°C). Cependant, l'origine des ions Fe impliqués dans la réaction de Fenton n'a pas été élucidée ; la principale hypothèse est qu'ils seraient libérés par les nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer exposées au champ AMF.

Plus récemment, quelques études ont montré que les nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer pouvaient également générer des forces mécaniques, lorsqu'elles sont exposées à des champs magnétiques rotatifs à basse fréquence (RMF) et ainsi induire la mort des cellules tumorales ou du microenvironnement tumoral par ablation magnéto-mécanique.

Les deux principaux objectifs de ma thèse ont consisté à :

- comprendre l'origine du fer impliqué dans la production de ROS responsables de la mort des cellules cancéreuses par hyperthermie magnétique intra-lysosomale,
- étudier la capacité de l'hyperthermie magnétique et de l'ablation magnéto-mécanique intra-lysosomales à stimuler une réponse immunitaire antitumorale ou mort cellulaire immunogène.

Nous avons choisi comme modèle, l'adénocarcinome pancréatique (PDAC) particulièrement résistant aux thérapies conventionnelles et caractérisé par la présence d'un microenvironnement important et dense. Dans ce microenvironnement, les CAF (Cancer-Associated Fibroblasts) jouent un rôle clef, notamment par la sécrétion de matrice extracellulaire (collagène) et de molécules solubles, limitant la pénétration et l'efficacité des traitements (chimiothérapie et radiothérapie) et contribuant à l'acquisition de résistance contre ces traitements. Les cellules cancéreuses ainsi que les CAF pancréatiques peuvent surexprimer le récepteur de type 2 de la cholécystokinine (RCCK2). Ce récepteur membranaire présente la propriété de s'internaliser après fixation de son agoniste spécifique : la gastrine. Afin de cibler spécifiquement ces cellules, l'équipe a développé, en collaboration avec des équipes de chimistes (Dr O. Sandre du laboratoire LCPO et Dr S. Mornet du laboratoire ICMCB), des nanoparticules fonctionnalisées à haut pouvoir chauffant : elles sont constituées d'un multi-cœur d'oxyde de fer (nanoflowers), enrobées de polyéthylène glycol et vectorisées avec des peptides de gastrine (NF@Gastrine). Ces nanoparticules reconnaissent spécifiquement les cellules pancréatiques humaines MiaPaca2 et de CAF exprimant le récepteur CCK2 (appelées MiaPaca2-CCK2 et CAF-CCK2) et s'accumulent dans leurs lysosomes.

Pour répondre au premier objectif (Résultats, partie 1), nous avons comparé les effets de l'hyperthermie magnétique intra-lysosomale induits par les nanoparticules NF@Gastrine à ceux induits par les mêmes nanoparticules recouvertes d'une coque de silice "hermétique" (NF@SiO₂@Gastrine), empêchant la libération de fer sous l'application du champ AMF. Nous avons également utilisé la Ferristatin-II, un inhibiteur de la capture de fer par la cellule. Cette étude a permis de mettre en évidence que le fer impliqué dans la réaction de Fenton à l'origine de la production de ROS par l'hyperthermie magnétique intra-lysosomale provenait du pool

endogène de la cellule et non de la libération de fer par les nanoparticules d'oxyde de fer soumises à l'AMF.

Nous avons ensuite étudié la capacité de l'hyperthermie magnétique et de l'ablation magnéto-mécanique intra-lysosomales à stimuler une réponse immunitaire antitumorale ou mort cellulaire immunogène (Résultats, partie 2). Nous avons notamment mis en évidence que ces deux approches augmentent l'expression de motifs moléculaires associés aux dégâts (damage-associated molecular patterns ou DAMP) à la surface des cellules cancéreuses MiaPaca2 mais aussi des CAF ayant internalisées les nanoparticules NF@Gastrine et qu'elles stimulent leur phagocytose par des macrophages. Ces deux approches : hyperthermie magnétique et ablation magnéto-mécanique, pourraient donc être deux nouvelles stratégies capables d'induire une mort cellulaire immunogène et de rétablir une immunité antitumorale dans l'adénocarcinome pancréatique. Enfin, ces deux stratégies peuvent également modifier le phénotype pro-tumoral des CAF, en inhibant leur migration et en diminuant leur sécrétion de collagène.

Abstract

Nanomedicine has been booming in recent years. Oncology is one of the main areas looking at the use of nanoparticles in clinics. Indeed, nanoparticles represent an innovative tool that can be design to be used as a diagnostic and/or therapeutic agent. Thanks to their physicochemical properties, magnetic iron oxide nanoparticles offer numerous advantages. They are biocompatible and customizable and have already been used as a contrast agent for MRI diagnosis.

Numerous *in vitro* or pre-clinical studies have demonstrated that magnetic iron oxide nanoparticles constitute anti-tumor therapeutic agents, when they are exposed to a high frequency alternating magnetic field (AMF); this strategy is called magnetic hyperthermia. Clinical trials using magnetic hyperthermia mediated by iron oxide nanoparticles and external application of AMF have been carried out on glioblastoma and prostate cancer in association with radiotherapy. However, the benefit on life expectancy was negligible and adverse effects were noted on adjacent healthy tissues, due to the diffusion of thermal energy generated by the high concentration of nanoparticles injected directly into the tumor. In order to find other solutions to overcome these undesirable effects, several teams showed that it was possible to specifically induce the death of tumor cells and cells from microenvironment by using low concentrations of vectorized magnetic nanoparticles which accumulate specifically in the lysosomes of targeted cells. The subsequent AMF application specifically induce the death of target cells by targeted intra-lysosomal magnetic hyperthermia (MILH) also called intracellular magnetic hyperthermia. The mechanisms leading to cell death was characterized and showed that it is initiated in lysosomes by the generation of reactive oxygen species (ROS) through the Fenton reaction which requires Fe ions and can be catalyzed by an acidic pH and temperature increase (optimal at 40°C). However, the origin of the Fe ions involved in the Fenton reaction has not been elucidated; the main hypothesis is that they would be released from the magnetic iron oxide nanoparticles exposed to the AMF.

More recently, few studies showed that magnetic iron oxide nanoparticles can generate mechanical forces when exposed to low-frequency rotating magnetic fields (RMF) and thus induce the death of cancer cells and cell from tumoral microenvironment by targeted magnéto-mechanical ablation.

The two main objectives of my thesis were to:

- understand the origin of iron involved in the production of ROS responsible for the death of cancer cells by intra-lysosomal magnetic hyperthermia,
- study the ability of magnetic intra-lysosomal hyperthermia and magneto-mechanical ablation to stimulate an antitumor immune response or immunogenic cell death.

We chose as a model, pancreatic adenocarcinoma (PDAC), which is particularly resistant to conventional therapies and characterized by the presence of a large and dense microenvironment. In this microenvironment, CAF (Cancer-Associated Fibroblasts) play a key role, in particular through the secretion of extracellular matrix (collagen) and soluble molecules, limiting the penetration and effectiveness of treatments (chemotherapy and radiotherapy) and contributing to the acquisition of resistance against these treatments. Cancer cells as well as pancreatic CAF can overexpress cholecystokinin receptor type 2 (RCCCK2). This membrane receptor has the property to be internalized after binding of its specific agonist: gastrin. In order to specifically target these cells, our team developed, in collaboration with teams of chemists (Dr O. Sandre of LCPO laboratory and S. Mornet of ICMCB laboratory), functionalized nanoparticles with high heating power: they are made with an iron oxide multi-core (nanoflowers), coated with polyethylene glycol and vectorized with gastrin peptides (NF@Gastrin). These nanoparticles specifically recognize MiaPaca2 and CAF human pancreatic cells expressing the CCK2 receptor (called MiaPaca2-CCK2 and CAF-CCK2) and accumulate in their lysosomes.

To answer the first objective (Results, part 1), we compared the effects of intra-lysosomal magnetic hyperthermia induced by NF@Gastrin nanoparticles to those induced by the same nanoparticles covered with a “hermetic” silica shell (NF@SiO₂@Gastrin), preventing the release of iron under AMF application. We also used Ferristatin-II, an inhibitor of iron uptake by the cell. This study demonstrated that the iron ions involved in the Fenton reaction to engender ROS by intra-lysosomal magnetic hyperthermia come from the endogenous Fe pool of the cell and not from the release of Fe ions from the iron oxide nanoparticles exposed to AMF.

Then, we investigated the ability of magnetic intra-lysosomal hyperthermia and magneto-mechanical ablation to stimulate an antitumor immune response or immunogenic cell death (Results, part 2). We demonstrated that both strategies increase the expression of damage-associated molecular patterns (DAMP) at the surface of MiaPaca2 and CAF cells having internalized the NF@Gastrin nanoparticles and stimulate their phagocytosis by macrophages.

These two approaches, magnetic hyperthermia and mechanical ablation, could therefore be two new strategies capable to induce immunogenic cell death and restore antitumor immunity in pancreatic adenocarcinoma. Finally, these two strategies can also modify the pro-tumoral phenotype of CAF, by inhibiting their migration and decreasing their capacity to secrete collagen.

Liste des abréviations

5-FU 5-fluorouracile
AMF champ magnétique alternatif à haute fréquence (high frequency alternating magnetic field)
AnnV annexine V
apCAF CAF présentatrice d'antigène
ATP adénosine triphosphate
CAF cancer associated fibroblast
CCK2 récepteur de type 2 à la *cholecystokinine* (type 2 receptor to *chlecystokinin*)
CSM cellule souche mésenchymateuse
DAMP damage-associated molecular pattern
EPR perméabilité et rétention améliorée (enhanced permeability and retention)
FAP protéine activée par les fibroblastes
FDA food and drug administration
FITC fluorescein isothiocyanate
HMGB1 high mobility group box 1
HSP protéine de choc thermique
iCAF CAF inflammatoire
IL interleukine
IONP nanoparticules d'oxyde de fer
IP iodure de propidium
IRM imagerie par résonance magnétique
LT lymphocyte T
M1 macrophage de type 1
M2 macrophage de type 2
MDSC myeloid derived suppressor cell
MEC matrice extracellulaire
MiaPaca2 cellules cancéreuses pancréatiques
MOF metal-organic frameworks
myCAF myofibroblate
NK natural killer
NP nanoparticule
PanIN néoplasie intraépithéliale pancréatique
PBS tampon phosphate salin
PD-1 programmed cell death protein 1
PDAC adénocarcinome pancréatique
PD-L1 programmed death-ligand 1
PDT thérapie photodynamique
PDX xénogreffe dérivée de patient
PEG polyéthylène glycol
PSC cellule stellaire pancréatique
PTT thérapie photothermique
RES système réticulo-endothélial
RMF champ magnétique rotatif à basse fréquence (low frequency rotative magnetic field)
ROS espèces réactives de l'oxygène
SAR débit d'absorption spécifique
TME microenvironnement tumoral
 α -SMA α -smooth muscle actin

Introduction générale

Le cancer est un processus complexe qui reste l'une des principales causes de mortalité dans le monde. Il est le résultat d'un développement et d'une multiplication cellulaire anormale. Depuis des décennies, la recherche s'attache à étudier les différents processus d'apparition et de progression du cancer, améliorer les techniques de diagnostic, les approches thérapeutiques et la prise en charge des patients. Ces dernières années ont été marquées par des avancées majeures en termes de techniques biotechnologiques. Cela a permis notamment d'étudier les mécanismes de cancérogenèse, d'affiner les stratégies de traitement en fonction du type de cancer, du stade d'avancement, *etc.*, et ainsi de proposer des thérapies de plus en plus personnalisées et ciblées tout en réduisant les effets indésirables. Les traitements anti-cancéreux conventionnels sont la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. La chirurgie consiste à réséquer la tumeur qui doit être relativement petite et localisée. La chirurgie peut être accompagnée d'un traitement chimiothérapeutique et/ou radiothérapeutique (qui peuvent être proposés avant et/ou après la chirurgie). La chimiothérapie est une molécule ou une combinaison de molécules connues pour leurs effets anticancéreux. La radiothérapie consiste à appliquer des irradiations ionisantes qui induisent des dommages à l'ADN conduisant à la mort des cellules cancéreuses. De nouvelles thérapies anti-cancéreuses ont émergé ces dernières années dont l'immunothérapie, l'hormonothérapie, la nanomédecine, *etc.* Le traitement par immunothérapie consiste à stimuler le système immunitaire pour lutter contre le cancer. L'hormonothérapie consiste à faire varier la quantité d'hormone présente dans le corps, connue pour avoir des effets anticancéreux. Néanmoins, même si ces traitements sont efficaces pour éradiquer certains cancers, ils ne fonctionnent pas sur tous les types de cancers et peuvent présenter des effets indésirables importants pouvant aller jusqu'à l'arrêt des traitements ou au décès du patient dans les cas les plus graves.

Malgré tous les progrès de la médecine en oncologie, le cancer reste la deuxième cause de décès dans le monde avec près de 10 millions de morts par an. Les traitements conventionnels ont de multiples limites comme la mise en place de résistances ou les effets indésirables causés sur les tissus sains. La recherche se penche donc sur le développement de nouvelles stratégies permettant un meilleur diagnostic mais aussi proposant de nouvelles solutions thérapeutiques avec un meilleur ciblage spécifique des tissus cancéreux. C'est dans ce contexte que la nanomédecine se développe, notamment en oncologie, pour inventer de nouveaux outils de diagnostic ou de traitement du cancer, voire une combinaison de ces deux potentiels (diagnostic et traitement), on parle alors d'outil théranostique.

Dans ce manuscrit, nous développerons, dans une première partie, l'utilisation de nanomédecine en cancérologie, l'intérêt d'utiliser des nanoparticules en tant qu'agent

diagnostic et/ou thérapeutique. Puis, nous nous focaliserons plus précisément sur les nanoparticules d'oxyde de fer, outil polyvalent avec un intérêt grandissant pour un usage en thérapie ciblée. Dans une deuxième partie, nous nous attarderons sur l'adénocarcinome pancréatique, connu pour son très mauvais pronostic, qui a constitué le modèle de cancer de notre étude. Nous verrons alors les stratégies de diagnostics et thérapies actuelles pour la lutte contre ce cancer dévastateur, avant de voir comment la nanomédecine pourrait apporter un bénéfice certain pour son traitement.

Nous développerons ensuite les résultats obtenus au cours de ce travail. Les travaux de la première partie montreront que les ions Fe impliqués dans la production de ROS conduisant à la mort cellulaire par hyperthermie magnétique proviennent du pool cellulaire de fer endogène et non de la libération de fer des nanoparticules d'oxyde de fer exposées au champ magnétique. La deuxième partie des résultats développera les travaux qui ont permis de mettre en évidence que l'hyperthermie magnétique ainsi que l'ablation magnéto-mécanique ciblées constituent des stratégies capables non seulement d'induire la mort des cellules cancéreuses pancréatiques et des CAF du microenvironnement tumoral, mais aussi de stimuler une réponse immunitaire antitumorale. Enfin, nous évoquerons la possibilité d'induire un changement phénotypique des CAF afin d'inhiber certaines de leurs caractéristiques pro-tumorales, toujours grâce à ces deux stratégies ciblées : l'hyperthermie magnétique intra-lysosomale et l'ablation magnéto-mécanique.

CHAPITRE 1 : NANOMEDECINE EN CANCEROLOGIE

I – LES NANOPARTICULES

I.1 - Définition d'une nanoparticule

La nanomédecine utilisée en oncologie comprend l'utilisation de multiples types de nanoparticules. Les nanoparticules (NP) sont définies par le comité européen de normalisation : "Les nanomatériaux sont composés de structures dont au moins une des dimensions varie entre 1 et 100 nm, leur conférant ainsi des propriétés physico-chimiques tout à fait particulières" (ISO TS/27687). On peut citer notamment les liposomes, les nanoparticules d'or, les nanoparticules d'oxyde de fer, les nanotubes, *etc.* Les NP présentent des propriétés différentes en fonction de leur taille, leur charge, leur forme, la composition de leur noyau et de leur chimie de surface (figure 1). Il existe une multitude de formulations physico-chimiques qui confère aux nanoparticules des propriétés biologiques diverses en termes de biodistribution, de ciblage, d'applications ou encore de toxicité.

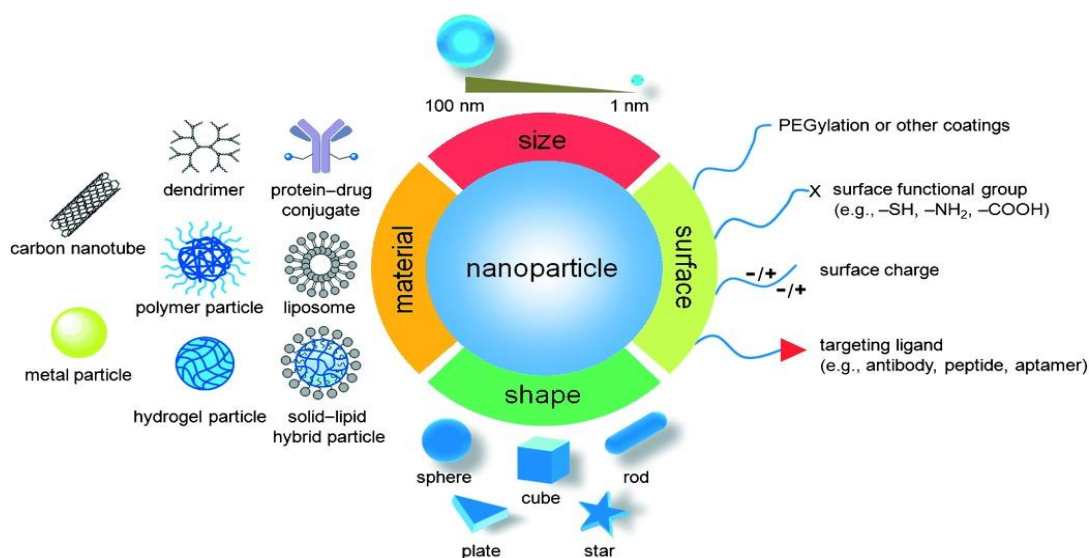


Figure 1 : Illustration schématique des différents types de nanoparticules : différentes formes, compositions, greffages de surface, tailles¹.

De cette hétérogénéité de caractéristiques, en découle des intérêts et applications divers². Dans la suite du manuscrit, nous nous focaliserons plus particulièrement sur leurs utilisations ou applications en cancérologie.

I.2 - Différentes familles de nanoparticules

Parmi les nanoparticules, on distingue deux grandes familles ayant chacune des caractéristiques particulières permettant de développer différentes applications : les nanoparticules organiques et les nanoparticules inorganiques (figure 2). Une troisième famille a émergé récemment combinant les atouts apportés par ces deux familles de nanoparticules : les nanoparticules hybrides ou nano-composites (figure 2).

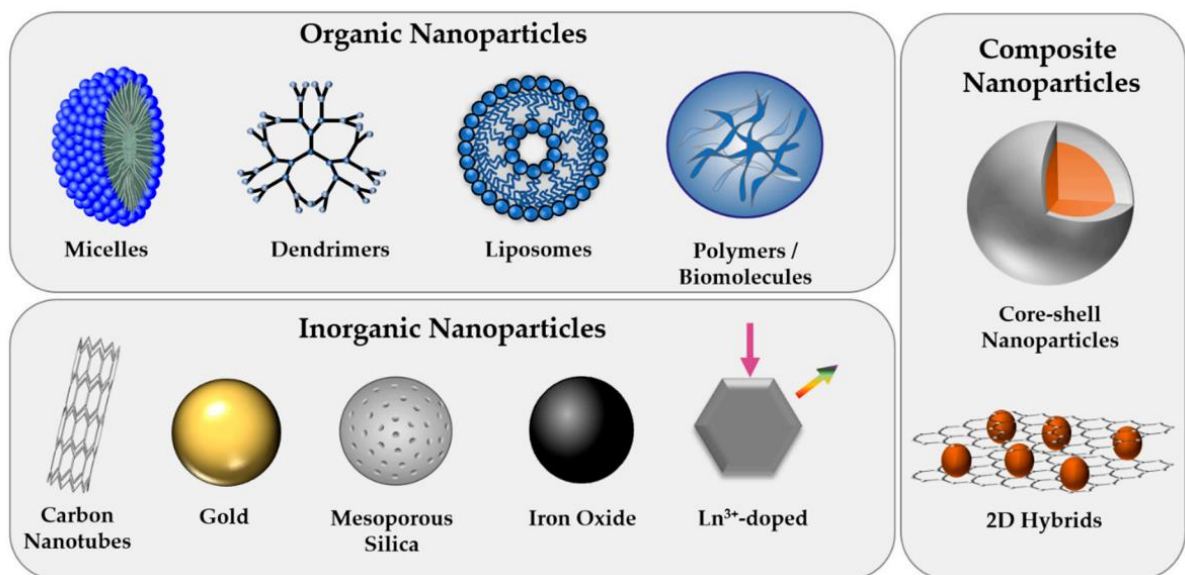


Figure 2 : Différentes familles de nanoparticules : organiques, inorganiques et hybrides ³.

I.2.a – Les nanoparticules organiques

La famille des nanoparticules organiques comprend les NP composées de glucides, lipides, protéines, ou des polymères de composés organiques. Cette famille de nanoparticules représente un réel intérêt pour la délivrance de médicaments ² qui peuvent être des petites molécules, des peptides, des acides nucléiques, des anticorps monoclonaux, *etc.*, utilisées notamment dans le traitement du cancer ⁴. Ces nanoparticules sont modifiables, permettant le contrôle spatio-temporel de leur transport et de la libération des molécules thérapeutiques. Ces NP présentent l'avantage de modifier la biodistribution et la clairance d'un médicament, afin d'améliorer sa biodisponibilité au niveau de la cible ⁵, de limiter sa toxicité sur d'autres tissus et donc de réduire ses effets indésirables ⁶.

Ci-après, nous développerons quelques types de nanoparticules organiques, comme les liposomes et les micelles, qui sont les plus utilisés. Nous décrirons également quelques exemples de nanoparticules plus originales, comme les dendrimères et les polymérosomes, ainsi que leurs utilisations.

- **Les liposomes**

Les liposomes sont des assemblages de phospholipides ; ils sont les plus utilisés en tant que vecteur de médicaments et constituent les NP les plus utilisées en clinique et approuvées par la Food and Drug Administration (FDA) pour une utilisation en clinique ⁷. Les liposomes sont constitués d'une bicouche lipidique (tête hydrophile et queue hydrophobe). Ils présentent de multiples intérêts : les molécules médicamenteuses peuvent être encapsulées dans le noyau hydrophile ou incorporées dans la bicouche lipidique hydrophobe selon les propriétés hydrophiles ou hydrophobes des molécules à encapsuler. Néanmoins, le chargement en molécules hydrophobes reste instable comparativement à celui de molécules hydrophiles. En effet, l'incorporation de la molécule thérapeutique dans les liposomes se fait *via* un gradient de pH transmembranaire. Lorsque la molécule rentre à l'intérieur du liposome, elle devient ionisée grâce à la différence de pH et y est donc séquestrée. Des équipes développent donc des stratégies permettant l'ajout de groupements basiques sur les molécules hydrophobes ou encore des composés tels que ceux utilisés pour la solubilité de médicament comme les cyclodextrines (figure 3). Ces cyclodextrines peuvent alors se charger en médicaments hydrophobes qui vont être encapsulés dans les liposomes grâce aux groupements ionisables des cyclodextrines ⁸.

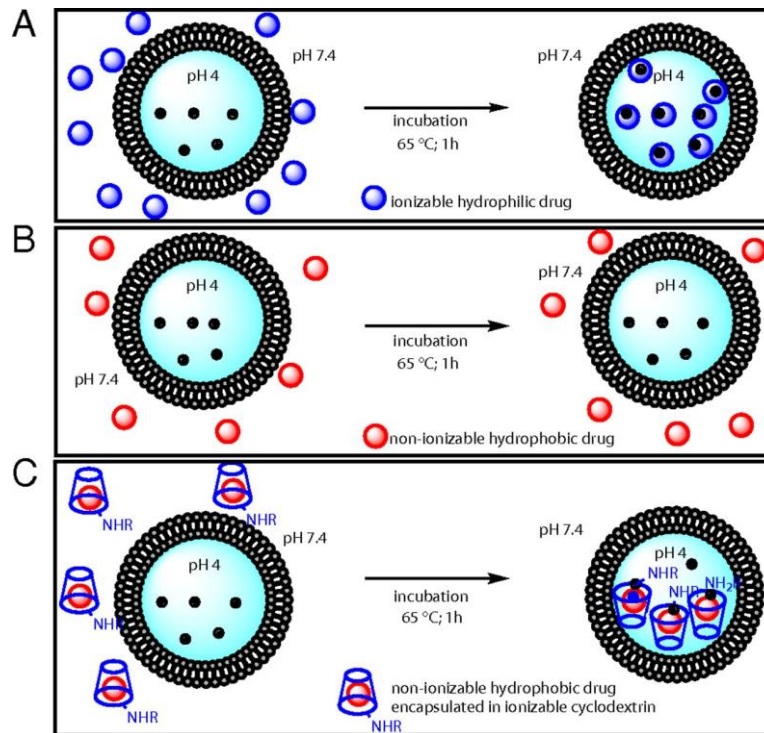


Figure 3 : Schéma représentant le chargement de molécules médicamenteuses dans les liposomes : (A) chargement de molécules hydrophiles ionisables, (B) chargement de molécules hydrophobes, (C) chargement de molécules hydrophobes encapsulées dans cyclodextrine ionisable ⁸.

Les liposomes sont relativement faciles à produire et sont biocompatibles ⁹. Néanmoins, leur demi-vie dans le corps est relativement faible ; leur enrobage avec du polyéthylène glycol (PEG) a alors permis d’allonger leur temps de circulation dans le corps ¹⁰. De plus, la facilité avec laquelle leur surface peut être modifiée a permis d’envisager l’amélioration de leur adressage au site tumoral par vectorisation ¹¹. Par exemple, des liposomes PEGylés et vectorisés avec une séquence peptidique se liant à l’intégrine $\alpha 5\beta 1$, surexprimée par les cellules cancéreuses du colon, s’accumulent de façon plus importante sur les cellules cancéreuses du colon que les liposomes non-vectorisés ¹². De plus, l’efficacité de liaison des liposomes aux cellules cancéreuses est dépendante de la densité de PEG et de peptides permettant le ciblage à la surface des nanoparticules ¹².

- Les micelles polymériques

La famille des nanoparticules organiques compte également les micelles, qui présentent une meilleure solubilité que les liposomes et permettent de pallier le manque de solubilité de certaines chimiothérapies. Les micelles présentent de multiples avantages pour le

développement de stratégies anti-cancéreuses ¹³. Ce sont des nanoparticules composées de polymères ou de lipides, de forme sphérique. Ils ont pour principal atout l'encapsulation stable de molécules médicamenteuses hydrophobes en augmentant jusqu'à 500 fois leur solubilité dans l'eau ¹⁴. Par exemple, le paclitaxel encapsulé dans des micelles polymériques présente un temps de circulation augmenté par rapport au paclitaxel libre après injection intraveineuse et une meilleure efficacité : régression complète des tumeurs alors que la progression tumorale est seulement ralentie avec le médicament libre, sur des souris porteuses de xénogreffe de carcinome épidermoïde ou de carcinome mammaire ¹⁵. Cependant, leur capacité de chargement est inférieure à celle des liposomes car ils sont formés d'une monocouche lipidique. Ils peuvent également être fonctionnalisés avec des molécules améliorant leur accumulation spécifique dans les tissus tumoraux.

- **Les dendrimères**

Les dendrimères sont des NP de forme sphérique, constituées de polymères ramifiés. Ils peuvent être greffés d'agents de ciblage et/ou de molécules thérapeutiques pour la délivrance de médicaments. Leur taille et le nombre de ramifications peuvent être contrôlés en fonction de l'usage qui en sera fait. La plupart sont hydrophobes, mais ils peuvent être modifiés pour améliorer leur solubilité. Par exemple, l'ajout de PEG sur un dendrimère transportant du paclitaxel a permis d'améliorer la solubilité du complexe ¹⁶. Leur principal atout est la polyvalence des modifications possibles sur ce type de nanoparticules qui en fait un bon agent théranostic ¹⁷. L'utilisation de dendrimère de polyester à base de manganèse, permet par exemple, de libérer des ions manganèse après dégradation par les cellules tumorales, et ainsi l'obtention de signaux puissants en IRM et l'initiation de la réaction de Fenton pour induire la mort de ces cellules ¹⁸.

- **Les polymérosomes**

Les polymérosomes sont des auto-assemblages de blocs de co-polymères qui peuvent transporter des molécules hydrophobes ou hydrophiles et de façon compartimentée. Par exemple, un polymérosome a été synthétisé pour transporter à la fois du paclitaxel dans sa membrane hydrophobe et de la doxorubine dans le compartiment hydrophile. Ces polymérosomes, injectés par voie intraveineuse à des souris immunodéprimées porteuses de xénogreffe sous-cutanée de cellules cancéreuses du sein MDA-MB231, induisent une

régression tumorale supérieure au cocktail des deux chimiothérapies libres ¹⁹. L'intérêt de telles structures est de pouvoir les charger avec de grandes quantités de molécules et agents : chimiothérapies, nanoparticules inorganiques, *etc.* ²⁰ Ils peuvent également être modifiés/élaborés pour répondre à des stimuli, ce qui permet alors de contrôler la délivrance de la molécule chargée. En effet, comme détaillé dans la revue de Meng et ses collaborateurs, ces structures peuvent répondre à des variations de pH, de température, de potentiel redox, des stimuli lumineux, des forces électrostatiques, des champs magnétiques, des ultrasons, *etc.* ²¹

En conclusion, le principal avantage des nanoparticules organiques reste leur faible toxicité. Elles sont principalement utilisées pour la délivrance de médicaments, en limitant le contact de la molécule toxique avec l'environnement, réduisant ainsi sa toxicité avant d'atteindre sa cible. En revanche, le principal inconvénient des NP organiques est leur courte demi-vie, en raison de leur reconnaissance par le système réticulo-endothélial. Toutefois, ce désavantage peut être amélioré par l'enrobage de PEG qui ralentit alors leur clairance (cf partie I.3 – Biodistribution des nanoparticules).

I.2.b – Les nanoparticules inorganiques

Cette famille de nanoparticules comprend toutes les nanoparticules qui ne sont pas constituées de carbone ou de matières organiques (figure 2). Comme pour les nanoparticules organiques, l'intérêt pour les nanoparticules inorganiques est grandissant dans la communauté scientifique et notamment en oncologie. Ces nanoparticules offrent plusieurs atouts comme leur biocompatibilité et la possibilité d'être façonnées au besoin (forme, taille, greffage, *etc.*), ce qui en fait un outil potentiel en imagerie et/ou en thérapie anticancéreuse ²².

Nous développerons, dans ce chapitre, les nanoparticules inorganiques d'oxyde de fer, d'or et de carbone, qui sont les plus utilisées actuellement dans la recherche pour des applications cliniques.

- Les nanoparticules d'oxyde de fer

Les nanoparticules d'oxyde de fer ont des caractéristiques très intéressantes pour le diagnostic par imagerie médicale et pour la thérapie ²³ *via* les stratégies d'hyperthermie magnétique ²⁴ et de thérapie photothermique (PTT) après stimulation par un champ magnétique

alternatif à haute fréquence ou un laser, respectivement ²⁵. Nous les développerons plus en détail dans la partie II – Les nanoparticules magnétiques en nanomédecine.

- Les nanoparticules d'or

Grâce à leurs propriétés optiques et de résonance plasmonique de surface, les nanoparticules d'or, sont étudiées en tant qu'agent photothermique : après stimulation/activation par laser, elles génèrent de la chaleur. De plus, elles peuvent être synthétisées sous plusieurs formes : nanosphère, nanocoquille, nanotige, *etc.* Ces NP ont montré une bonne efficacité en thérapie anti-tumorale photothermique (PTT), stratégie basée sur l'utilisation de nanoparticules générant de la chaleur déclenchant l'apoptose *via* l'activation de la caspase 9 et 3, suite à l'application externe d'un laser ²⁶⁻²⁹. Les NP d'or sont également utilisées pour développer des approches de thérapies photodynamiques (PDT) basées sur l'utilisation d'un photosensibilisateur qui, exposé à des longueurs d'onde spécifiques, va produire des espèces réactives de l'oxygène (ROS).

La charge de surface négative des NP d'or les rend également facilement modifiables. Il est ainsi relativement facile d'y greffer des médicaments ou des ligands permettant un ciblage des cellules cancéreuses ou de la tumeur ³⁰. Par exemple, une nanoplateforme composée d'une nanoparticule d'or vectorisée par un anticorps anti-MIA (inhibitrice du mélanome) dirigé contre un antigène surexprimé par cette lignée cancéreuse et fonctionnalisée avec le photosensibilisateur ZnPcS4 a permis un ciblage actif et une meilleure internalisation du photosensibilisateur complexé à la NP dans les cellules ciblées par rapport au photosensibilisateur seul. L'excitation ultérieure par laser de la nanoplateforme a induit un taux supérieur de mortalité des cellules de mélanome métastatique A375, comparativement au photosensibilisateur libre (respectivement une diminution de viabilité cellulaire de 84% vs 46%) ³¹.

Les nanoparticules d'or ont également été étudiées comme vecteur de médicaments. Les molécules médicamenteuses sont alors greffées sur les NP d'or et délivrées dans le site tumoral par ciblage passif *via* l'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention) ou par ciblage actif (cf partie I.4 – Ciblage des nanoparticules). De plus, les nanoparticules d'or peuvent être utilisées comme outil de diagnostic grâce à leurs propriétés physiques et optiques intéressantes pour ce domaine. En effet, grâce à leur effet de résonance plasmonique (SPR), elles ont une absorption optique élevée, ce qui en fait de bons agents de contraste ³².

- Les nanotubes de carbone

Ces nanoparticules possèdent des caractéristiques physico-chimiques intéressantes telles que leur résistance à la tension et leur conductivité thermique et électrique. Cela en fait un outil intéressant dans divers domaines et notamment pour la délivrance de médicament et la PTT. De plus, ils peuvent être vectorisés pour cibler sélectivement les cellules cancéreuses. Par exemple, des nanotubes de carbone vectorisés avec un anticorps anti-HER2 (récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain) peuvent induire une destruction sélective des cellules cancéreuses exprimant le récepteur HER2 après irradiation par laser à 808 nm ³³.

Les nanotubes de carbone présentent également des propriétés optiques permettant leur utilisation pour le diagnostic ou d'être détecté par microscope optique. Par exemple, des nanotubes de carbones fonctionnalisés avec une protéine (anticorps monoclonaux 23C3) reconnaissant l'ostéoponine, converti en scFv (single chain variable fragment) permettant la détection de l'ostéoponine, biomarqueur du cancer de la prostate, ont été développés. Ils permettent de détecter ce biomarqueur à une concentration de 1 pg/mL, concentration largement inférieure aux immuno-essais utilisés actuellement pour sa détection ³⁴. Ces résultats *in vitro* laisse entrevoir des perspectives prometteuses pour l'utilisation des nanotubes de carbone dans le diagnostic du cancer.

I.2.c – Les nanoparticules hybrides et nanocomposites

Récemment, des nanoparticules dites "hybrides" ou "nanocomposites" ont été développées. Elles sont composées de différents types de nanoparticules inorganiques et/ou organiques, permettant alors de tirer avantage de ces différentes nanoparticules dans une même formulation, afin d'améliorer leur stabilité, leur biocompatibilité, permettre une libération mieux contrôlée, d'associer leur qualité en tant qu'agent de contraste pour le diagnostic ou qu'agent thérapeutique...

On peut citer, en exemple, le système de délivrance d'acides nucléiques lipide-ADN-AuNP, composé hybride de liposome et de nanoparticule d'or. Les nanoparticules d'or sont chargées en brins d'ADN permettant un compactage et un maintien de la stabilité du brin. Ce système permet une encapsulation plus efficace et en plus grande quantité des brins d'ADN, et une efficacité de délivrance augmentée ³⁵.

Oliveira et ses collaborateurs ont développé un polymérosome encapsulant à la fois des nanoparticules d'oxyde de fer et de la Doxorubicine. Exposées à un champ magnétique alternatif de haute fréquence (AMF, hyperthermie magnétique), les nanoparticules d'oxyde de fer présentes dans ces polymérosomes produisent de la chaleur, induisant la libération de la Doxorubicine encapsulée ³⁶.

Les MOF (Metal–Organic Frameworks) sont également des structures hybrides. Elles sont composées d'ions métalliques inorganiques reliés par des ligands organiques. Ils peuvent être utilisés pour de multiples applications, dont le diagnostic et la thérapie, en fonction de leur composition. Par exemple, des MOF encapsulant de la doxorubicine et des nanoparticules d'oxyde de fer ont été développés. Ils peuvent être aussi bien utilisés pour la détection par IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) ou comme agent thérapeutique. Injectés par voie intraveineuse à des souris porteuses de tumeur sous-cutanées de cellules HeLa, ils s'accumulent dans les tumeurs, sont visualisables par IRM grâce aux nanoparticules d'oxyde de fer, et libèrent progressivement la doxorubicine, car sensibles au pH, entraînant une diminution du volume tumoral (200 mm³ pour les souris traitées avec les MOF versus > 800 mm³ chez les souris injectées avec du PBS) ³⁷.

I.3 – Biodistribution des nanoparticules

Comme nous l'avons évoqué précédemment, les nanoparticules peuvent présenter des propriétés physico-chimiques très différentes : composition, taille, forme, revêtement, chimie de surface, *etc.*, qui peuvent être modifiées afin d'obtenir différentes caractéristiques et de répondre à diverses exigences. L'objectif premier pour la nanoparticule est d'atteindre sa cible en quantité suffisante. Généralement, les nanoparticules sont destinées à des injections intraveineuses. Lorsque la nanoparticule est dans la circulation sanguine, elle rencontre un environnement différent en termes de pH, de température, *etc.* Ces conditions sont donc en prendre en compte puisqu'elles peuvent notamment modifier les propriétés physico-chimiques de surface des nanoparticules.

L'augmentation du temps de circulation des nanoparticules leur permet d'atteindre plus efficacement le tissu-cible. Cependant, leurs propriétés vont dicter leur devenir dans le corps. Lorsqu'elles sont dans la circulation sanguine, les nanoparticules vont rencontrer premièrement des protéines d'opsonine (responsables de l'opsonisation). Les nanoparticules dont la taille est

supérieure à 100 nm sont les plus susceptibles d'être opsonisées. Elles deviennent alors visibles pour le système phagocytaire mononucléaire entraînant leur élimination par phagocytose en quelques heures seulement³⁸. Les nanoparticules très petites, inférieures à 10 nm peuvent être filtrées et éliminées par la filtration rénale^{38,39}. Une taille de nanoparticule entre 10 et 100 nm permet alors d'avoir un temps de circulation dans le sang supérieur⁴⁰.

La charge des nanoparticules est également un paramètre important. En effet, les nanoparticules cationiques sont phagocytées plus rapidement que les nanoparticules anioniques suivies des nanoparticules neutres⁴¹.

La forme des nanoparticules influence aussi leur temps de circulation. Les nanoparticules non sphériques, comme les nanoparticules cubiques, sont nettement désavantagées. En effet, des simulations, permettant de visualiser le transport dynamique et l'adhésion des nanoparticules à la paroi vasculaire sous un écoulement de cisaillement pour simuler le flux sanguin, en utilisant la méthode de dynamique brownienne couplée à un modèle de cinétique d'adhésion *via* la plate-forme IFEM (Immersed Finite Element Method), montrent que les nanoparticules non sphériques adhèrent plus facilement à la paroi des vaisseaux et ont donc plus de difficultés à circuler et atteindre leur cible⁴². De même, comme le résume la revue de Toy et ses collaborateurs, la forme des nanoparticules impacte sa biodistribution, son absorption par les macrophages, sa capacité à se fixer à sa cible (lors de ciblage), l'efficacité thérapeutique, *etc.*⁴³. En effet, Barua et ses collègues ont comparé l'absorption de trastuzumab (anticorps monoclonal ciblant HER2) recouvrant des sphères ou des bâtonnets, sur des lignées cellulaires de cancer du sein. Ils ont montré que le greffage du trastuzumab sur des bâtonnets permet de multiplier l'absorption jusqu'à 6 alors qu'elle n'est multipliée que par 2 lorsque le trastuzumab est greffé à des sphères, en raison d'une meilleure avidité et spécificité se traduisant par une meilleure efficacité thérapeutique⁴⁴.

Pour finir, la nature et la densité du ligand de ciblage autour de la nanoparticule sont également des caractéristiques essentielles. Des simulations ont montré que des nanotiges présentant un greffage faible de 15 ligands ne permet pas une force d'adhésion suffisante pour retenir la nanotige contrairement à celles greffées de 120 ligands⁴². Ensuite, leur internalisation aussi est impactée. Des nanocapsules magnétiques ciblant HER2, grâce à anticorps monoclonal humanisé : trastuzumab (Tra) ont été utilisées sur des cellules SKBR3, cellules du cancer du sein, surexprimant HER2. Les nanocapsules vectorisées avec $1,62 \times 10^{17}$ molécules de Tra par gramme de nanoparticules présentent une efficacité de ciblage entre 9 et 13 fois supérieures, par rapport aux mêmes nanoparticules vectorisées avec seulement $2,85 \times 10^{15}$ ⁴⁵.

De façon générale, les nanoparticules sont séquestrées principalement dans les cellules de Kupffer du foie (la plus importante population de macrophages du corps) et dans les macrophages de la rate, après injection par voie intraveineuse. En effet, entre 30 et 99 % des nanoparticules seront séquestrées dans le foie après leur injection ⁴⁶. Pour limiter ce processus, les nanoparticules peuvent être enrobées de PEG, polymère neutre et hydrophile, afin de les rendre furtive vis-à-vis des macrophages. C'est en 1997 qu'Abuchowski décrit, pour la première fois, les effets de la PEGylation pour améliorer la distribution de médicaments ⁴⁷, et c'est en 1990 que la FDA approuve le premier médicament PEGylé : Adagen® (adénosine désaminase PEGylée) ⁴⁸. Depuis, les études se multiplient pour affiner la PEGylation (densité, charge, *etc.*) ⁴⁹.

En cancérologie, seulement 0,7% des nanoparticules atteignent la tumeur ⁵⁰. Au niveau de la tumeur, les nanoparticules peuvent ensuite présenter une distribution hétérogène. La matrice extracellulaire plus ou moins dense, la perfusion sanguine plus ou moins importante, *etc.*, participent à cette variabilité de répartition.

Globalement, les nanoparticules présentant une biodistribution idéale, c'est-à-dire capable d'atteindre le tissu-cible en minimisant la séquestration par le système réticulo-endothélial, auraient une taille comprise entre 10 et 100 nm, de forme non sphérique (bâtonnet par exemple), avec un enrobage de PEG permettant la neutralité de la charge, l'hydrophilie et l'échappement vis-à-vis du système réticulo-endothélial (RES). Mais ces propriétés seront à nuancer en fonction de l'application recherchée. Enfin, afin d'augmenter le ciblage du tissu-cible, par exemple une tumeur, puis l'internalisation dans les cellules cibles, différentes stratégies de ciblage peuvent être développées.

I.4 – Ciblage des nanoparticules

La plupart des chimiothérapies conventionnelles ont un faible poids moléculaire (moins de 1000 Da). Leur pharmacocinétique n'est donc pas idéale puisqu'elles peuvent s'extravaser très facilement par les vaisseaux sanguins des tissus sains (fenestration ~5 nm) et s'accumuler dans les organes et tissus de façon non spécifique, entraînant des effets indésirables pour le patient ⁵¹.

Or, grâce à certaines caractéristiques très spécifiques des tissus cancéreux, il est possible de développer des nanomédicaments, encapsulant des agents chimiothérapeutiques et présentant

une plus grande taille, pour parvenir à cibler plus spécifiquement les tissus tumoraux dont les vaisseaux présentent de larges fenestrations (jusqu'à plusieurs centaines de nanomètres)⁵². Les nanoparticules organiques ou inorganiques développées pour des applications en cancérologie sont délivrées sur le site tumoral *via* deux principaux mécanismes : un ciblage passif, appelé effet EPR (enhanced permeability and retention) ou un ciblage actif. Nous mentionnerons également une troisième méthode de ciblage qui concerne plus particulièrement les nanoparticules magnétiques : le "guidage" magnétique.

I.4.a – Le ciblage passif : effet EPR

La plupart des nanoparticules utilisées dans la délivrance de médicaments anticancéreux reposent sur l'effet EPR (figure 4). L'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention), décrit pour la première fois par Matsumura et Maeda, est notamment dû à une perméabilité plus importante des vaisseaux tumoraux. Cela s'explique par différents mécanismes. La prolifération cellulaire incontrôlée au niveau du site tumoral induit un stress compressif et hypoxique, provoquant alors la synthèse de facteurs de croissance angiogéniques, comme le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF)⁵⁴ également connu pour améliorer la perméabilité vasculaire. De plus, les vaisseaux sanguins sont anormaux : forte prolifération de cellules endothéliales et défaut de soutien de la part des péricytes, conduisant à la formation de fenestrations plus grandes (pouvant aller jusqu'à ~500 nm) que dans les tissus sains⁵⁵. De plus, le drainage lymphatique non fonctionnel provoque une rétention importante des nanoparticules au niveau des tumeurs^{55,56}. Tout ceci favorise l'accumulation des nanoparticules dans la tumeur. Le Doxil, une formulation de Doxorubicine encapsulée dans une nanoparticule liposomale, présente non seulement une demi-vie plasmatique (2 à 3 jours) largement supérieure à la doxorubicine libre (quelques minutes)⁵⁷, mais également une accumulation accrue dans les tumeurs grâce à l'effet EPR⁵⁸ et une accumulation moindre dans les tissus sains comparativement à la Doxorubicine libre. Globalement, on considère que, pour que l'effet EPR soit avantageux pour la nanoparticule tout en limitant la clairance rénale, les nanoparticules doivent avoir une taille comprise entre 10 et 100 nm.

Néanmoins, la nanothérapie anticancéreuse basée uniquement sur l'effet EPR présente quelques inconvénients. Premièrement, au niveau du microenvironnement tumoral, la pression interstitielle peut être relativement élevée, induisant une diminution de la pénétration et de la

diffusion des nanoparticules dans la tumeur donc une répartition hétérogène. De plus, au cours du temps et/ou en fonction des patients, la perméabilité des vaisseaux au niveau de la tumeur peut varier, influençant donc la distribution intra-tumorale des nanoparticules ^{59,60}.

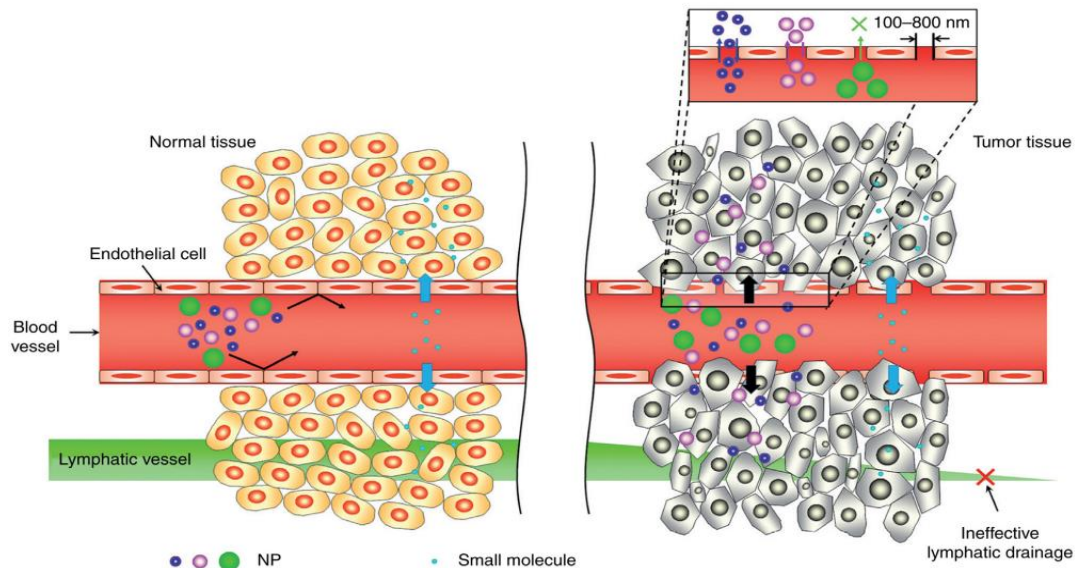


Figure 4 : Représentation schématique de la différence de pénétration des nanoparticules dans un tissu normal (à gauche) ou dans un tissu tumoral (à droite) ¹.

I.4.b – Le ciblage actif par vectorisation

L'objectif d'une stratégie de ciblage actif est de permettre à la nanoparticule d'atteindre sa cible, de s'accumuler plus efficacement dans le tissu-cible, telle qu'une tumeur, tout en conservant ses caractéristiques thérapeutiques. La majorité des stratégies de nanothérapie ciblée repose sur l'utilisation d'un ligand, d'un anticorps, *etc.*, aillant une affinité élevée pour un antigène ou un récepteur exprimé ou surexprimé par la tumeur.

On peut notamment citer le récepteur EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), surexprimé dans de nombreux cancers et donc utilisé pour de nombreuses études de ciblage ⁶¹. Xian-Bao Wang et Hai-Yan Zhou ont utilisé le cétuximab, un anticorps monoclonal ciblant l'EGFR pour vectoriser des nanoparticules chargées en Gemcitabine ⁶². Ils ont montré que la libération de Gemcitabine par ces nanoparticules est dépendante du pH et se fait de façon plus rapide dans un milieu acide proche du pH des cellules cancéreuses, par rapport à un milieu dont le pH correspond à celui des cellules saines. Ils ont également mis en évidence que ce système permet une internalisation plus importante des nanoparticules dans les cellules A549 (cellules cancéreuses du poumon) exprimant l'EGFR, par rapport aux nanoparticules non

fonctionnalisées (sans cétuximab). Des plus, ces nanoparticules vectorisées induisent une mortalité des cellules cancéreuses supérieure à la Gemcitabine libre ⁶². Un second exemple de ciblage actif efficace est représenté par le développement d'un liposome chargé en diacéréine, un anti-inflammatoire, vectorisé par un analogue synthétique de la somatostatine pour cibler les cellules cancéreuses du sein surexprimant le récepteur de la somatotatine SSTR2. Son efficacité a été analysée sur des souris porteuses de xéno greffe de cancer du sein MDA-MB-231 après injection intraveineuse : le liposome vectorisé induit une inhibition de la croissance tumorale supérieure à la diacéréine encapsulée dans le liposome non-vectorisé, elle-même supérieure à la diacéréine libre ⁶³.

Des nanoparticules peuvent également être développées pour cibler le microenvironnement tumoral et notamment les CAF (Cancer Associated Fibroblast). Ces approches sont pertinentes puisqu'il a été montré que les CAF soutiennent la croissance tumorale ⁶⁴ (cf partie II.3.a - Les CAF). En effet, les CAF produisent et sécrètent des facteurs de croissance, des cytokines et des chimiokines qui favorisent l'inflammation et la résistance des cellules cancéreuses aux traitements ; ils sécrètent également des protéines de la matrice extracellulaire. C'est dans ce contexte que Chen et ses collaborateurs ont développé une nanoparticule liposomale capable de cibler spécifiquement les CAF. Cette nanoparticule est chargée en Navitoclax (inhibiteur de l'activité anti-apoptotique de BCL-2 et BCL-XL) et vectorisée par un petit peptide FH qui se lie à la ténascine C, une protéine principalement exprimée par les CAF. Leur étude a permis de mettre en évidence que la vectorisation de ces nanoparticules par FH permet une accumulation plus importante et plus longue au niveau des tumeurs HepG2 (lignée cellulaire de carcinome hépatocellulaire humain) implantées chez des souris ⁶⁵, ainsi qu'un remodelage du microenvironnement tumoral caractérisé par une réduction de la matrice extracellulaire, une amélioration du flux sanguin permettant, par la suite, une meilleure infiltration des agents thérapeutiques ⁶⁶.

Néanmoins, des défis persistent. En effet, les cibles sont principalement des biomarqueurs tumoraux puisqu'ils sont surexprimés dans les tumeurs et même si ce choix est pertinent, il peut ne pas suffire pour garantir une captation suffisante des nanoparticules par les tumeurs. Ce paramètre est donc à prendre en compte lors du choix des couples ligand / récepteur. De même, il est maintenant largement admis que les tumeurs, comme leurs métastases, présentent une hétérogénéité très large. Or, les principales études portent sur des nanoparticules vectorisées par un ligand unique. Ces éléments sont donc à prendre en considération lors de l'évaluation des études de ciblage des nanoparticules. De plus, avant d'atteindre la tumeur ou la cellule tumorale, la nanoparticule devra franchir plusieurs barrières,

comme la barrière endothéliale, le microenvironnement tumoral. Il semble donc intéressant de s'orienter vers le développement de nanoparticules multiciblées / multivectorisées, voire personnalisées, pour permettre à la nanoparticules de franchir les différentes barrières, d'atteindre plus efficacement sa cible, de palier à l'hétérogénéité intra-tumorale et inter-patients, pour potentialiser ses effets thérapeutiques et remédier à la mise en place de résistances de la part des tumeurs ^{67,68}.

I.4.c – Guidage magnétique

Dans le cas particulier des nanoparticules magnétiques, des études sont en cours afin d'utiliser leurs propriétés physiques pour améliorer, par exemple, le ciblage d'une tumeur ⁶⁹. Les nanoparticules magnétiques peuvent être attirées par un aimant permanent placé sur la tumeur (figure 5). Cependant, cette approche présente certaines limitations puisque la tumeur doit être située à peu de distance de la surface du corps.

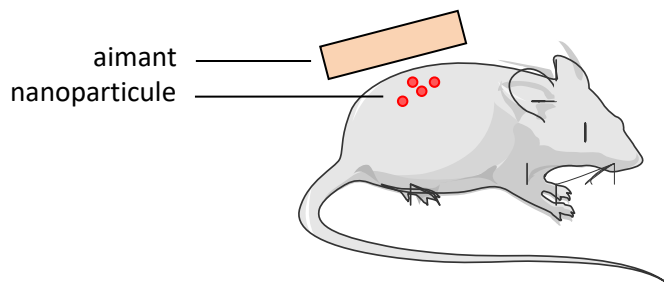


Figure 5 : Représentation schématique d'un ciblage de nanoparticules magnétiques à l'aide d'un aimant permanent unique.

Quelques stratégies ont alors émergé pour permettre un guidage vers des tumeurs plus profondes. Par exemple, une étude a montré que des nanoparticules de fer pouvaient s'accumuler préférentiellement dans les zones souhaitées grâce à l'utilisation de plusieurs aimants fixés sur les souris (figure 6). Les auteurs de cette étude voulaient mettre en évidence la faisabilité de cette stratégie dans le but de montrer qu'il serait envisageable d'élaborer des vêtements possédant des aimants disposés de façon très spécifiques (en fonction d'analyses préalables sur la localisation de la tumeur du patient, *etc.*), afin d'orienter le plus précisément possible les nanoparticules dans la tumeur du patient ⁷⁰ (figure 6).

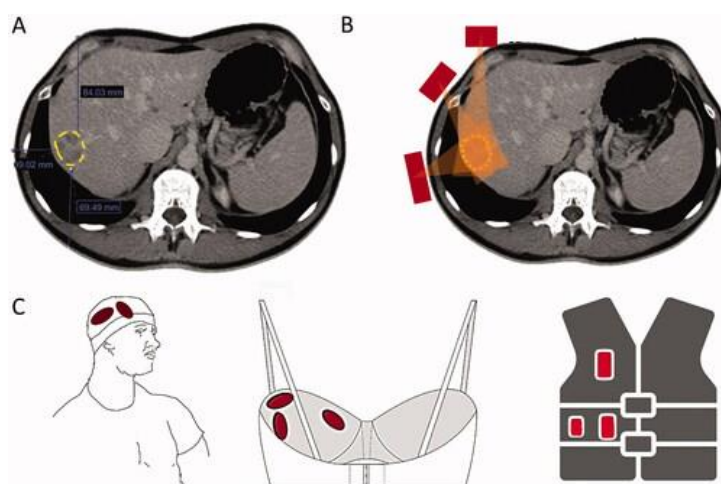


Figure 6 : Concept de guidage magnétique de IONP liées à un médicament pour les tumeurs solides. (A) Mesures d'une tumeur du foie : la taille et l'emplacement sont déterminées à partir d'images de tomodensitométrie abdominale. (B) Les paramètres du champ magnétique sont calculés sur la base de l'imagerie. Rectangles rouges – les aimants ; Triangle orange - le champ magnétique ; Cercle jaune pointillé – la tumeur. (C) Vêtements potentiels pour l'application du champ magnétique externe (chapeau, soutien-gorge, gilet, etc.) ; ils comportent des aimants (indiqués en rouge) dans différentes positions et tailles ⁷⁰.

Néanmoins, à l'heure actuelle les systèmes de guidage de nanoparticules par aimants ne sont pas encore au point et ne permettent pas des ciblage précis ⁶⁹. De plus, cette stratégie de ciblage ne semble envisageable que pour les tumeurs superficielles pour le moment.

I.5 - Internalisation cellulaire

Lorsque les nanoparticules ont atteint le tissu-cible, leur internalisation dans la cellule-cible peut être nécessaire pour produire l'effet anti-tumoral. Il leur faut donc passer la membrane plasmique. Plusieurs voies d'internalisation des nanoparticules sont possibles : l'endocytose dépendante des clathrines ⁷¹, qui est la voie d'entrée principale des nanoparticules, l'endocytose dépendante des cavéolines, la macropinocytose et la phagocytose, principalement exercée par les cellules du système immunitaire dans le but d'éliminer des agents pathogènes. La famille des voies endocytaires regroupe les processus d'internalisation qui impliquent la formation d'une vésicule formée par la membrane plasmique dans laquelle se trouve le contenu endocyté.

Cependant, certaines nanoparticules peuvent également entrer directement dans la cellule, par voie non-endocytair, comme les nanoparticules lipidiques constituées de

membranes cellulaires par exemple ⁷² qui peuvent fusionner avec la membrane plasmique et relarguer leur contenu dans la cellule ⁷³.

Les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules ont des rôles primordiaux sur la voie d'internalisation dans la cellule. En effet, le tableau n°1 regroupe quelques études réalisées avec des nanoparticules ayant des caractéristiques différentes et les conséquences sur le type de voies d'internalisation. La taille, la forme, la chimie de surface et les propriétés mécaniques, sont des paramètres pouvant influencer le type d'internalisation des nanoparticules et sont donc autant de paramètres qui peuvent être modifiés en fonction de l'usage qui sera fait de la nanoparticule.

Propriété physico-chimique	Paramètre	Nanoparticules	Type de cellule	Mécanisme d'absorption	Caractéristiques importantes
Taille	5 à 100 nm	Ag	B16	Endocytose médiée par la clathrine	Absorption accrue des IP de plus grande taille ; plus petite membrane plasmique croisée plus rapide
Forme	Nanosphères et nanoétoiles	siRNA-conjugué-Au	U87 Glioblastome	Endocytose	Les sphères plus grandes (50 nm) et les étoiles (40 nm) montrent une absorption plus élevée
Corona	Protéines corona dures (HC) et molles (SC)	Silice et polystyrène durs et mous modifiés corona	THP-1 et endothélium du cerveau humain	Endocytose	Les interactions des protéines sur la surface NP influencent l'association cellulaire
Charge de surface	Positif, négatif et neutre	PEG-b-PLA	Caco-2 et épithélium de l'intestin grêle	Endocytose à médiation par la clathrine et la cavéoline	La charge positive améliore l'absorption, le transport et la distribution
Hydrophobie	Nanogels	Système polymère amphiphile à hydrophobicité variée	Cellules THP monocytaires	Transport passif	L'hydrophobicité des réseaux polymères a un impact sur la liaison et l'absorption des protéines
Liaison au ligand	Points quantiques multivalents 15–20 nm	Points quantiques fonctionnalisés au galactose	HepG2	Endocytose médiée par les cavéoles et la clathrine	La multivalence du galactose, un facteur clé dans le mécanisme d'absorption
Propriétés mécaniques	Rigidité du polymère	PLGA-PLA enveloppé de lipides fonctionnalisés par ganglioside (GM3)	Macrophages exprimant CD169	Phagocytose actine-dépendante	La rigidité du noyau influence l'absorption et la localisation des NP

Tableau 1: Quelques études mettant en évidence l'influence des propriétés physico-chimiques sur le mécanisme d'internalisation des nanoparticules⁷⁴.

I.6 – Elimination / dégradation

Afin d'utiliser les nanoparticules en tant que médicament, il est important d'un point de vue réglementaire d'en connaître les voies d'élimination. Les petites nanoparticules sont pour la plupart biodégradables et/ou leur petite taille (inférieure à 5 nm) permet une élimination

rénale ⁷⁵. Les nanoparticules plus grandes (supérieures 5,5 nm) sont éliminées préférentiellement par voie hépatobiliaire ⁷⁶.

Pour ce qui est des nanoparticules d'oxyde de fer, après dégradation, les ions fer entre dans l'homéostasie de cet oligo-élément du corps humain (cf partie II – Les nanoparticules magnétiques en nanomédecine) ⁷⁷.

I.7 - Applications

Comme nous l'avons déjà évoqué, l'un des atouts majeurs des nanoparticules est qu'elles peuvent être façonnées pour de multiples applications. Elles sont utilisées pour le diagnostic en tant que biosenseur ou agent de contraste et pour la thérapie *via* la délivrance de médicaments, l'hyperthermie magnétique, l'ablation mécano-induite, *etc.* Lorsqu'une nanoparticule présentera des propriétés d'agent de diagnostic et thérapeutique, on parlera alors d'agent théranostique. Dans ce paragraphe, nous nous focaliserons sur les principales applications des nanoparticules en cancérologie : le diagnostic et la thérapie.

I.7.a - Applications en diagnostic

Selon l'organisation mondiale de la santé, environ 30% des cancers auraient pu être soignés s'il avait été diagnostiqué suffisamment tôt. On comprend alors l'intérêt de continuer à améliorer les méthodes de diagnostic en cancérologie. L'un des principaux enjeux dans le traitement du cancer est donc de parvenir à le traiter suffisamment tôt afin de garantir de meilleures chances de survie pour le patient. C'est pour cela que la nanomédecine s'est penchée sur l'utilisation de nanoparticules en tant qu'agent de diagnostic.

De façon plus générale, l'utilisation des nanoparticules dans le domaine du diagnostic est principalement focalisée sur les techniques d'imagerie médicale, utilisant leurs propriétés d'agent de contraste. L'IRM « repose sur le fait que, soumis à un champ magnétique, les atomes d'hydrogène contenus dans les molécules d'eau de notre corps changent d'orientation puis reviennent à leur position initiale en émettant un signal électrique. La vitesse avec laquelle ils reviennent à leur orientation naturelle est fonction de la densité des organes et des tissus qui composent le corps. Des détecteurs analysent les infimes champs électriques créés par ces atomes d'hydrogène et les utilisent pour recréer une image en 2D (une "tranche") ou en 3D (en compilant les tranches) », d'après le Vidal. C'est une technique d'imagerie non invasive,

largement utilisée en clinique pour le diagnostic de nombreuses maladies dont le cancer. En effet, elle ne nécessite pas d'injection de radio-isotope ou de rayonnement, mais offre malgré tout une bonne résolution de contraste surtout pour les tissus mous. Les nanoparticules d'oxyde de fer (IONP) sont privilégiées pour l'imagerie par IRM grâce à leur activité superparamagnétique, mais aussi pour leur très bonne biocompatibilité et leur faible coût de production (cf partie II.2.a - Agent de diagnostic).

Des nanoparticules fluorescentes ou luminescentes peuvent être également utilisées pour le diagnostic. En effet, les nanoparticules s'accumulent préférentiellement dans les tumeurs *via* l'effet EPR après une injection par voie intraveineuse⁷⁸ ou intrapéritonéale, comme montré par Sun et ses collaborateurs. Dans cet exemple, la fluorescence des nanoparticules permet alors un suivi et une évaluation de leur biodistribution par imagerie à fluorescence^{78,79} (figure 7).

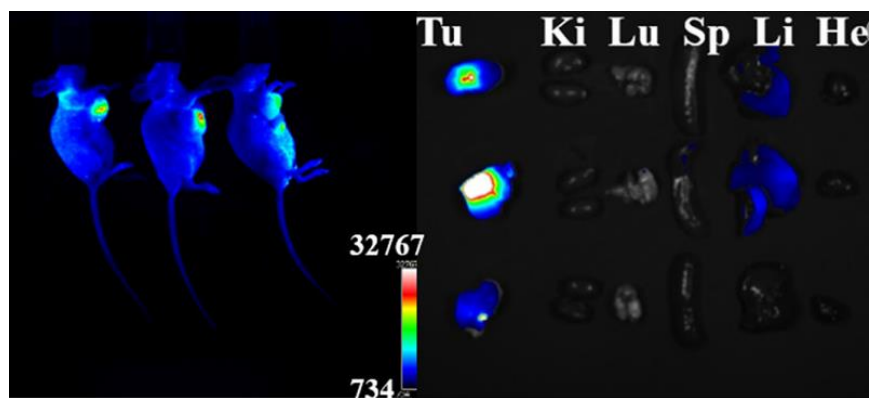


Figure 7 : Image *in vivo* de la localisation des nanoparticules fluorescentes accumulées dans la tumeur de la souris⁷⁸.

D'autre part, les nanoparticules peuvent servir de biosenseur afin de permettre une détection précoce et précise de cellules cancéreuses. Les nanoparticules d'or sont largement utilisées à cet effet⁸⁰. Par exemple, l'utilisation d'une microfibre optique a été combinée à des nanoparticules d'or vectorisées avec un anticorps anti-fœtoprotéine α (AFP), un marqueur tumoral. Les nanoparticules d'or se rapprochent de la fibre optique *via* l'interaction anticorps primaire et AFP (à la surface de la microfibre) – anticorps secondaire (à la surface des nanoparticules) (figure 8). Puis, grâce à leurs propriétés optiques, les nanoparticules d'or amplifient le signal traversant la microfibre. Li et ses collaborateurs ont ainsi montré que la sensibilité et la sélectivité de ce potentiel biomarqueur est améliorée *in vitro* et dans du sérum de veau fœtal, grâce à l'amplification du signal induit par les nanoparticules d'or⁸¹.

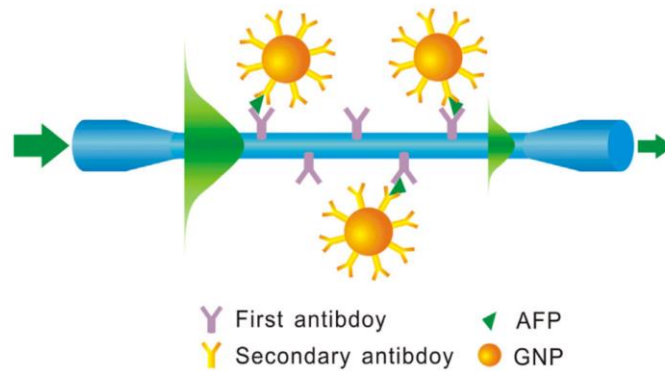


Figure 8 : Représentation schématique de la détection d'AFP par amplification de signal via l'utilisation de nanoparticules d'or ⁸¹.

D'autres méthodes de détection sont également possibles, notamment la détection par test colorimétrique, comme développé par Wang et ses collaborateurs pour la détection de la télomérase (surexprimé dans 85% des cancers) grâce à des nanoparticules d'or ⁸².

I.7.b – Applications thérapeutiques

Malgré des avancées remarquables dans la prise en charge et le traitement du cancer au cours des dernières années, les stratégies anti-cancéreuses, notamment chimiothérapeutiques, présentent encore de nombreux inconvénients ou limitations. Elles se basent principalement sur l'utilisation de molécules non ciblées qui peuvent induire malheureusement de multiples effets indésirables et des phénomènes de résistance. Les molécules chimiothérapeutiques ont un temps de circulation dans le corps relativement faible. La plupart sont hydrophobes et ont une taille inférieure au seuil de filtration des reins (10 nm) ou des fenestrations des vaisseaux des tissus sains (5 nm) ; ces molécules sont donc éliminées dans les urines, peuvent atteindre des tissus sains ou s'accumuler dans des tissus comme les muqueuses ou les cellules immunitaires, accentuant encore leurs effets indésirables.

La nanomédecine apparaît alors comme une opportunité pour palier à ce manque de spécificité des stratégies chimiothérapeutiques. En effet, grâce à leur encapsulation dans des nanoparticules dont les propriétés physico-chimiques peuvent être "customisées", il est alors possible de modifier la biodisponibilité, la cytotoxicité, la spécificité des agents anti-cancéreux

⁸³.

Le tableau n°2 ci-dessous récapitule des nanoparticules approuvées par la FDA dans le traitement du cancer et quelques informations comme leurs avantages, leurs indications, *etc.*

Nanostructure	Product™	Nanotechnology Platform	Drug	Nanoformulation Advantages	TME Targeting	Indication	Company	Approval (Year)
Lipid based nanoparticles	Doxil	PEGylated STEALTH® liposomes composed of MPEG-DSPE, HSPC, CHO.	Doxorubicin	↑ blood circulation time ↑ tumor uptake (EPR) ↓ cardiotoxicity	Cancer and stroma cells	Kaposi's sarcoma, ovarian Ca, multiple myeloma	Ortho Biotech	FDA (1995)
	Caelyx	PEGylated liposomal doxorubicin composed of MPEG-DSPE, HSPC, CHO	Doxorubicin	↑ blood circulation time ↑ tumor uptake (EPR) ↓ cardiotoxicity	Cancer and stroma cells	Metastatic breast Ca., ovarian Ca., Kaposi's sarcoma, and multiple myeloma	Schering-Plough	EMA (1996)
	DaunoXome	Citrate salt of daunorubicin encapsulated in non-pegylated liposomes composed of DSPC and CHO (2:1 MR)	Daunorubicin	↓ protein binding ↑ blood circulation time ↑ tumor uptake (EPR) ↓ cardiotoxicity	Cancer and stroma cells	Kaposi's sarcoma	Galen	FDA (1996)
	Myocet	Liposomal doxorubicin (non-PEGylated) composed of PC, CHO, citric acid, and NaOH	Doxorubicin	↑ blood circulation time ↑ tumor uptake (EPR) ↓ cardiotoxicity	Cancer and stroma cells	Metastatic breast Ca.	Teva UK	EMA (2000)
	Mepact	Liposomal mifamurtide (fully synthetic analogue of a component of Mycobacterium sp. cell wall) composed of POGP, DGPS, MS	Mifamurtide	↑ blood circulation time ↑ tumor uptake (EPR) ↓ toxicity	Macrophages	Osteosarcoma	Millenium	EMA (2009)
	Ameluz	Gel containing 5-aminolevulinic acid, E211, SoyPC, and PG	5-aminolevulinic acid	sustained release ↓ toxicity	Cancer and stroma cells	Superficial and/or nodular basal cell carcinoma	Biofrontera Bioscience GmbH	EMA (2011)
	Marqibo	Liposomal vincristine composed of SM and CHO	Vincristine	↑ blood circulation time ↑ tumor uptake (EPR) ↓ toxicity	Cancer and stroma cells	Acute lymphoid leukaemia	Spectrum	FDA (2012)
	Onivyde	Nanoliposomes composed of DSPC, CHO, MPEG-2000-DSPE	Irinotecan	↑ blood circulation time ↑ tumor uptake (EPR) ↓ toxicity	Cancer and stroma cells	Pancreatic Ca., Colorectal Ca.	Merrimack	FDA (2015)
Vyxeos	Nanoliposomes composed of DSPC, DEPG, and CHO	Daunorubicin Cytarabine	↑ blood circulation time, ↑ accumulation in bone marrow	Cancer and stroma cells	Acute myeloid leukaemia	Jazz Pharmaceuticals	EMA (2018)	
Protein-drug conjugates	Oncaspar	Covalent conjugate of L-asparaginase with mPEG, MSP, Na ₂ HPO ₄ , Heptahydrate, and NaCl	Pegaspargase	↑ blood circulation time ↑ tumor uptake (EPR)	Cancer cells	Acute lymphoblastic leukaemia	Les Laboratoires Servier	FDA (1994)
	Ontak	Recombinant cytotoxic protein composed of diphtheria toxin fragments A and B (Met1-Thr387)-His and human IL-2 (Ala1-Thr133)	Denileukin Diftitox	↑ blood circulation time ↑ tumor uptake (EPR) ↑ selectivity ↓ severe toxicity	Activated T-cells	Cutaneous T-cell lymphoma	Les laboratoires Servier	FDA (1999)
	Eligard	Polymeric matrix of leuprorelin acetate composed of PLGA (85:15) NMP and LA	Leuprorelin acetate	↑ blood circulation time ↑ tumor uptake (EPR)	Cancer cells	Prostate cancer	Recordati Industria Chimica e Farmaceutica	FDA (2002)
	Abraxane	Colloidal suspension without solvent of paclitaxel bound to albumin (active substance) in the form of a spherical nanoparticle	Paclitaxel	↑ Solubility ↑ blood circulation time ↑ tumor uptake (EPR) ↓ severe toxicity	Cancer and stroma cells	Breast Ca. Non-small lung Ca., Pancreatic Ca.	American Biosciencem, Inc.	FDA (2005)
	Kadcyla	Trastuzumab, covalently linked to DM1 via the stable thioether linker MCC	DM1 (or Emtansine)	↑ blood circulation time ↑ tumor uptake (EPR) ↑ selectivity ↓ toxicity	Cancer cells	HER2+ breast Ca.	Roche Genentech	EMA (2013) FDA (2013)
	Pazenir	Paclitaxel formulated as albumin bound nanoparticles. Powder for dispersion for infusion	Paclitaxel	↑ Solubility ↑ blood circulation time ↑ tumor uptake (EPR) ↓ severe toxicity	Cancer cells	Metastatic breast Ca., metastatic adenocarcinoma of the pancreas, non-small cell lung Ca.	Ratiopharm GmbH	EMA (2019)
Metallic nanoparticles	NanoTherm	Nanoparticles of superparamagnetic iron oxide coated with amino silane	Fe ₂ O ₃	↑ blood circulation time ↑ tumor uptake (EPR) -heat production under stimulation with EMF - teranostic properties	Residual cancer and stroma cells	Glioblastoma, prostate, and pancreatic Ca.	Magforce	EMA (2013)

Tableau 2 : Nanoparticles approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicines Agency (EMA) for the treatment of cancer. ⁸⁴.

Abréviations : ↑ : augmentation; ↓ : diminution; Ca.: cancer; MR: rapport molaire; MPEG-DSPE: N-(carbonyl-méthoxypolyéthylène glycol 2000)-1,2-distéaroyl-sn-glycéro-3-phosphoéthanolamine sel de sodium; HSPC: phosphatidylcholine de soja entièrement hydrogénée; DGPS: 1,2-dioléoyl-sn-glycéro-3-phospho-L-sérine; DSPC: distéaroylphosphatidylcholine; POGP: 1-Palmitoyl-2-oléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine; CHO : cholestérol; E211 : Benzoate de sodium; SoyPC: phosphatidylcholine de soja; PC: phosphatidylcholine; DSPC: 1,2-distéaroyl-sn-glycéro-3-phosphocholine; mPEG : Monométhoxypolyéthylène glycol; MPEG-2000-DSPE : polyéthylène glycol (MW 2000)-distéaroylphosphatidyléthanolamine terminé par le méthoxy; DEPG: Distéaroylphosphatidylglycero; PG: propylène glycol; SM: sphingomyéline; MSP: dihydrogénophosphate de sodium (monohydraté); MS: sel monosodique; Na₂HPO₄ : phosphate disodique ; NaCl: chlorure de sodium; NaOH : hydroxyde de sodium; PLGA: poly(acide lactique-co-glycolique); NMP: N-méthyl-2-pyrrolidone; et LA: acétate de leuprolide. ⁸⁴

Plusieurs stratégies anticancéreuses sont étudiées en nanomédecine, au niveau fondamental ou en clinique. Nous développerons dans ce paragraphe les stratégies de délivrance de médicaments, d'hyperthermie magnétique ou d'ablation magnéto-mécanique.

- **La délivrance de médicament**

Les nanoparticules lipidiques sont les plus utilisées en clinique pour la délivrance de médicaments (cf tableau 2). Elles ont de multiples atouts : l'encapsulation de molécules médicamenteuses dans le noyau hydrophile ou dans la bicouche lipidique hydrophobe, faible coût de production, etc. Le développement de la PEGylation a permis d'améliorer leur distribution au niveau des tissus-cibles. La PEGylation consiste en une fixation covalente du polyéthylène glycol aux molécules bioactives afin d'en améliorer la solubilité, la cinétique de distribution, mais également de la rendre non-immunogénique. Tout ceci dans le but d'accroître l'efficacité thérapeutique ⁸⁵.

C'est ainsi qu'en 1995, le Doxil® (figure 9), nanoparticule liposomale encapsulant la doxorubicine, est approuvé par la FDA avec pour indication le cancer ovarien, le sarcome de Kaposi lié au virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et le myélome multiple. Les études ont montré une meilleure délivrance *via* l'effet EPR (cf partie I.4.a – Le ciblage passif : effet EPR) du Doxil® par rapport à la doxorubicine libre au niveau de la tumeur ⁵⁸, permettant d'accroître son efficacité thérapeutique, avec une augmentation de la qualité et de la durée de vie des patients et une diminution des effets indésirables, démontrés lors d'un essai clinique de phase III sur des patientes atteintes d'un cancer du sein.

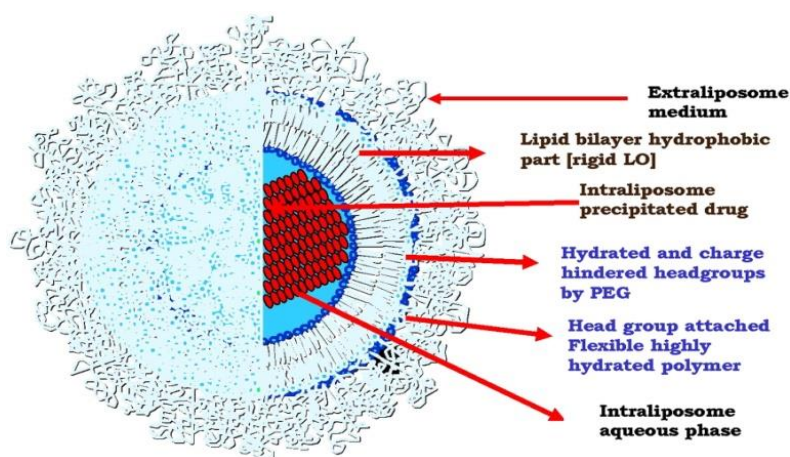


Figure 9 : Représentation schématique du Doxil ⁵⁸.

Depuis, d'autres agents chimiothérapeutiques ont été encapsulés dans des liposomes et certaines formulations ont été approuvées par la FDA (cf tableau 2). D'autres molécules chimiothérapeutiques font l'objet d'étude pour mettre en évidence l'intérêt de les délivrer *via* l'utilisation des nanoparticules, comme le topotécane dont la demi-vie est augmentée (de 5h à 12h) lorsqu'il est encapsulé dans un liposome ⁸⁶. Les nanoparticules lipidiques sont également utilisées en tant qu'adjuvants vaccinaux pour adresser l'ARNm de la protéine S du SARS-CoV-2 aux cellules humaines dans une stratégie de vaccination contre la pandémie du Covid-19 ⁸⁷, mais également pour de nombreux vaccins anti-cancéreux comme récapitulé dans la revue de Wen et al ⁸⁸.

Les liposomes peuvent être fonctionnalisés à leur surface afin d'améliorer leur ciblage par des petites molécules, des anticorps, des peptides ou des glucides ⁸⁹. La doxorubine liposomale fonctionnalisée avec un peptide SP5-2 qui se lie spécifiquement aux cellules cancéreuses du poumon (CPNPC) induit un meilleur ciblage (accumulation dans les cellules 4,8 fois supérieure à la forme libre de la doxorubicine et 2,1 fois supérieure à la forme liposomale non vectorisée) et une inhibition plus importante de la croissance tumorale que la doxorubine liposomale non vectorisée, sur des modèles de souris syngéniques porteuses d'une greffe sous-cutanée de cellules murines de carcinome pulmonaire Lewis LL/2 (tumeurs avec des masses 2,38 fois inférieures pour la forme liposomale vectorisée par rapport à la forme non vectorisée) ⁹⁰. Actuellement, un grand nombre d'études est mené pour, notamment, améliorer la capacité de ciblage et d'adressage des médicaments par les liposomes vers les tissus-cibles, permettre des

libérations déclenchées, contrôler la quantité de molécules libérées. Tout cela a conduit à de nombreux essais cliniques ⁹¹.

Les micelles qui ont pour avantage leur très bonne solubilité sont également étudiés pour l'adressage ciblé de molécules de chimiothérapie. Par exemple, des micelles polymériques d'acide polylactique (PLA), de PEG et de hydroxyéthylamidon (HES) ciblant la glycoprotéine transmembranaire CD44, biomarqueur des cellules souches cancéreuses (qui jouent un rôle vital dans la tumorigenèse, la progression tumorale, les métastases et la récurrence) ont été utilisés pour délivrer la chimiothérapie Emo encapsulée (Emo@CD44p-PM). Au contact du milieu tumoral plus acide que les tissus sains, la couche de PEG enrobant les micelles et sensible au pH se détache et entraîne l'exposition du peptide CD44 à la surface du micelle Emo@CD44p-PM, permettant ensuite une internalisation améliorée d'Emo et l'augmentation de l'apoptose des cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231 (36,3% d'apoptose pour les cellules traitées avec Emo seule contre 46,7% pour les cellules traitées avec Emo@CD44p-PM pendant 24h) ⁹². Des nanoparticules micellaires encapsulant du paclitaxel (Genexol-PM) induisent une radiosensibilisation *in vitro* sur les lignées cellulaires cancéreuses du poumon H460 et A549 et *in vivo* sur des souris porteuses d'une xénogreffe sous-cutanée de cellules H460 ou A549 après injection intraveineuse des nanoparticules. Cette étude faite en comparaison avec le Taxol (indiqué dans le traitement des cancers bronchiques et connu aussi pour ses effets radiosensibilisants), montre également que la formulation micellaire du paclitaxel présente une toxicité moins importante sur les tissus pulmonaires sains et une meilleure accumulation dans la tumeur ⁹³. Cette formulation de nanoparticules micellaires Genexol-PM a été approuvée pour une utilisation clinique en Corée. Depuis, d'autres études sont en cours pour étendre son utilisation à d'autres cancers en combinaison avec d'autres chimiothérapies, comme pour le traitement du cancer des voies biliaires non résectable ou métastatique en combinaison avec la gemcitabine ⁹⁴.

- **L'hyperthermie magnétique**

Cette technique consiste à utiliser des nanoparticules magnétiques qui chauffent lorsqu'elles sont exposées à un champ magnétique alternatif à haute fréquence (AMF) afin d'induire la mort des cellules tumorales ⁹⁵, délivrer des médicaments ⁹⁶. Ce phénomène s'appuie sur leurs caractéristiques physiques. Nous développerons cette stratégie dans un paragraphe ultérieur (cf partie II.2.b – Agent de Thérapie).

- **L'ablation mécanique magnéto-induite**

Cette stratégie s'appuie également sur des caractéristiques physiques des nanoparticules magnétiques, afin de provoquer un mouvement de celles-ci sous un champ magnétique particulier. Les forces mécaniques exercées par les nanoparticules magnétiques exposées à des champs alternatifs ou rotatifs à basses fréquences, principalement, peuvent être utilisées pour induire la délivrance de médicaments, la mort de cellules tumorales, le changement de conformation de certaines enzymes ⁹⁷. Cette stratégie sera développée également par la suite (cf partie II.2.b – Agent de Thérapie).

I.7.c – Potentiel théranostique

Actuellement, la recherche se penche sur le développement de nanoparticules pouvant être utilisées à la fois pour le diagnostic et la thérapie. C'est ainsi que le mot "théranostique" a vu le jour. Cela permet, par exemple, de visualiser la tumeur, puis de contrôler la libération d'une molécule médicamenteuse dans la tumeur et de suivre éventuellement les effets induits ⁹⁸. Les atouts de ce type d'outil sont multiples. Dans un premier temps, cela permet de visualiser la biodistribution des nanoparticules en temps réel, de détecter les tumeurs et les métastases et donc de mieux adapter la prise en charge thérapeutique des patients. Elle permet aussi d'évaluer l'accumulation du nanomédicament dans le tissu-cible de façon non invasive, sa répartition, de surveiller et/ou contrôler la libération du médicament ⁹⁹.

Khamruang Marshall et ses collaborateurs ont développé une nanoparticule polymérique recouverte de membrane de globules rouges pour favoriser la biocompatibilité, fonctionnalisée par la protéine CD326 (molécule d'adhésion reconnaissant le récepteur membranaire EpCAM surexprimé par les du cancer du sein MCF-7) et chargée en doxorubicine et en FITC (Fluorescein IsoThioCyanate) (en tant d'agent d'imagerie). Ils ont vérifié la spécificité de ciblage de ces nanoparticules grâce à la fluorescence du FITC et la délivrance de la doxorubicine de façon spécifique. ¹⁰⁰ (figure 10). Ceci met en évidence l'intérêt de ce type de stratégie permettant de suivre la distribution de la nanoparticule délivrant le médicament.

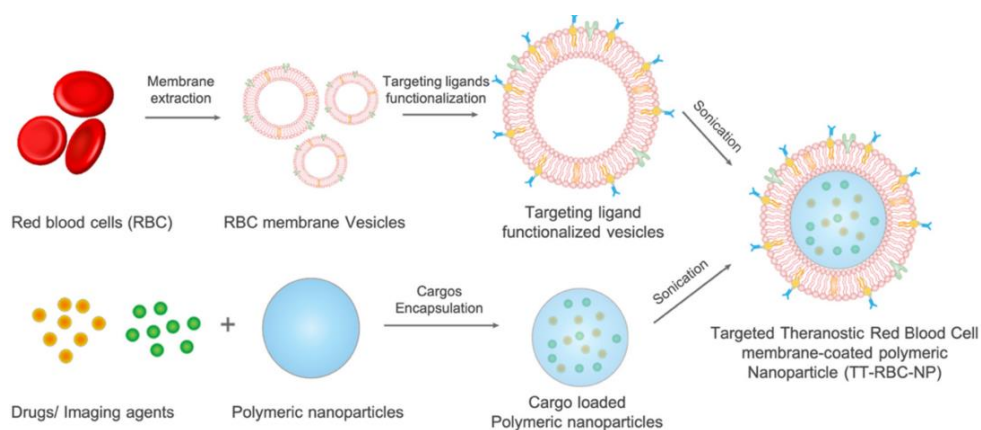


Figure 10 : Représentation schématique d'une nanoparticule à visée théranostique ¹⁰⁰.

II – LES NANOPARTICULES MAGNETIQUES EN NANOMEDECINE

Les nanoparticules magnétiques ont des caractéristiques très intéressantes qui ont amené de nombreux chercheurs à travailler sur leur utilisation en oncologie. Parmi elles, les nanoparticules d'oxyde de fer, capables de répondre à l'application de champs magnétiques ont de multiples atouts. Dans cette partie, après avoir défini les nanoparticules d'oxyde de fer, nous développerons leurs potentiels en tant qu'outil de diagnostic et/ou de thérapie dans le domaine de l'oncologie.

II.1 - Nanoparticule d'oxyde de fer

Les nanoparticules d'oxyde de fer sont au cœur de nombreuses études, ces dernières années. En effet, leur potentiel en tant que nanomédicament, vecteur de molécules thérapeutiques ou encore en tant qu'agent diagnostique n'est plus à démontrer. Leurs avantages sont multiples. De plus, elles peuvent être vectorisées par des ligands, peptides, anticorps et autres petites molécules.

Elles sont généralement constituées d'un noyau magnétique d'oxyde de fer constitué de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ou magnétite (Fe_3O_4) et sont recouvertes d'un ligand ou polymère (PEG, dextran, *etc.*) pour les stabiliser, permettre leur solubilisation dans des milieux aqueux et leur biocompatibilité. Les nanoparticules d'oxyde de fer sont, pour la plupart, super-

paramagnétiques, c'est-à-dire qu'elles ne possèdent pas d'aimantation par elles-mêmes mais qu'elles peuvent être manipulées par l'application de champ magnétique externe.

Les nanoparticules sont constituées de domaines composés de moments. Lors de l'application d'un champ magnétique, ces moments vont s'aligner en direction du champ magnétique :

- Dans le cas d'un champ magnétique alternatif ou rotatif à basse fréquence, la période d'excitation (oscillation du champ magnétique) est grande devant le temps de rotation des moments magnétiques. Les moments magnétiques ont donc le temps de suivre les changements de direction du champ. La courbe d'aimantation ne présente donc pas d'hystérésis. Les nanoparticules sont en mouvement et peuvent être utilisées pour exercer des forces mécaniques dans le but de tuer des cellules, par exemple.
- Dans le cas d'un champ magnétique alternatif à haute fréquence, la période d'excitation est petite devant le temps de rotation des moments magnétiques de la nanoparticule. Les moments magnétiques ne peuvent donc pas changer de direction aussi rapidement. La courbe d'aimantation présente donc un cycle d'hystérésis (figure 11). La chaleur dissipée est donnée en SAR (W/g) = $A.f$, où A est l'aire du cycle d'hystérésis et f la fréquence du champ magnétique alternatif. Cette libération d'énergie thermique dépend de la taille de la nanoparticule, du matériau et des paramètres du champ appliqué. Cette caractéristique de libération de chaleur, ou hyperthermie magnétique, est utilisée pour tuer des cellules, catalyser des réactions chimiques, *etc.*

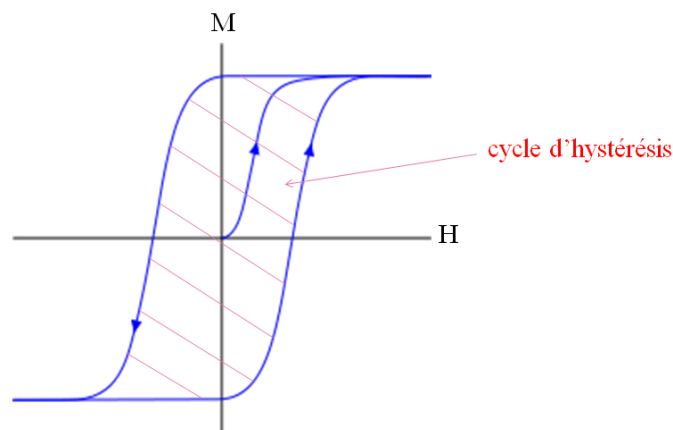


Figure 11: Courbe d'aimantation en fonction du champ magnétique avec cycle d'hystérésis.

Comme vu précédemment, certains paramètres comme la taille, la forme, la chimie de surface, la fonctionnalisation, *etc.*, peuvent faire varier la pharmacocinétique de la nanoparticule d'oxyde de fer, et donc impacter les effets sur les applications médicales. Il est

donc important d'en tenir compte lors de leur synthèse ¹⁰¹. Comme pour toutes les nanoparticules, les études de pharmacocinétiques ont montré que leur taille idéale se situe entre 10 et 100 nm afin de limiter la filtration rénale, d'une part, et la phagocytose par les macrophages, d'autre part. Cette taille permet également une meilleure transcytose des nanoparticules vers la tumeur. De plus, une charge négative ou neutre augmentera le temps de circulation de cette nanoparticule dans le corps ¹⁰².

Les nanoparticules d'oxyde de fer présentent une excellente biocompatibilité puisqu'après dégradation dans le lysosome, les ions fer sont libérés et stockés grâce à des protéines régulatrices du fer comme la ferritine, leur permettant ensuite d'entrer dans l'homéostasie de cet oligo-élément du corps humain ⁷⁷ (figure 12).

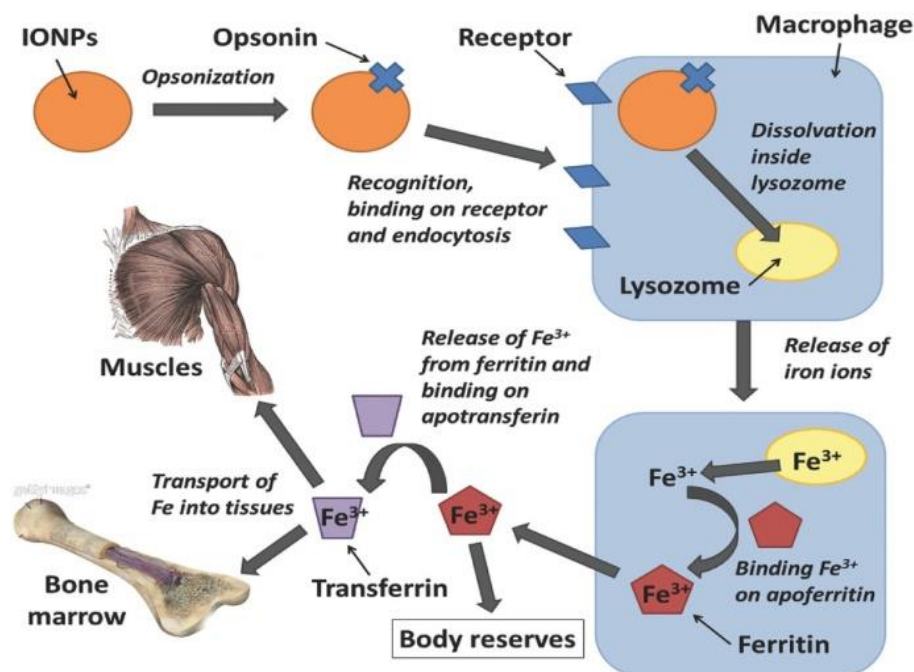


Figure 12 : Représentation schématique du devenir et de la dégradation des nanoparticules d'oxyde de fer dans le corps ⁷⁷.

Plusieurs voies d'administration sont utilisées en fonction des applications souhaitées : notamment la voie intraveineuse, la voie orale pour des imageries du tractus digestif par exemple, la voie intratumorale permettant d'injecter des quantités plus importantes de nanoparticules dans la tumeur à des fins thérapeutiques, la voie intrapéritonéale, la voie intrapulmonaire pour l'imagerie du poumon et le traitement du cancer du poumon.

De leur composition, taille, forme, caractéristiques physico-chimiques, *etc.*, vont dépendre leur(s) application(s) médicale(s), que nous développerons dans les prochaines parties (figure 13).

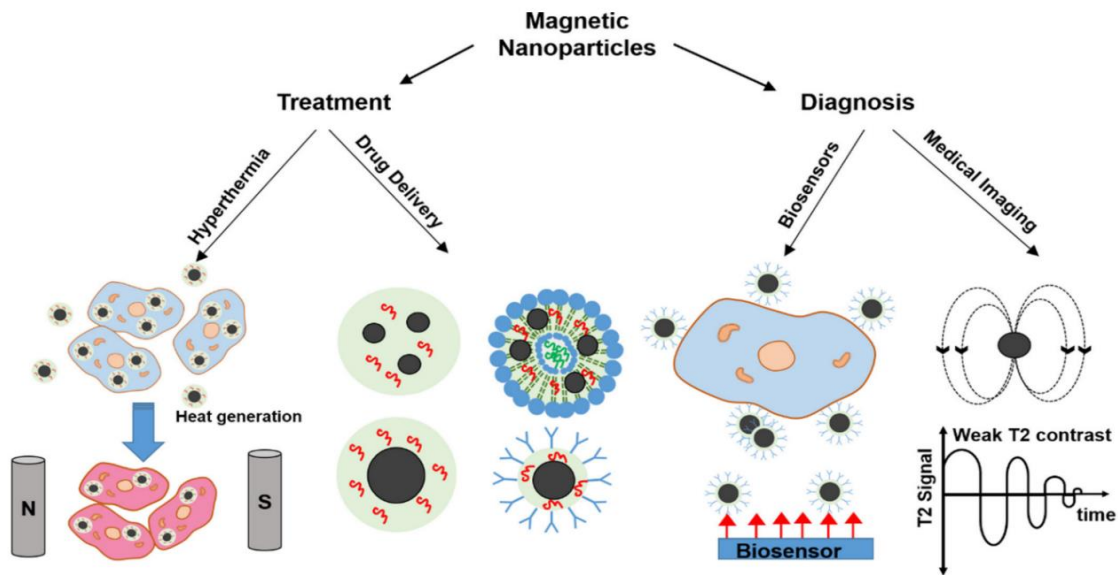


Figure 13 : Différentes formes de nanoparticules magnétiques et leurs applications en diagnostic ou en thérapie ¹⁰³.

II.2 - Applications : outil théranostic

Les nanoparticules d'oxyde fer (SPION) superparamagnétiques sont polyvalentes. Leurs caractéristiques physico-chimiques permettent de les utiliser dans différents domaines d'application comme le diagnostic en tant qu'agent de contraste en IRM ou en tant que biosenseur. De plus, ces nanoparticules ont la capacité de répondre à l'application de champs magnétiques. Cette réponse est variable, elle dépend à la fois des propriétés physiques des SPION, mais aussi des caractéristiques du champ appliqué. Cela permet d'envisager leur utilisation pour l'hyperthermie magnétique et l'ablation magnéto-mécanique.

Ces dernières années, plusieurs études ont mis en évidence que les SPION peuvent à la fois avoir un rôle d'agent de contraste et d'agent thérapeutique. Elles sont donc souvent qualifiées d'agent 'théranostique' ⁷⁷.

II.2.a - Agent de diagnostic

- Agent de contraste

Pour le diagnostic par IRM, les nanoparticules d'oxyde de fer présentent des atouts majeurs. Outre leur très bonne biocompatibilité et leur faible cout de production, c'est leur

activité superparamagnétique qui en fait les nanoparticules privilégiées pour une utilisation en tant qu'agent de contraste notamment pour l'imagerie par IRM. Un agent de contraste réduit la relaxation des protons de l'eau qui sont à proximité, induisant un contraste d'imagerie. L'atout des SPION est donc leur capacité à réduire le temps de relaxation T2. Les SPION sont donc plutôt des agents de contraste de type T2 donnant des images négatives. Des études sont en cours pour développer des nanoparticules en tant qu'agent de contraste T1 ¹⁰⁴.

Des nanoparticules d'oxyde de fer encapsulées dans un liposome ont été également développées. Après injection intraveineuse, elles s'accumulent dans la tumeur de souris xénogreffées (xénogreffe orthotopique de cellules MDA-MB-231) *via* l'effet EPR ; cette accumulation a pu être visualisée par imagerie IRM. Néanmoins, l'analyse de la biodistribution des nanoparticules, 24 heures après injection, révèle également une accumulation importante des nanoparticules dans la rate et le foie (entre 25 et 45%) contre moins de 5% dans la tumeur ¹⁰⁵.

De ce fait, des équipes se sont penchées sur l'utilisation des SPION pour l'imagerie du foie et de la rate. En effet, comme évoqué précédemment, les nanoparticules plus grosses (et/ou qui ne sont pas rendues suffisamment "furtives" pour le système immunitaire), vont être reconnues et opsonisées par des opsonines. Ceci les rend plus "visibles" par les macrophages et elles sont donc phagocytées par le système réticulo-endothélial (RES). Puis elles sont séquestrées principalement dans les cellules de Kupffer du foie (la plus importante population de macrophages du corps) et dans les macrophages de la rate (30 et 99 % des nanoparticules seront séquestrées dans le foie après leur injection) ⁴⁶ alors que les cellules cancéreuses n'ont pas cette activité phagocytaire. Le ferumoxide et le ferucarbotran sont deux formulations de SPION approuvées et utilisées en clinique pour l'imagerie du foie. A titre d'exemple, le ferumoxide est une solution colloïdale de SPION recouvertes par du dextran et mesurant entre 120 et 180 nm ; il est injecté par voie intraveineuse. Il suffit de quelques minutes pour que ces nanoparticules soient absorbées par les cellules du RES. 80% d'entre elles sont alors accumulées dans le foie et environ 10% dans la rate. Les parties hépatiques saines apparaissent plus sombres sur les images alors que les tissus cancéreux apparaissent sous forme de taches blanches.

- **Biocapteur / biosenseur**

Les nanoparticules magnétiques peuvent également servir de biocapteur ou biosenseur. L'avantage est qu'elles présentent une grande sensibilité et une faible limite de détection.

Par exemple, un détecteur capable de détecter des cellules très rares en circulation a été développé grâce à l'utilisation de nanoparticules MnFe_2O_4 . Les cellules cibles sont marquées magnétiquement, c'est-à-dire que si elles sont liées aux nanoparticules et qu'un champ magnétique est appliqué, les moments magnétiques générés peuvent être enregistrés par le détecteur. Des cellules rares peuvent ainsi être détectées dans des échantillons biologiques ¹⁰⁶.

II.2.b – Agent de Thérapie

Les nanoparticules magnétiques peuvent être contrôlées, activées lorsqu'elles sont soumises à un champ magnétique. Elles peuvent, par exemple, générer de la chaleur ou des forces mécaniques lorsqu'elles sont exposées à des champs magnétiques alternatifs à haute fréquence ou des champs magnétiques à basse fréquence respectivement. Ces deux stratégies induisent alors des dommages cellulaires, que nous détaillerons ci-dessous et peuvent être utilisées pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques antitumorales.

- **Hyperthermie magnétique**

L'hyperthermie pour le traitement du cancer regroupe toutes les stratégies thérapeutiques qui se basent sur une augmentation de la température pour traiter la zone tumorale ¹⁰⁷. Ce traitement par la chaleur est intéressant puisque les cellules cancéreuses sont plus sensibles à la hausse de température que les cellules saines ¹⁰⁸. Un certain nombre d'études ont d'ailleurs mis en évidence l'intérêt de combiner l'hyperthermie avec la chimiothérapie ou la radiothérapie pour traiter certains cancers ¹⁰⁹. En effet, une augmentation de la température supérieure à 40°C, donc supérieure à la température physiologique, permet de renforcer les effets des traitements conventionnels et/ou de détruire directement les cellules ciblées ¹¹⁰. L'hyperthermie combinée à la chimiothérapie est notamment le traitement de référence pour les métastases péritonéales du cancer colorectal ¹¹¹.

Le traitement par hyperthermie est donc prometteur. C'est pour cela que de nombreuses équipes de recherche se penchent sur l'utilisation des nanoparticules magnétiques pour provoquer de l'hyperthermie magnétique. En effet, comme évoqué précédemment, les nanoparticules magnétiques libèrent de l'énergie thermique grâce à la perte d'hystérésis, lorsqu'elles sont exposées à un champ magnétique alternatif à haute fréquence (AMF), généralement comprise entre 100 et 300 kHz.

Des stratégies anti-cancéreuses développées se basent donc sur ce principe. Ainsi, le but est d'éradiquer la tumeur *via* l'administration de nanoparticules magnétiques et l'application de champ magnétique AMF externe. L'accumulation des nanoparticules dans la tumeur peut se baser sur une injection intra-tumorale, par un ciblage passif *via* l'effet EPR ou par un ciblage actif en utilisant des nanoparticules vectorisées. En fonction de la quantité de nanoparticules magnétiques accumulées dans la tumeur, l'application du champ magnétique peut alors induire une hyperthermie "globale" de la tumeur (élévation de la température de la tumeur détectable macroscopiquement, associée à une forte densité de nanoparticules magnétiques) ou une hyperthermie "locale" (sans élévation détectable de la température). Nous développerons ces deux stratégies d'hyperthermie, puis les mécanismes de mort cellulaire mis en jeu, dans le paragraphe ci-dessous.

- Hyperthermie magnétique globale :

Des essais cliniques ont été menés par la société MagForce, basée en Allemagne. Cette entreprise a développé des nanoparticules enrobées d'aminosilane dans un fluide, nommé NanoTherm. Ils ont également développé un inducteur de champ magnétique AMF pour l'Homme : NanoActivator (figure 14).



Figure 14: *Applicateur de champ magnétique alternatif pour l'homme (NanoActivator F100, MagForce Nanotechnologies AG, Berlin) fonctionnant à une fréquence de 100 kHz et une intensité de champ variable de 0 à 15 kA/m.*

Le premier essai clinique a été réalisé chez des patients atteints de glioblastome avec une injection de nanoparticules NanoTherm (112 mg/mL, médiane d'injection : 6 mL) non vectorisées directement dans la tumeur. L'application du champ magnétique AMF (fréquence de 100 kHz et une intensité de champ variable de 2,5 à 18 kA/m) pendant 1 heure, 2 fois par semaine avec une moyenne de six séances par patient, induit une augmentation de la température de la tumeur (44,6°C en moyenne) ; on parle alors d'hyperthermie magnétique "globale". Ce protocole, réalisé lors d'une étude clinique de phase 1, était combiné à la radiothérapie. L'étude n'a pas montré d'augmentation de la médiane de survie des patients, mais a mis en évidence la faisabilité du protocole et confirmé son innocuité ¹¹². Une étude de phase 2 a ensuite été menée avec un protocole similaire sur des patients atteints de récurrences de glioblastome. Elle a mis en évidence une survie médiane supérieure de quelques mois pour les patients traités par hyperthermie magnétique sans complication grave pour la plupart d'entre eux. Si l'on s'intéresse au groupe de patients n'ayant pas reçu de traitement antérieur après leur récurrence, l'hyperthermie combinée à la radiothérapie a augmenté la médiane de survie à 11,2 mois contre 6,2 mois pour les patients non-traités par hyperthermie. Sans restreindre les groupes (avec ou sans traitement antérieur), les patients traités par hyperthermie et radiothérapie présentaient une médiane de survie supérieure ¹¹³.

Un autre essai clinique des patients atteints d'une récurrence locale du cancer de la prostate a été mené avec le même protocole. Ils ont reçu une injection intratumorale de nanoparticules NanoTherm et ont ensuite été exposés au champ magnétique AMF (fréquence de 100 kHz et une intensité de champ variable de 2,5-15 kA/m) à six reprises avec un intervalle d'une semaine. Le suivi de plusieurs mois n'a pas montré de toxicité grave pour la plupart des patients. Concernant l'efficacité, bien que celle-ci ne soit pas l'objet d'une étude de phase I, les auteurs ont tout de même souligné une légère et transitoire diminution du biomarqueur tumoral PSA (antigène prostatique spécifique) après traitement par hyperthermie. Ce critère n'est donc pas suffisant pour évaluer l'efficacité thérapeutique ¹¹⁴. En 2021, un essai clinique évaluant l'efficacité de cette stratégie sur des lésions de grade intermédiaire du cancer de la prostate, a été initié. Il s'est terminé en juillet 2023, les résultats de l'étude ne sont pas encore connus (ClinicalTrials.gov ID : NCT05010759).

Même si ces deux essais cliniques ont montré des résultats encourageants notamment sur la faisabilité de cette stratégie, des inconvénients persistent. En effet, le contrôle de la température n'est pas précis, homogène. Une augmentation trop importante de la température peut endommager les tissus adjacents sains, alors qu'une température qui n'augmente pas assez ne va pas induire d'effets antitumoraux suffisants. De plus, l'injection intratumorale suppose

d'avoir une tumeur relativement facile d'accès et la répartition uniforme des nanoparticules dans la tumeur ne sera pas garantie. C'est pour cela que de nouvelles approches ont été développées pour aller vers de l'hyperthermie ciblée et localisée ¹¹⁵⁻¹¹⁷, on parle alors d'hyperthermie locale.

- Hyperthermie magnétique ciblée / locale

Plusieurs équipes ont cherché à développer des stratégies de ciblage thérapeutique utilisant des nanoparticules vectorisées afin d'augmenter leur accumulation dans les cellules-cibles. En 2011, Creitxell et ses collaborateurs utilisent des SPION vectorisées par le facteur de croissance épidermique (EGF) et dont le récepteur est surexprimé dans de nombreux cancers, dont le cancer du sein. Les auteurs confirment l'intérêt d'utiliser des nanoparticules vectorisées pour améliorer l'efficacité de l'hyperthermie magnétique (entre 4 et 6% de viabilité pour les cellules MDA-MB-231 dérivées du cancer du sein incubées avec les SPION-EGF et exposées à AMF, 233 kHz, 41,75 kA/m, contre 50 à 60% pour les cellules ayant reçu le même traitement mais avec des nanoparticules non vectorisées). Cette vectorisation a permis une meilleure internalisation et accumulation des nanoparticules vectorisées dans les lysosomes des cellules-cibles, puis d'éradiquer celles-ci sans augmentation macroscopique de la température ¹¹⁶. Quelques années plus tard, la même équipe confirme ces résultats et étudie les voies de mort mises en jeu impliquant notamment la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et la perméabilisation des lysosomes ¹¹⁷.

On peut également citer les travaux de Sanchez et al. et Clerc et al. qui ont parallèlement développé, des nanoparticules d'oxyde de fer vectorisées par un peptide, la gastrine, agoniste du récepteur CCK2 pouvant être surexprimé par des cellules cancéreuses (endocrines, pancréatiques, gastriques). Ces travaux ont montré une internalisation spécifique des nanoparticules vectorisées dans les cellules exprimant ce récepteur et leur accumulation dans les lysosomes de ces cellules. Puis, l'application du champ magnétique AMF (275 kHz, 40 mT) a augmenté spécifiquement la mortalité des cellules cancéreuses ayant internalisées des nanoparticules ¹¹⁸. Grâce à l'utilisation de thermomètres moléculaires, l'équipe a montré que l'augmentation de la température se produit à la surface de la nanoparticule, sans augmentation macroscopique car non détectée à la surface des lysosomes, ni dans le milieu de culture des cellules ²⁴. Cela permet donc d'envisager des stratégies plus spécifiques, afin de cibler plus précisément les cellules à éradiquer, tout en limitant l'impact sur les cellules saines voisines et en réduisant donc les effets indésirables associés à une hyperthermie globale.

La capacité des nanoparticules magnétiques à produire de la chaleur sous l'application d'un champ magnétique a également montré son potentiel pour d'autres applications qu'en oncologie. Par exemple, des cellules de neurones hippocampiques de rat ont été incubées avec des nanoparticules MnFe₂O₄ (ferrite de manganèse) vectorisées par la streptavidine permettant l'ancrage à la membrane des nanoparticules. Ensuite, l'application d'un champ de 40 MHz et entre 0,67 et 1 kA/m a généré des potentiels d'action dans les neurones permettant l'ouverture de canaux ioniques TRPV1. L'équipe a ensuite confirmé ces résultats *in vivo* chez le vers *C. elegans*, en ciblant ses neurones sensoriels et montrant une modification du comportement des vers exposés au champ magnétique ¹¹⁹.

La qualification d'augmentation locale de la température dans ces études a été démontrée, grâce à l'utilisation de sondes moléculaires fluorescentes aussi appelées thermomètres moléculaires. Ces molécules émettent une fluorescence dont l'intensité varie en fonction de la température. A titre d'exemple, Clerc et ses collaborateurs ont utilisé un thermomètre moléculaire à la surface de la nanoparticule (DY549) et un autre lié à la surface du lysosome (YFP-Lamp1). L'analyse par microscopie confocale grâce à un électroaimant miniaturisé permettant l'application du champ AMF (275 kHz, 40 mT) a permis de visualiser une variation de l'intensité de la fluorescence du DY549 fixé à la surface des nanoparticules, au cours du temps sous l'effet du champ. Par contre, aucune variation significative de l'intensité de la fluorescence n'a pu être détectée pour la sonde YFP-Lamp1 localisée à la surface du lysosome. Ceci leur a permis de conclure à une élévation locale de la température, à la surface de la nanoparticule (figure 15). Cette étude confirme de précédents résultats concluant également à la chauffe très localisée, grâce à l'utilisation de thermomètres moléculaires, des nanoparticules de ferrite de manganèse sous effet d'un champ magnétique (40 MHz) conduisant à l'ouverture de canaux ioniques à proximité ¹¹⁹.

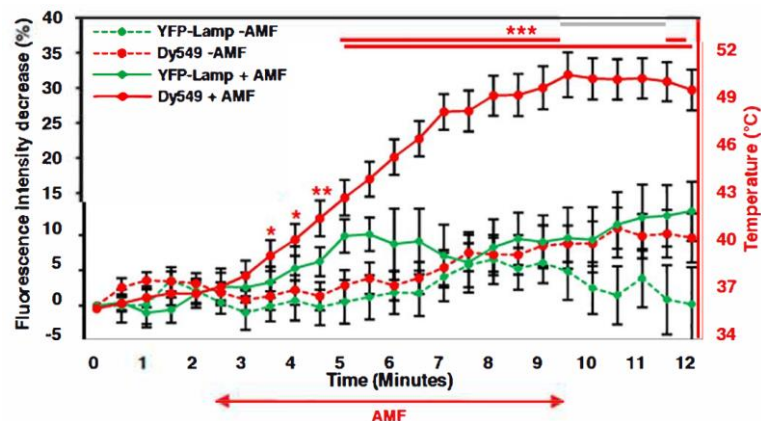


Figure 15 : Visualisation de l'augmentation de la température au niveau de la surface de la nanoparticule grâce à l'utilisation de thermomètres moléculaires ¹¹⁹.

- Mécanismes de mort

La mort induite par hyperthermie magnétique est encore discutée. En effet, plusieurs paramètres entrent en jeu comme les propriétés physico-chimiques des nanoparticules, leur concentration, leur localisation cellulaire, les caractéristiques du champ appliqué, sa durée, *etc.* La vectorisation permet d'améliorer la spécificité et d'accélérer la cinétique d'internalisation des nanoparticules dans les cellules. Malgré tout, les nanoparticules vectorisées ou non s'accumulent généralement dans les lysosomes des cellules ¹²⁰.

Lors de l'application d'un champ magnétique haute fréquence, les nanoparticules vont générer de la chaleur (comme expliqué ci-dessus). Il s'ensuivra une cascade d'évènements conduisant à la mort des cellules tumorales.

L'hyperthermie magnétique globale, qui se base sur l'utilisation de nanoparticules non vectorisée, va induire de nombreux dommages. Tout d'abord un changement morphologique des cellules peut être observé au microscope, une diminution de l'attachement des cellules en culture 2D et la présence de débris que certains auteurs qualifient de "nécrotiques" ¹²¹ tandis que d'autres parlent de "corps apoptotiques" ¹²². Pour l'étude des mécanismes de mort induits par cette stratégie, c'est principalement des marqueurs de mort tels que l'essai Tunel et les marquages annexin V / idoure de propidium qui sont utilisés. Les auteurs concluent donc principalement à de la mort par apoptose ^{121,122}. Etant donné que l'hyperthermie magnétique globale utilise des nanoparticules non vectorisées, la cinétique d'internalisation peut être plus longue que lors de l'utilisation de nanoparticules vectorisées ¹²⁰. Néanmoins, comme précédemment évoqué, des nanoparticules non vectorisées vont malgré tout s'internaliser et s'accumuler majoritairement dans les lysosomes des cellules. Nous allons développer plus en détail les mécanismes de mort induits par hyperthermie magnétique intra-cellulaire ciblée, mais nous pouvons supposer que ceux-ci sont très similaires ou en partie associés à ceux de l'hyperthermie magnétique globale.

Plusieurs études ont montré une augmentation de la production de ROS (espèces réactives de l'oxygène) intracellulaires, par l'hyperthermie magnétique intracellulaire ^{24,117}, tel que $\cdot\text{OH}$. Ainsi, des nanoparticules magnétiques ciblant le récepteur du facteur de croissance épidermique (R-EGF) induisent une élévation de la quantité de ROS totaux dans des cellules MDA-MB-231 exposées à l'hyperthermie magnétique (AMF, 233 kHz, 41,75 kA/m) ¹¹⁷. De même, l'hyperthermie magnétique intra-lysosomale (275 kHz, 40 mT) augmente la production de ROS intracellulaires totaux dans des cellules tumorales pancréatiques INR1G9 chargées en nanoparticules magnétiques vectorisées ciblant les lysosomes de ces cellules. De plus, cette

étude montre la génération de ROS dans les lysosomes contenant des nanoparticules magnétiques en réponse à l'application du champ magnétique, grâce à des sondes fluorescentes par microscopie confocale ²⁴.

Plusieurs études se sont ensuite intéressées à l'intégrité de la membrane lysosomale. Des sondes fluorescentes, ayant la propriété de s'accumuler dans les compartiments acides et donc préférentiellement dans les lysosomes, ont été utilisées et ont permis de mettre en évidence une corrélation entre la production de ROS et l'augmentation de la perméabilité de la membrane lysosomale (par diminution de la fluorescence accumulée dans les lysosomes) ^{24,117,118}. Les ROS produits lors de l'hyperthermie intracellulaire induisent une peroxydation des lipides et protéines de la membrane du lysosome, provoquant sa perméabilisation et la fuite du contenu lysosomal dont les enzymes lysosomales dans le cytosol ²⁴. Parmi les enzymes lysosomales, un rôle important dans la cathepsine B a notamment été mis en évidence dans la cascade des évènements conduisant à la mort des cellules tumorales ²⁴.

Il est donc globalement admis que la mort par hyperthermie magnétique provoque une augmentation de la production de ROS, une augmentation de la perméabilité de la membrane lysosomale et un relargage du contenu lysosomal. Ces évènements intracellulaires peuvent être à l'origine de différentes voies de mort, proposées dans différentes études : apoptose, ferroptose, pyroptose, développées ci-dessous.

Tout d'abord, l'hyperthermie magnétique peut générer des ROS notamment par la réaction de Fenton, connue être dépendante du fer, du pH et de la température : elle est optimale à pH acide (~pH3) et 40°C. Les conditions sont donc réunies pour une catalyse de cette réaction par l'hyperthermie intra-lysosomale. Cette réaction de Fenton est considérée comme pouvant être à l'origine de la mort par hyperthermie magnétique ²⁴. La récente découverte de la voie de mort ferroptose a attiré l'attention (figure 17). Elle est déclenchée par une accumulation excessive de ROS (espèces réactives de l'oxygène) dépendante du fer, qui vont conduire à une peroxydation de lipide membranaire. Elle est de plus en plus étudiée car il a été montré que les cellules cancéreuses sont particulièrement sensibles à la ferroptose ¹²³. L'utilisation de cette voie de mort est donc particulièrement intéressante pour trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques anticancéreuses. Il a été montré sur différentes lignées cellulaires : cellules cancéreuses du rein, de la prostate et du sein (CRPC C4-2, PC3, 786-O, MBA-MD-231) que des nanoparticules d'oxyde de fer soumises à une irradiation laser 808 nm provoquant une hyperthermie de 45°C induisent une augmentation de ROS intracellulaire, une augmentation du taux d'acétyl-Coa entraînant une mort cellulaire par ferroptose ¹²⁴. Ce mécanisme se

rapproche des travaux montrant un mécanisme identique induit par l'hyperthermie magnétique intra-lysosomale ²⁴.

Néanmoins, lors de l'hyperthermie magnétique intra-lysosomale, l'augmentation de la perméabilité de la membrane lysosomale s'accompagnant du relargage de la cathepsine B active la voie de mort dépendante de la caspase-1 sans activation de la Caspase-3 apoptotique (figure 16) ²⁴. Ainsi, l'hyperthermie magnétique intra-lysosomale pourrait initier une voie de mort de type ferroptose qui, après perméabilisation des lysosomes, aboutirait à l'activation d'une voie de mort dépendante de la caspase-1.

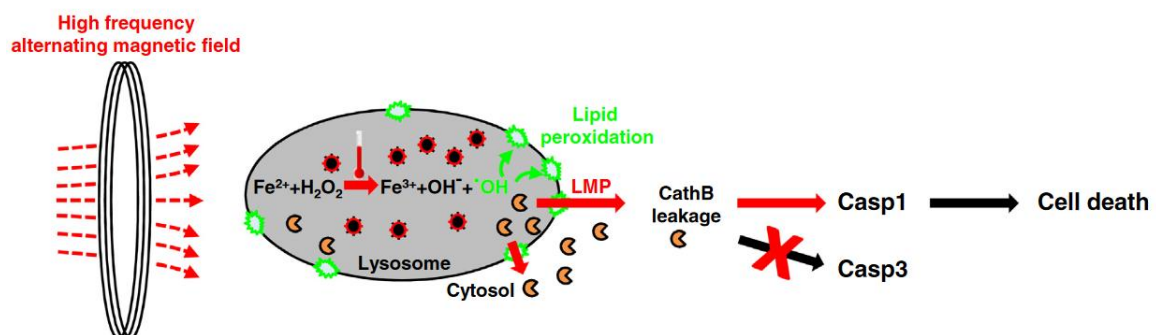


Figure 16 : Mort par hyperthermie magnétique intralysosomale ¹¹⁹.

L'apoptose est une voie de mort provoquée par la cellule et permettant le maintien d'une bonne homéostasie des tissus. Elle est généralement inhibée lors du processus de tumorigénèse. La détection de l'apoptose se fait principalement par un marquage annexine V / iodure de propidium (bien que ces marqueurs soient également utilisés pour mettre en évidence d'autres types de mort), la fragmentation de l'ADN (test Tunel) ou encore l'analyse du clivage des caspases 3/7 ou 9. Cette voie de mort a été mise en évidence par différentes études après hyperthermie magnétique. Par exemple, une étude a montré que l'injection intratumorale de SPION puis application du champ AMF (400 A, 265 kHz) à 4 reprises induit une augmentation de l'apoptose mesurée par test Tunel et du niveau de caspase-3 clivée ¹²⁵. De même, après exposition à l'AMF (20mT, 97,5 kHz), une augmentation (d'un facteur 3,4) de la caspase 9 a également été mise en évidence grâce à l'utilisation de nanoparticules magnétiques vectorisées sur les cellules du cancer de la prostate, PCa ¹²⁶.

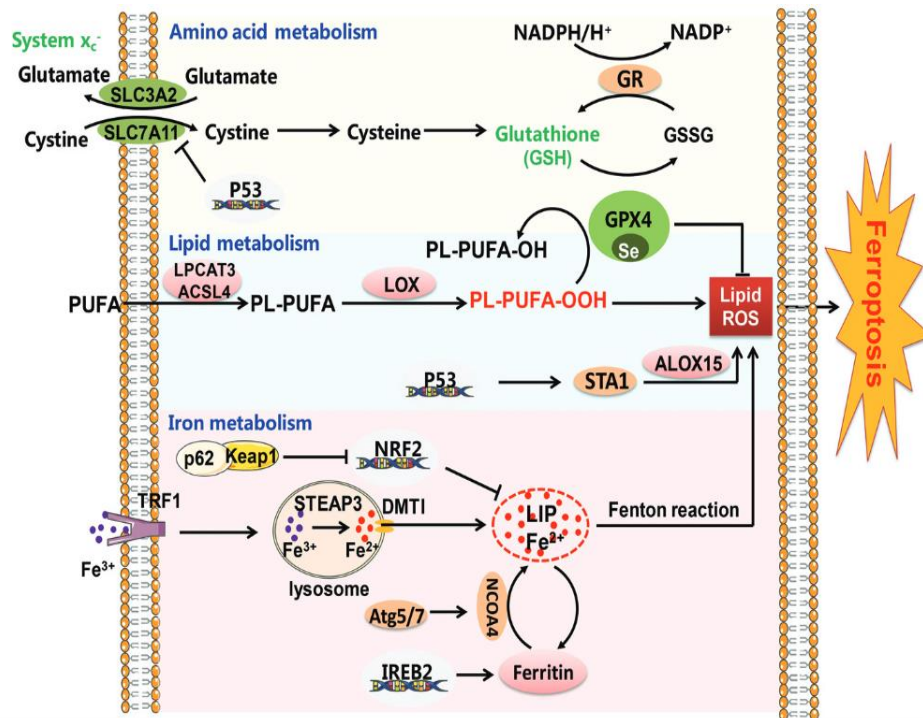


Figure 17 : Mécanisme de mort par ferroptose et voies impliquées.

Si nous essayons de dégager un mécanisme de mort induit lors de l'hyperthermie magnétique à partir des données de la littérature, une production augmentée de ROS principalement par la réaction de Fenton, semble initier la cascade d'évènements conduisant à la mort des cellules. L'hyperthermie magnétique induirait donc premièrement un mécanisme de mort de type ferroptose. Cette production des ROS va peroxyder les lipides et protéines de la membrane lysosomale, conduisant à sa perméabilisation et déclencher la voie de mort lysosomale. Les enzymes lysosomales, dont les cathepsines, déversées dans le cytosol des cellules peuvent déclencher plusieurs voies de mort, la pyroptose *via* l'activation de la Caspase-1, mais aussi l'apoptose *via* le clivage des protéines Bax et Bid ¹²⁷. L'activation de différentes voies de mort possibles pourraient donc être envisagées par l'hyperthermie magnétique (figure 18), en fonction des doses de nanoparticules magnétiques, du niveau d'élévation de la température, du modèle de cancer, *etc.*, pouvant être mis à profit pour agir en synergie avec d'autres traitements ¹²⁸.

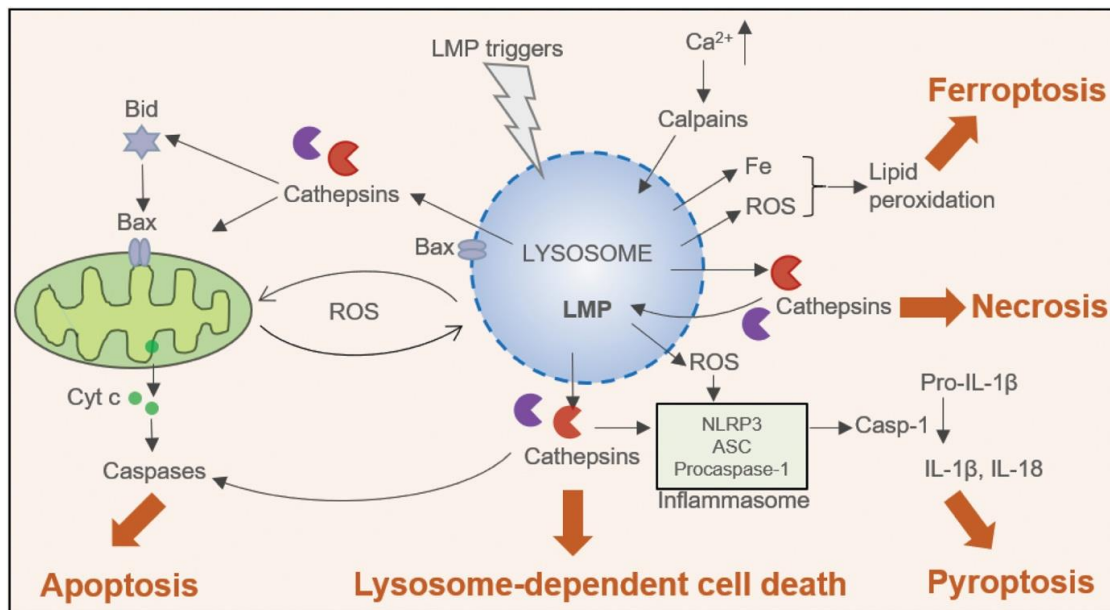


Figure 18 : Différentes voies de mort pouvant être initiées par la perméabilisation de la membrane lysosomale ¹²⁹.

- Autres applications

En plus de proposer des solutions thérapeutiques dans le domaine du cancer, les nanoparticules magnétiques et les champs magnétiques alternatifs à haute fréquence (AMF) peuvent être utilisés pour développer d'autres applications. Ils peuvent par exemple aider à la neuromodulation du cerveau, grâce à la chaleur générée par les nanoparticules exposées au champ magnétique AMF, comme détaillé dans la revue de Roet et ses collègues ¹³⁰. On peut également citer le traitement de l'infection articulaire prothétique par application d'un champ magnétique AMF sur des implants magnétiques, afin de détruire par hyperthermie le "biofilm" formé sur l'implant métallique et ainsi éviter le traitement par antibiotique et opération chirurgicale ¹³¹.

- **Applications utilisant des champs magnétiques à basse fréquence**

L'ablation magnéto-mécanique pour le traitement du cancer se définit comme l'induction de mortalité de cellules-cibles grâce à l'utilisation de nanoparticules qui, soumises à un champ magnétique alternatif ou rotatif à basse fréquence, vont générer des forces mécaniques (ou couples) provoquant alors la mort de la cellule.

En 2010, pour la première fois, Kim et ses collaborateurs montrent que des forces mécaniques, *via* des micro-disques, peuvent induire la mort de cellules tumorales. Ces disques fer-nickel, fonctionnalisés avec un anticorps anti-IL13 α 2R, ciblent le récepteur IL13 α 2 surexprimé à la surface de cellules de glioblastome. L'application d'un champ magnétique de basse fréquence (20 Hz, 90 Oe) induit ensuite la perméabilisation des cellules cancéreuses, mesurée par un dosage de LDH (lactate deshydrogénase, libérée lors de destruction de la membrane plasmique). Dans cette même étude, les auteurs ont analysé la signalisation calcique et mis en évidence une augmentation des ions calciques intracellulaires, leur permettant d'émettre l'hypothèse selon laquelle la mort par ablation mécanique due aux mouvements des nanoparticules soumises au champ magnétique résulte de mouvements d'ions qui conduisent à la mort des cellules ¹³².

Une autre étude remarquable, utilisant des SPION de 100 nm vectorisées avec des anticorps anti-LAMP1 (protéine de la membrane lysosomale), a montré que l'application d'un champ magnétique alternatif de 10-40 Hz, 30 mT permet à la fois d'augmenter l'internalisation des nanoparticules dans des cellules d'insulinome de rat INS-1, d'endommager leurs lysosomes, mais aussi d'induire la mort de ces cellules (mesurée par marquage annexine V et 7-AAD) et d'inhiber leur prolifération ¹³³.

Plus récemment, une équipe a utilisé des SPION de très petite taille, 6 nm, vectorisées avec de la gastrine pour permettre leur accumulation dans les lysosomes de fibroblastes associés au cancer (CAF) pancréatique exprimant le récepteur CCK2 (ayant pour agonistes naturels, la gastrine et la cholécystokinine). L'exposition à un champ rotatif de 1 Hz et 40 mT induit alors plus de 30% de mortalité cellulaire (mesurée par un marquage annexine V / iodure de propidium) et réduit leur prolifération ¹²⁰. De façon intéressante, des simulations réalisées dans l'étude montrent que la force générée par le mouvement ces petites nanoparticules (~4 pN) sous le champ magnétique est largement inférieure à celle nécessaire pour induire la rupture de la membrane lysosomale (~200 pN). Ceci rejoint l'hypothèse de Kim et ses collaborateurs ¹³² selon laquelle la mort induite par des nanoparticules magnétiques exposées à des champs magnétiques rotatifs à basse fréquence pourraient impliquer l'activation des canaux calciques et/ou autres canaux ioniques altérant la perméabilité lysosomale et provoquant la mort de la cellule.

- Mécanisme de mort

La mort par ablation mécanique est provoquée par l'application d'un champ magnétique à basse fréquence sur des cellules ayant été incubées avec des nanoparticules magnétiques. Ceci est obtenu par des mouvements spatiaux des nanoparticules pour s'aligner sur le champ magnétique appliqué par relaxation de Brown en raison du couple magnétique induit. Cela varie en fonction du type de nanoparticules : forme, taille, *etc.*, et des caractéristiques de champs : fréquence et amplitude. Mais globalement la rotation de la nanoparticule va entraîner des dommages et des perturbations cellulaires pouvant conduire à la mort de la cellule.

Premièrement, on peut citer l'altération de la membrane cellulaire (mesurée par dosage de la lactate déshydrogénase cellulaire libérée dans un milieu suite à la perte de l'intégrité de la membrane cellulaire), observée sur des cellules de glioblastome incubées avec des micro-disque et soumises à un champ magnétique de basse fréquence (20 Hz, 90 Oe) ¹³².

Cependant, les nanoparticules peuvent également s'internaliser et s'accumuler dans les lysosomes des cellules ^{120,134}. L'application d'un champ magnétique à basse fréquence sur ces cellules va donc induire des dommages au niveau lysosomal. En effet, Shen et ses collaborateurs mettent en évidence une augmentation de la perméabilisation de la membrane lysosomale par microscopie à fluorescence (à l'aide d'une sonde fluorescente, lysotracker) et imagerie TEM sur les cellules U87. En 2022, un "mini-aimant" permettant l'application du champ magnétique sous un vidéo-microscope et une observation en temps réel des effets du champ magnétique sur des cellules vivantes a été développé. L'application du champ rotatif de 40mT, 1Hz sur des CAF ayant accumulés des nanoparticules magnétiques dans leurs lysosomes, induit une augmentation de la fuite lysosomale mesurée grâce à l'utilisation de lysotracker ¹³⁵. De même, d'autres équipes ont également montré un relargage du contenu lysosomal après un traitement par SPION et champ magnétique à basse fréquence ^{120,133,136}. Cependant d'autres études utilisant les SPION soumis à des basses fréquences de champ n'ont pas mis en évidence de fuite du contenu lysosomal ¹³⁷.

Shen et ses collègues, ont mesuré la taille des agrégats de nanoparticules cubiques de 62nm, formés afin d'évaluer la force générée par ceux-ci. L'interprétation d'image TEM sur des cellules incubées avec ces nanoparticules leur a permis de conclure que certains agrégats pouvaient compter entre 10^3 et 10^4 nanoparticules. Ensuite, ils ont estimé à 4×10^2 pN μ m la force générée par ces agrégats soumises au champ magnétique rotatif. Ainsi ils ont confirmé que leur agrégats de nanoparticules sont suffisamment importants pour induire une rupture des membranes lysosomales après application d'un champ magnétique à basse fréquence ¹³⁴.

Cependant, Hillion et ses collaborateurs, ont également fait des simulations pour estimer la force générée par les assemblages de ces nanoparticules dans les lysosomes. Dans leur cas, les agrégats sont formés de 3 000 nanoparticules et génèrent donc, d'après les simulations, 3pN¹³⁵. Ils concluent que les quelques pN générés ne suffisent pas à rompre la membrane lysosomale. Les auteurs suggèrent alors que ces forces mécaniques pourraient activer des canaux mécanosenseurs. D'ailleurs, l'activation de canaux potassiques mécanosensibles comme TREK-1 a notamment été mis en évidence avec des nanoparticules d'oxyde de fer et un champ magnétique basse fréquence (1 Hz, 80 mT)¹³⁸.

La mort par ablation magnéto-induite pourrait également être due à des contraintes de cisaillement provoquer par les mouvements des nanoparticules dans les lysosomes sous effet du champ magnétique¹³⁷. En effet, après application d'un champ magnétique de 50 Hz et 50 kA/m sur des cellules ayant internalisées des nanoparticules, les auteurs ont mis en évidence une perturbation du cytosquelette d'actine¹³⁷ (figure 19). Ces résultats sont en accord avec d'autres études montrant la désorganisation du cytosquelette, notamment de l'assemblage des microtubules¹³⁹ et une perte de la surface d'adhésion cellulaire¹³⁵.

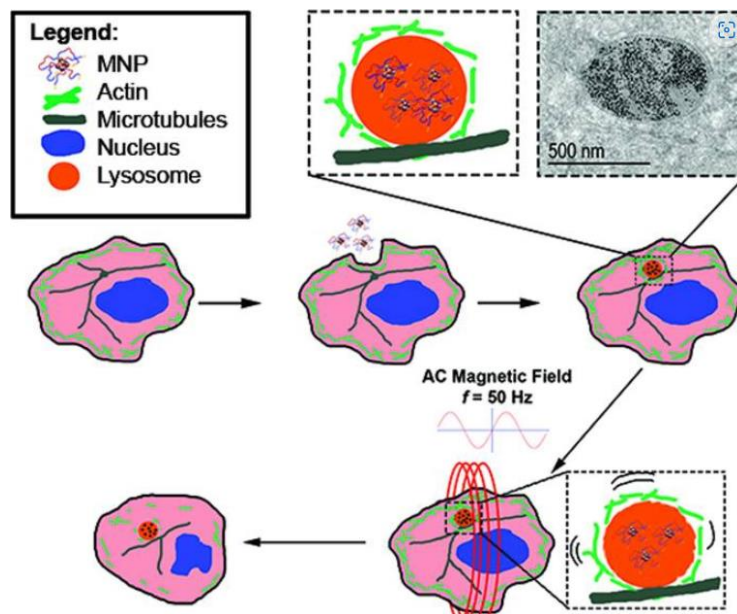


Figure 19 : Représentation schématique de l'accumulation des nanoparticules dans les lysosomes suivis d'un mouvement suite à l'application d'un champ basse fréquence pour générer des forces conduisant à une perturbation du cytosquelette¹³⁷.

En conclusion, certaines études montrent que des agrégats de nanoparticules suffisamment gros peuvent générer des forces assez importantes pour induire directement la rupture de la membrane lysosomale conduisant à la mort des cellules. Toutefois, en l'absence

de forces mécaniques suffisantes, les nanoparticules pourraient engager des mécanismes "indirects", *via* l'activation de récepteurs mécano-sensibles conduisant, *in fine*, à la perte d'intégrité de la membrane lysosomale. L'effet thérapeutique de l'ablation magnéto-mécanique impliquerait également la perturbation du cytosquelette cellulaire, pouvant elle aussi déclencher la voie de mort par apoptose.

- Autres applications

L'application de champs magnétiques alternatifs ou rotatifs à basse fréquence sur des nanoparticules magnétiques a montré des atouts pour d'autres applications⁹⁷ telle que moduler l'activité catalytique d'enzymes, en la diminuant comme cela a été montré sur l'enzyme α -chymotrypsine¹⁴⁰.

Des nanoparticules magnétiques vectorisées ont été également utilisées pour cibler des récepteurs mécano-sensibles, comme le récepteur α du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR α) et l'intégrine $\alpha\beta 3$ sur des cellules souches mésenchymateuses humaines. L'application d'un champ magnétique statique à basse (1 Hz) induit une modification de l'ostéogenèse de ces cellules¹⁴¹.

- **Délivrance de médicament**

Comme nous l'avons préalablement expliqué dans la partie I.7.b – Applications thérapeutiques, la délivrance de médicament est, pour l'heure, principalement réalisée *via* l'utilisation de liposome. Néanmoins, les nanoparticules d'oxyde de fer présentent également des atouts non négligeables pour la délivrance de médicament. Par exemple, des SPION recouvertes simultanément d'acide hyaluronique et de cisplatine montrent une libération ralentie de cisplatine, comparativement au cisplatine libre, ce qui permet à une plus grande quantité de médicament d'atteindre sa cible¹⁴². Ensuite, la libération de cisplatine peut être déclenchée par des hyaluronidases, connues pour être présentes en grande quantité dans les tumeurs. Enfin, une augmentation des marqueurs pro-apoptotiques a été mise en évidence sur deux lignées cellulaires (PC-3 et Jurkat) incubées avec ces nanoparticules¹⁴². Les propriétés de ces nanoparticules permettent également de combiner la délivrance de médicament et l'imagerie. Il est donc envisageable de pouvoir surveiller l'accumulation des nanoparticules, voire même d'ajuster les doses à administrer en temps réel, tout en contrôlant la localisation et la délivrance de médicament par application de champ magnétique.

Une autre équipe a synthétisé des nanoparticules d'oxyde de fer chargées de 5-fluorouracile (5-FU), puis encapsulées dans des liposomes. L'efficacité d'encapsulation du 5-FU par ces nanoparticules hybrides a été étudiée afin d'être optimisée en fonction de différentes caractéristiques physicochimiques. Puis, l'application d'un champ magnétique alternatif à haute fréquence (250 kHz et 4 kA/m) a permis d'induire un relargage de la chimiothérapie par hyperthermie magnétique ¹⁴³. De même, des nanoparticules de ferrite de zinc ont été incorporées avec de la doxorubicine dans un liposome afin d'obtenir des liposomes thermosensibles. Après internalisation dans des cellules de carcinome pulmonaire humain A549, l'application du champ magnétique alternatif à haute fréquence (355 kHz, amplitudes variables de 20 et 30 kA/m) a réduit la viabilité de ces cellules ¹⁴⁴. Il est donc possible d'obtenir des magnéto-liposomes thermosensibles et donc de tirer parti des différents avantages des nanoparticules de différentes natures.

- Voie de mort immunogénique

La majorité des études citées jusque-là ont analysé l'effet "direct" de l'hyperthermie magnétique et de l'ablation magnéto-mécanique sur l'induction de la mortalité cellulaire. Or, on sait maintenant que pour renforcer une stratégie thérapeutique, il est important d'agir à différents niveaux. C'est pour cela que l'on s'attache désormais à étudier la potentialisation des effets antitumoraux de nanothérapies par d'autres mécanismes tels que la stimulation d'une réponse immunitaire antitumorale. Nous décrivons le système immunitaire et la voie de mort immunogénique dans le deuxième chapitre, partie II.5.e - Mort cellulaire immunogène.

Les cellules tuées par hyperthermie magnétique peuvent être à l'origine de relargage d'antigènes qui peuvent être reconnus par des cellules dendritiques ou des macrophages résidents qui vont alors migrer vers les organes lymphoïdes et présenter ces antigènes afin de stimuler une réponse immunitaire. De plus, l'hyperthermie stimule la libération de cytokines pro-inflammatoires favorisant le recrutement de cellules immunitaires sur le site tumorale. Induire une voie de mort immunogène permettrait donc de potentialiser les effets de l'hyperthermie magnétique et d'avoir des effets à plus long terme et spécifiques contre la tumeur. On peut également citer les protéines de la famille des HSP (protéine de choc thermique) et la calréticuline (CalR) pouvant être surexprimées par les cellules exposées à l'hyperthermie et qui jouent un rôle dans la stimulation de la réponse immunitaire anti-tumorale. En effet, des cellules du glioblastome U87 incubées avec des SPION et exposées 3 fois 30 min

au champ magnétique AMF (182 kHz et 16 kA/m) présentent une augmentation de l'expression membranaire des protéines calréticuline, HSP70 et HSP90 connues pour être des "eat me" signal donc pour favoriser la phagocytose et au contraire, une diminution de l'expression membranaire de signal "don't eat me" comme CD47. Cette up-régulation de signaux "eat-me" et down-régulation de signaux "don't eat me" sont corrélées à une augmentation de la phagocytose des cellules cancéreuses U87 par des macrophages THP-1. De plus, les auteurs ont mis en évidence que les cellules traitées par hyperthermie magnétique présentaient à leur surface une augmentation de ligands activateurs de cellules NK, favorisant la réponse immunitaire antitumorale ¹⁴⁵. De même, des souris porteuses d'une xéno greffe de cellules cancéreuses pancréatiques MiaPaca2, ayant reçu une injection intra-tumorale de SPION (3mg/mL, 0,05mL), puis exposées 3 fois à un champ magnétique AMF (196 kHz, 26 kA/m) sur 3 jours, présentent une augmentation de l'expression de la calréticuline à la surface des cellules tumorales s'accompagnant d'une inhibition de la croissance tumorale, comparativement aux souris contrôles ¹⁴⁶. Une autre équipe a analysé l'effet de l'hyperthermie magnétique dans un modèle murin avec greffe syngénique de GL261, cellules du glioblastome et mis en évidence une augmentation de l'expression de HSP70 sur des coupes de tumeurs. De plus, une augmentation du nombre de lymphocytes LT CD4 et LT CD8 a été observé, montrant donc une augmentation de l'infiltration de ces cellules dans les tumeurs ¹⁴⁷ (figure 20).

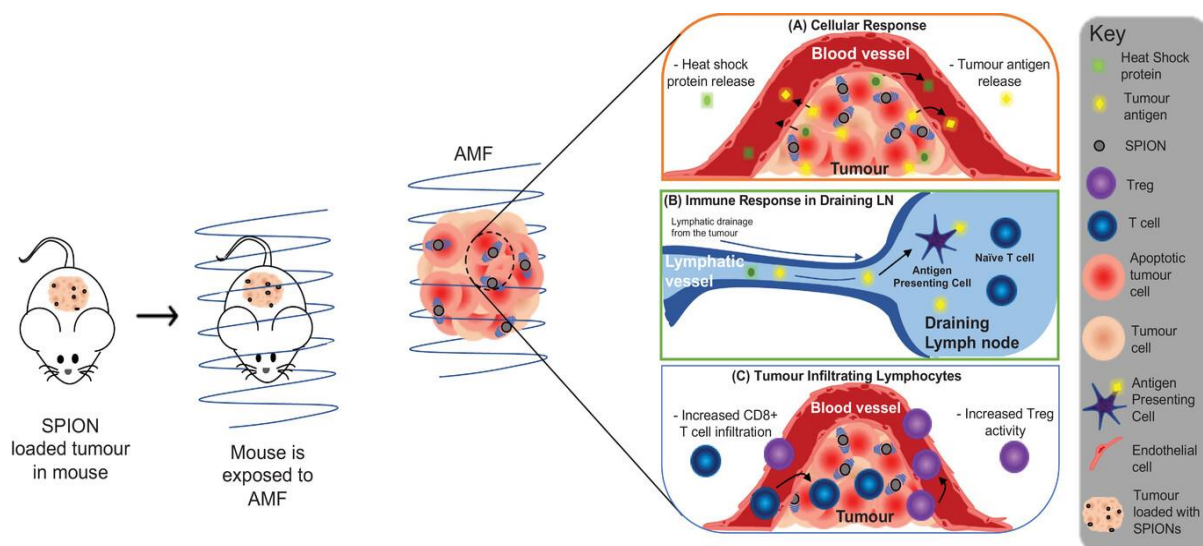


Figure 20 : Représentation schématique des réponses immunologiques et tissulaires proposées à la thérapie hyperthermique médiée par SPION. ¹⁴⁷

Les nanoparticules magnétiques sont très efficaces pour induire la mort cellulaire par hyperthermie magnétique ou ablation magnéto-mécanique. Comme nous avons pu le voir,

les différentes utilisations des nanoparticules n'induisent pas forcément les mêmes mécanismes de mort, ce qui peut être un atout majeur pour l'utilisation des nanoparticules sur différents types cellulaires ayant des sensibilités différentes aux divers voies et processus de mort et dans le but d'obtenir des effets synergiques lorsqu'elles sont combinées à d'autres traitements (chimiothérapie, *etc.*).

CHAPITRE 2 : CANCER DU PANCREAS

I - LE PANCREAS SAIN

I.1 - Anatomie, composition

Le pancréas est une glande du système digestif d'une quinzaine de centimètres pour un peu moins de 100 grammes. Il est situé dans l'abdomen, derrière l'estomac (figure 21). Il est composé de 3 parties :

- la tête : partie large, en contact direct avec le duodénum,
- le corps : partie longue, étendue horizontalement,
- la queue : partie fine qui s'étend jusqu'au contact de la rate.

C'est un organe fortement vascularisé par les artères mésentérique et splénique. Le pancréas possède 2 canaux : le canal de Wirsung qui débute au niveau de la queue et traverse le pancréas dans toute sa longueur jusqu'à la tête pour rejoindre le duodénum (figure 21). Il a pour principales fonctions le drainage de l'organe et le déversement des sucs dans le duodénum. Il y a également le canal de Santorini qui draine principalement la tête de la glande (figure 21). L'organe est entouré de tissu conjonctif qui contient de nombreuses cellules graisseuses. Ce tissu peut représenter jusqu'à 25% du volume total du pancréas.

Le pancréas présente 2 tissus distincts. D'une part, on trouve les sacs glandulaires ou acini, la partie exocrine du pancréas qui représente 80% de sa masse, sécrète le suc pancréatique nécessaire à la digestion dans le duodénum *via* des canaux excréteurs. D'autre part, il y a les

ilots de Langerhans, tissu endocrine, responsable de la sécrétion d'hormones (glucagon, insuline, somatostatine) dans le sang.

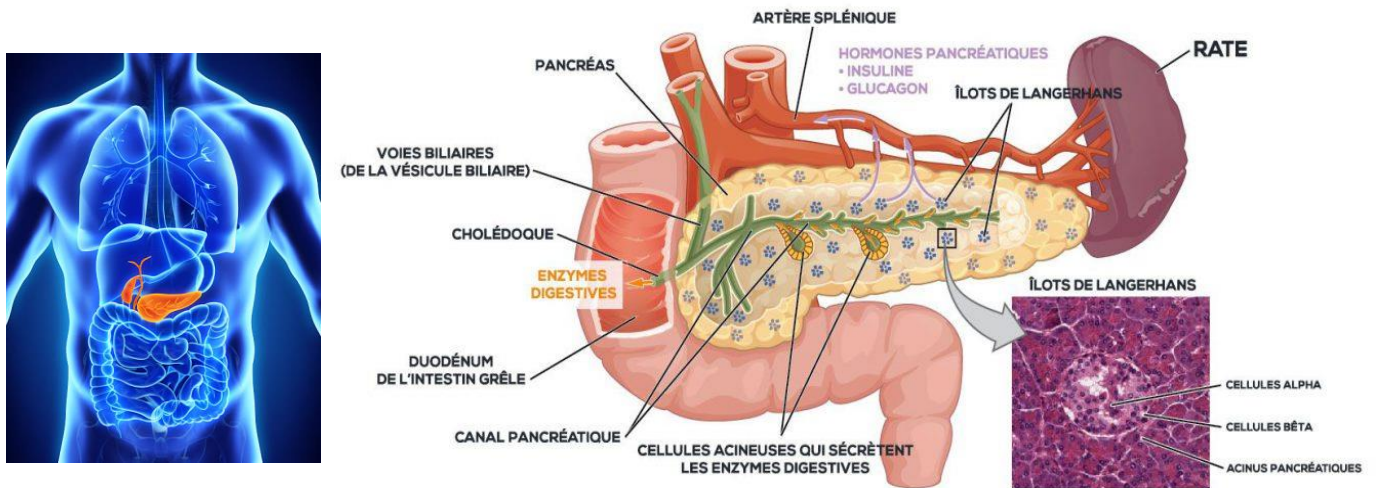


Figure 21 : Localisation et anatomie du pancréas.

<https://www.istockphoto.com/fr/photo/gallbladder-et-anatomie-humaine-pancr%C3%A9as-gm465930202-59481356>

<https://foie-pancreas-strasbourg.eu/pathologies/pancreas/>

I.2 - Fonction du pancréas

Le pancréas est une glande mixte. Cet organe possède à la fois une fonction endocrine permettant la sécrétion d'hormones dans la circulation sanguine et une fonction exocrine qui sécrète différentes substances dans le duodénum.

I.2.a - Endocrine

La partie endocrine du pancréas est composée des ilots de Langerhans. Ce sont ces ilots qui vont produire des hormones dont le but principal est la régulation du taux de sucre dans le sang. La partie endocrine est donc hautement vascularisée pour permettre le transport et la libération des hormones. Les cellules majoritaires du tissu endocrine du pancréas sont les cellules alpha, bêta, delta et PP qui produisent respectivement :

- le glucagon : molécule hyperglycémiant qui permet la mobilisation du glycogène hépatique pour une libération de glucose dans le sang,

- l'insuline : rôle hypoglycémiant en favorisant l'absorption de glucose sous forme de glycogène ou triglycéride par les cellules du foie, les cellules adipeuses et les cellules des muscles squelettiques,
- la somatostatine : inhibe des hormones gastro-intestinales et pancréatiques,
- le polypeptide pancréatique : son rôle n'est pas encore élucidé, mais il participe au dialogue entre l'intestin et le pancréas.

I.2.b - Exocrine

Entre 90 et 95% du pancréas est constitué de tissu exocrine. La partie exocrine a pour fonction principale d'aider à la digestion. Ce tissu est constitué de cellules acineuses (les acini), de cellules centro-acinaires et de cellules canalaire :

- les acini, cellules avec des caractéristiques sécrétrices (polarité baso-apicale, grains de zymogène *etc.*), synthétisent et sécrètent des enzymes digestives dans un fluide primaire dans l'intestin grâce aux canaux pancréatiques,
- les cellules centro-acinaires, se localisent dans la lumière de l'acinus, possèdent très peu d'organites et constituent le début des voies excrétrices,
- les cellules canalaire régulent le pH du suc pancréatique *via* à la sécrétion d'hydroélectrique riche en bicarbonate.

II - CANCER PANCREATIQUE

Le cancer se caractérise par la multiplication anarchique et incontrôlée de cellules. Lorsqu'on parle de cancer du pancréas, il faut distinguer deux formes : les tumeurs neuroendocrines pancréatiques qui représentent moins de 5% des cancers du pancréas et l'adénocarcinome pancréatique (PDAC) qui est le majoritaire. Ils se distinguent par leur développement, leur localisation, leur prise en charge et traitements, *etc.* Nous avons fait le choix de se consacrer uniquement sur l'adénocarcinome pancréatique dans ce manuscrit, puisqu'il constitue notre modèle d'étude.

Tout d'abord, nous développerons quelques généralités au sujet de l'adénocarcinome pancréatique, puis les processus de développement de ce cancer. Ensuite, nous expliquerons ses caractéristiques, notamment au sujet de son microenvironnement très dense parmi lequel les CAF (Cancer-Associated Fibroblast) et les cellules immunitaires jouent un rôle clef. Enfin, nous évoquerons les méthodes de diagnostics et thérapies actuellement utilisées. Nous citerons notamment quelques exemples de nanothérapies développées pour le traitement du PDAC.

II.1 - Généralité, épidémiologie

L'adénocarcinome pancréatique (PDAC) est un cancer à très mauvais pronostic puisque le taux de survie à 5 ans est inférieur à 10% ¹⁴⁸ avec plus de 220 000 décès chaque années dans le monde. Malgré les progrès de la recherche et de la médecine en oncologie, son incidence continue d'augmenter ; il est prédit pour être la deuxième cause de mort par cancer d'ici quelques années. Ce faible taux de survie s'explique par un diagnostic tardif de la maladie ; seulement 20% des patients sont diagnostiqués à un stade précoce et sont donc potentiellement éligibles à une chirurgie de résection qui reste à l'heure actuelle la meilleure solution. Parmi les facteurs de risque, on peut citer :

- l'âge et le sexe : 90% des patients ont plus de 55 ans, et 1 patient sur 3 est un homme,
- le tabagisme augmente d'environ 2 fois le risque et ceci perdure jusqu'à 20 ans après l'arrêt du tabac chez les anciens fumeurs ¹⁴⁹ ; des études sont en cours pour évaluer les effets de l'utilisation de la cigarette électronique sur le risque du PDAC,
- l'alcool : plus la consommation est élevée, plus le risque augmente et ceci est également corrélé au faible taux de survie après diagnostic ¹⁵⁰,
- l'obésité peut augmenter le risque d'environ 35%, mais n'affecte pas le pronostic des patients atteints de PDAC ¹⁵¹,
- le diabète : le risque de PDAC est 2 fois plus élevé chez les personnes diabétiques ¹⁵²
- les pancréatites à répétition / pancréatites chroniques est un facteur de risque majeur puisqu'il peut augmenter entre 13 et 16 fois le risque de développer un

PDAC car elles sont liées à de la destruction de cellules acineuses et au développement de fibrose ¹⁵³,

- les prédispositions génétiques héréditaires : avoir un parent ayant ou ayant eu un PDAC est lié à un risque qui augmente de 1,5 à 3 fois d'en développer un, entre 21 et 36% des PDAC sont dus à des facteurs génétiques héréditaires ; parmi les mutations qui ont été associées à un risque accru de développer un PDAC, on peut citer : BRCA2, ATM, CDKN2A, PALB2, BRCA1, PRSS1, STK11, MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2 ¹⁵⁴.

Les principales zones touchées sont l'Europe, l'Amérique du Nord et l'Australie, plus généralement toutes les régions où l'indice de développement est élevé, laissant supposer une relation avec le mode de vie et les facteurs environnementaux.

Entre 60 et 70% des PDAC se localisent dans la tête du pancréas, 15% dans le corps et 15% dans la queue. Mais bien souvent, en raison du diagnostic tardif, il est déjà métastasé dans les ganglions. Il existe différents sous-types qui sont présentés dans le tableau n°3 ci-dessous.

Morphological Variant	Characteristics
Adenosquamous carcinoma	Significant components of ductal/glandular and squamous differentiation (at least 30%). Considered to have a worse prognosis than pancreatic adenocarcinoma.
Colloid/mucinous carcinoma	Production of copious amounts of extracellular stromal mucin. Most arise in association with intraductal papillary mucinous neoplasms; thought to have more favourable prognosis than pancreatic adenocarcinoma
Undifferentiated/anaplastic carcinoma	Minimal or no differentiation; highly atypical cells which may appear spindle shaped or sarcomatoid, often admixed with osteoclast-like giant cells. One of the most aggressive forms of pancreatic cancer with extremely poor survival rates
Signet ring cell carcinoma	Discohesive, singly invasive cells with intracytoplasmic mucin that may displace the nucleus. Similar tumours throughout the gastrointestinal tract. Very rare form of pancreatic cancer with prognosis similar to that of pancreatic adenocarcinoma
Medullary carcinoma	Syncytial arrangement of pleomorphic epithelial cells with associated intratumoral lymphoid infiltrate. Prognosis is slightly better than pancreatic adenocarcinoma
Hepatoid carcinoma	Morphological similarity to hepatocellular carcinoma. May produce bile. Very rare tumour with a poor prognosis similar to that of pancreatic adenocarcinoma

***Tableau 3 : Résumé des différents sous-types de PDAC.
Classification de l'OMS (2018)***

II.2 - Développement du cancer

Lors des premières phases de développement, le PDAC est une maladie silencieuse. Les symptômes sont très rares voire inexistants. Cela explique en grande partie le retard de diagnostic de ce cancer. Au fur et à mesure de la progression du cancer, des symptômes apparaissent comme des douleurs dans l'estomac et le dos, une perte de poids, de la fatigue, un ictère, des problèmes digestifs.

L'adénocarcinome pancréatique est un cancer du pancréas exocrine qui se développe suite à une série de mutations et de lésions. Il y a 3 types de lésions qui peuvent être à l'origine des PDAC : les lésions préneoplasies intraépithéliales pancréatiques appelées PanIN, les néoplasies mucineuses kystiques, les néoplasies mucineuses papillaires intra-canalaires appelées IPMN.

Les lésions les plus fréquemment retrouvées à l'origine des PDAC sont les PanIN (figure 22). Ce sont de très petites lésions de quelques millimètres intracanalaires, non invasives qui se développent avec l'âge. Elles peuvent être classées en 3 niveaux de sévérité (de PanIN-1 à PanIN-3) associés à des modifications morphologiques ¹⁵⁵. Les PanIN-1 peuvent donc être couramment retrouvées sur le pancréas de personnes âgées alors que les PanIN-3 sont, elles, associées à un PDAC ou un futur développement de PDAC. Peters et ses collaborateurs ont mis en évidence qu'il y en environ une dizaine d'années entre l'apparition des premières PanIN-3 et le développement du PDAC, ce qui ouvre la voie pour des diagnostics plus précoces *via* la détection des PanIN-3 ¹⁵⁶.

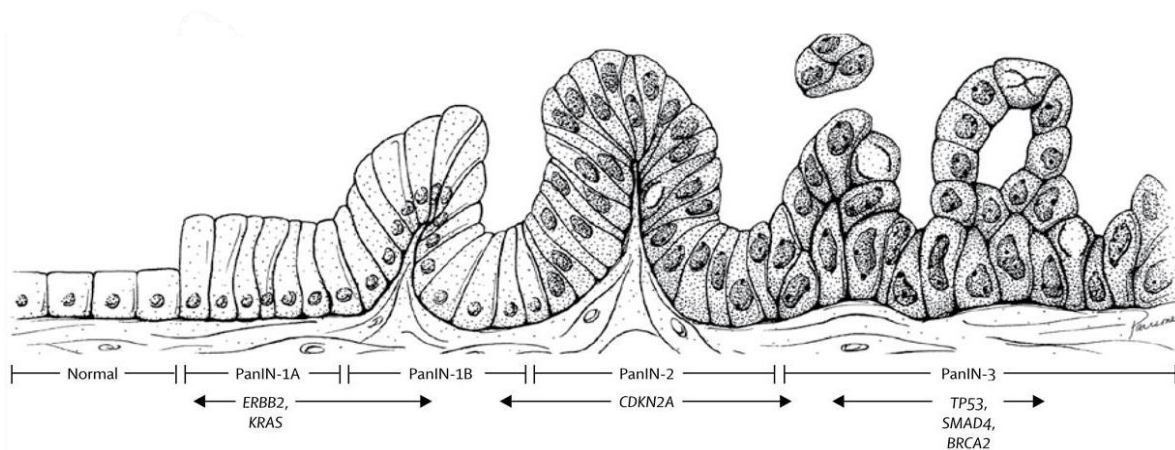


Figure 22 : Représentation de l'évolution des PanIN et des altérations génétiques conduisant au développement du PDAC ¹⁵⁷.

Certains gènes sont retrouvés fréquemment mutés chez les patients atteints de PDAC. Des études de séquençage du génome à grande échelle ont permis d'identifier les 4 gènes principaux ¹⁵⁸ (figure 22) :

- KRAS : la mutation de cet oncogène joue un rôle essentiel dans le développement du PDAC, retrouvé dans plus de 90% des PDAC. Cela s'explique par son implication dans de nombreuses voies de signalisation : RAF/ERK/MAP, PI3-AKT, *etc.* Son activation n'est pas suffisante pour induire un développement du cancer, mais son inactivation peut arrêter la croissance tumorale ¹⁵⁹,
- CDKN2A permet l'arrêt du cycle cellulaire au point de contrôle G1/S du cycle cellulaire. La mutation de ce gène suppresseur de tumeur régule négativement les acteurs du cycle cellulaire CDK4/6 et permet alors la progression cellulaire incontrôlée ¹⁶⁰, sa mutation est retrouvée dans 23% des cas de PDAC ¹⁶¹,
- SMAD4 est un gène suppresseur de tumeur qui fait partie de la cascade de signalisation du TGF- β . Sa mutation est retrouvée dans au moins 50% des cancer du pancréas. SMAD4 intervient dans les stades tardifs du développement des PanIN en PDAC,
- TP53 est un facteur de transcription indispensable au maintien de l'intégrité du génome, il permet le déclenchement de l'apoptose. La mutation sur ce gène suppresseur de tumeur est retrouvée dans plus de 50% des patients atteints de PDAC, elle est associée à une survie plus courte des patients présentant cette mutation ¹⁶².

II.3 - Caractéristique, rôle du microenvironnement

Le PDAC est caractérisé par un microenvironnement ou stroma très dense. Ce stroma regroupe plusieurs composantes cellulaires dont les CAF et les cellules immunitaires, et une composante acellulaire, la matrice extracellulaire (figure 23). Ces différents acteurs vont tous jouer un rôle important dans le développement et la progression tumorale.

Les tissus sains et plus précisément le stroma sain va pouvoir apporter des réponses notamment immunitaires, dans les premiers stades de l'apparition des PanIN. Mais au fur et à mesure de la progression des lésions préneoplasiques et lors de l'apparition du PDAC, les cellules tumorales vont détourner les fonctions des cellules environnantes dans le but de soutenir la progression tumorale. On parle alors de microenvironnement ou stroma tumoral, appelé TME (Tumor MicroEnvironment) (figure 23).

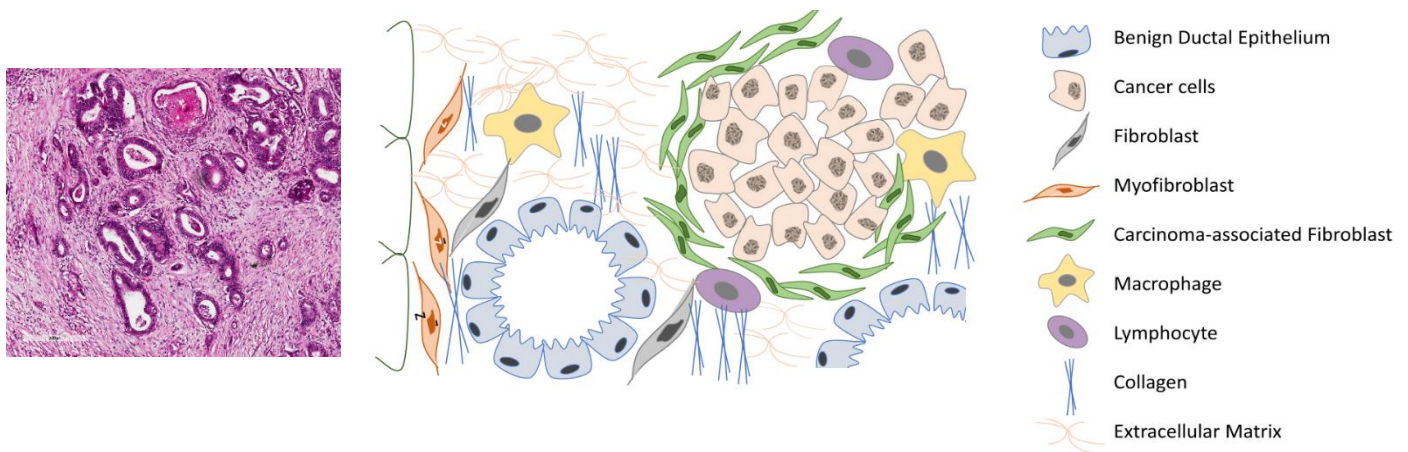


Figure 23 : a) Coupe de cancer du pancréas : cellules cancéreuses et stroma tumoral (Courtesy Dr J. Cros Hôp. Beaujon) b) Représentation schématique du PDAC et de son microenvironnement ¹⁶³

Le microenvironnement du PDAC peut représenter jusqu'à 80% de la masse tumorale. C'est une structure dynamique ayant une composante cellulaire et non cellulaire. Il est composé de CAF pour Fibroblastes Associés au Cancer, de cellules endothéliales, de péricytes, de neurones, de cellules immunitaires et de protéines de la matrice extracellulaire ¹⁶⁴.

Il est maintenant largement admis que le caractère agressif et le pronostic d'un cancer dépend également de la composition de son microenvironnement ¹⁶⁵.

Ici, nous discuterons plus en détail du rôle des CAF et des cellules immunitaires infiltrantes qui sont des composantes majeures dans les caractéristiques du PDAC.

II.3.a - Les CAF

Les fibroblastes sont des cellules fusiformes, présentes dans le tissu conjonctif. Dans le cas des cancers, elles sont appelées CAF pour Cancer-Associated Fibroblast. Elles peuvent se présenter sous un état dit "inactif" ou un état dit "activé". En général, elles peuvent être identifiées par l'expression de marqueurs tels que : α -Smooth Muscle Actin (α -SMA), la Protéine de Surface des Fibroblastes (FSP1) et la Protéine Activée par les Fibroblastes (FAP). L'origine des CAF est diverse. Elles peuvent provenir de cellules souches mésenchymateuses (CSM), de cellules stellaires pancréatiques (PSC) activées ou de fibroblastes résidents quiescents ¹⁶⁶.

Les PSC peuvent être activées par le TGF- β , l'interleukine-6 (IL-6), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et Sonic hedgehog (Shh). Ils expriment alors l' α -SMA

et acquièrent des capacités prolifératrice, migratoire et sécrétoire de cytokines et de facteurs de croissance. Ceci va produire une boucle autocrine d'activation permettant de renforcer la migration, la prolifération, l'angiogenèse, *etc.* De plus, la sécrétion d'IL6 va avoir un rôle immunosuppresseur qui soutiendra la progression du PDAC ¹⁶⁷.

Les CAF peuvent également provenir de fibroblastes résidents qui sont transformés en CAF sous l'effet de différents facteurs de croissance, cytokines inflammatoires et chimiokines sécrétés par les cellules cancéreuses (TGFβ, FGF2, IL-6, IL-10 et PDGF) (figure 24).

Enfin, les CAF peuvent provenir de CSM. En effet, sous l'activation du TGFβ ou par l'utilisation de milieux conditionnés par des cellules cancéreuses, les CSM peuvent exprimer α-SMA, SDF1 et d'autres marqueurs caractéristiques des CAF ¹⁶⁸.

La principale origine de CAF est encore discutée et fait l'objet de nombreuses recherches.

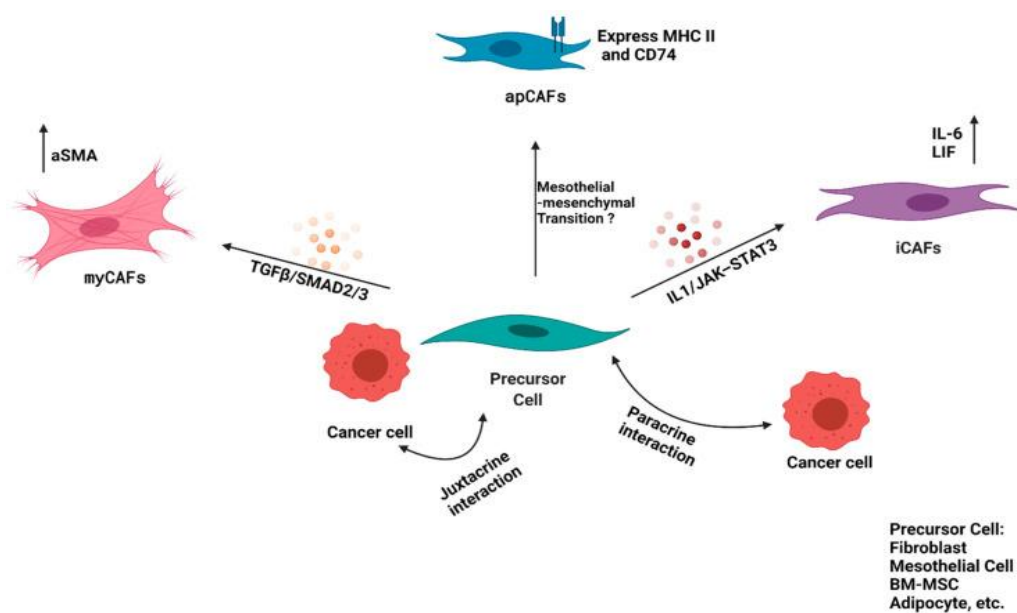


Figure 24 : Hétérogénéité des CAF ¹⁶⁹.

L'activation des CAF leur permet d'acquérir des propriétés sécrétoires et contractiles, de participer au soutien des structures cellulaires et de sécréter abondamment des molécules de la matrice extracellulaire dont le collagène.

- Rôle des CAF dans le processus tumoral

Dans le PDAC, les CAF participent et favorisent le développement tumoral. Tout d'abord, ils sont les principaux acteurs de la synthèse et du remodelage de la matrice extracellulaire et

du stroma tumoral ^{170,171}. Hwang et ses collaborateurs ont analysé le développement tumoral sur de souris porteuses de xénogreffes orthotopiques de cellules tumorales pancréatiques BxPC3 avec ou sans cellules stellaires pancréatiques humaines (HPSC) immortalisées. Ils montrent que la co-injection de cellules tumorales et de HPSC augmente l'incidence des tumeurs, des métastases et la taille des tumeurs par rapport aux tumeurs formées uniquement à partir de cellules cancéreuses. Cette étude montre également, grâce à des cultures de cellules BxPC3 incubées avec du milieu conditionné de PSC, l'implication des voies induisant la phosphorylation de ERK (extracellular-regulated kinase) et AKT (sérine/thréonine kinases) dans l'augmentation de la survie des cellules cancéreuses ¹⁷². De plus, les CAF induisent une agressivité supérieure : promotion du processus métastatique, *etc.* ¹⁷³, grâce à la mise en place de dialogue entre cellules cancéreuses et CAF et inversement. Ils peuvent également inhiber la réponse immunitaire anti-tumorale, notamment en inhibant la prolifération et l'activation des LT CD8. C'est le résultat d'une étude menée sur des souris KPC, dans laquelle une déplétion du TGF- β i protéine produite par les CAF, grâce à un anticorps anti TGF- β i, a permis de restaurer une immunité anti-tumorale associée à une diminution de la croissance tumorale ¹⁷⁴. Pour finir, Hessmann et ses collaborateurs ont mis en évidence la séquestration d'agents thérapeutiques, tels que la gemcitabine, par les CAF, dans un modèle de souris porteuses de tumeur pancréatique. En effet, une quantité 3 fois plus importante du métabolite activé de la gemcitabine a été observée, par chromatographie liquide-spectrométrie de masse/spectrométrie de masse (LC-MS/MS), dans les CAF comparativement aux cellules tumorales ou aux cellules de métastases réduisant par conséquent la quantité de gemcitabine pouvant atteindre leurs cibles : les cellules tumorales ¹⁷⁵.

Les CAF participent donc à de multiples niveaux au développement du PDAC. Ces phénomènes sont également retrouvés dans de nombreux autres cancers où les CAF sont présents. Les CAF peuvent initier le processus tumoral et favoriser le développement tumoral. Par exemple, Olumi et ses collaborateurs, en 1999, ont comparé l'effet de fibroblastes sains et celui de CAF provenant d'un cancer de la prostate sur des cellules épithéliales de la prostate initiée (mais non tumorigénique). Ils ont observé que les CAF issus de cancer de la prostate induisaient la formation de tumeur et stimulaient la croissance tumorale, contrairement aux fibroblastes sains ¹⁷⁶. Lorsque la tumeur s'est développée, les CAF peuvent continuer à participer au développement tumoral en établissant des dialogues avec les cellules cancéreuses, afin d'augmenter l'agressivité de la tumeur et/ou de participer à l'initiation des processus métastatiques. La comparaison des profils de miRNA d'exosomes de fibroblastes normaux et de fibroblastes de carcinome épidermoïde oral met notamment en évidence des exosomes avec

une quantité de miR-34a-5p diminuée dans les CAF. Or ce miR-34a-5p permet une diminution de la prolifération et de la migration cellulaire. Ainsi, par la sécrétion d'exosomes dépourvus en miR-34a-5p, les CAF participent à l'acquisition d'un phénotype plus agressif pour les cellules cancéreuses qui présentent une prolifération et une migration accrues ¹⁷⁷. Les auteurs concluent sur le potentiel thérapeutique du ciblage de la voie en aval de la signalisation par miR-34a-5p. De même, les milieux conditionnés de CAF provenant du cancer de l'endomètre stimulent la croissance de cellules cancéreuses de l'endomètre par rapport aux mêmes cellules non incubées avec les milieux conditionnés de CAF. Cet effet implique l'activation des voies PI3K/AKT et MAPK/ERK qui sont augmentées dans les cellules cancéreuses traitées par le milieu conditionné de CAF. Une augmentation de la sécrétion de 10 cytokines a également été observée dans les milieux conditionnés de CAF par rapport aux fibroblastes sains pour : IL-6 (~2 fois plus), MCP-1 (~4 fois plus), VEGF (~5 fois plus) et RANTES (~260 fois plus) ¹⁷⁸, dont certaines sont connues pour agir sur les cellules cancéreuses en favorisant leur prolifération et leur migration. De plus, les CAF peuvent former des jonctions E-cadhérine (à la membrane des cellules cancéreuses) / N-cadhérine (à la membrane des CAF d'adénocarcinome pulmonaire) avec des cellules cancéreuses (H1437 cellules d'adénocarcinome pulmonaire ou encore A431 cellules carcinome épidermique), nécessaire à la migration et l'adhésion de cellules cancéreuses dans un gel de collagène et matrigel et favorisant donc l'invasion des cellules cancéreuses ¹⁷⁹. Enfin, les CAF sont également à l'origine de la sécrétion de nombreux composants de la matrice extracellulaire (MEC) favorisant la progression du cancer et limitant l'efficacité des thérapies (chimiothérapies, radiothérapies), en faisant donc une cible thérapeutique potentielle ¹⁸⁰. En effet, les CAF sont capables de dégrader de la MEC grâce à leur sécrétion de MMP (métalloprotéases) et de synthétiser d'autres protéines de la MEC afin de la remodeler pour favoriser la progression tumorale ¹⁸¹ et la dissémination par métastases ¹⁸². De plus, les PSC activées, peuvent présenter des activités immunosuppressives (figure 25) en réduisant l'infiltration des lymphocytes T CD8 sur le site tumoral, alors qu'une infiltration plus importante de LT CD8 était associée à une meilleure survie des patients ¹⁸³. En effet, les PSC activés qui résident dans le microenvironnement tumoral empêchent la pénétration des LT CD8 dans ce compartiment. Le traitement ATRA (all-trans rétinolique acid) qui permet de rendre quiescentes ces PSC améliore l'infiltration immunitaire ¹⁸³. D'autres études montrent également que les CAF sont capables de recruter des monocytes sur le site tumoral dans le but d'induire leur différenciation en macrophage M2 *via* la sécrétion de SDF1. Ces M2 vont à leur tour permettre la transition des CAF en phénotypes plus pro-tumoraux comme les myCAF ¹⁸⁴.

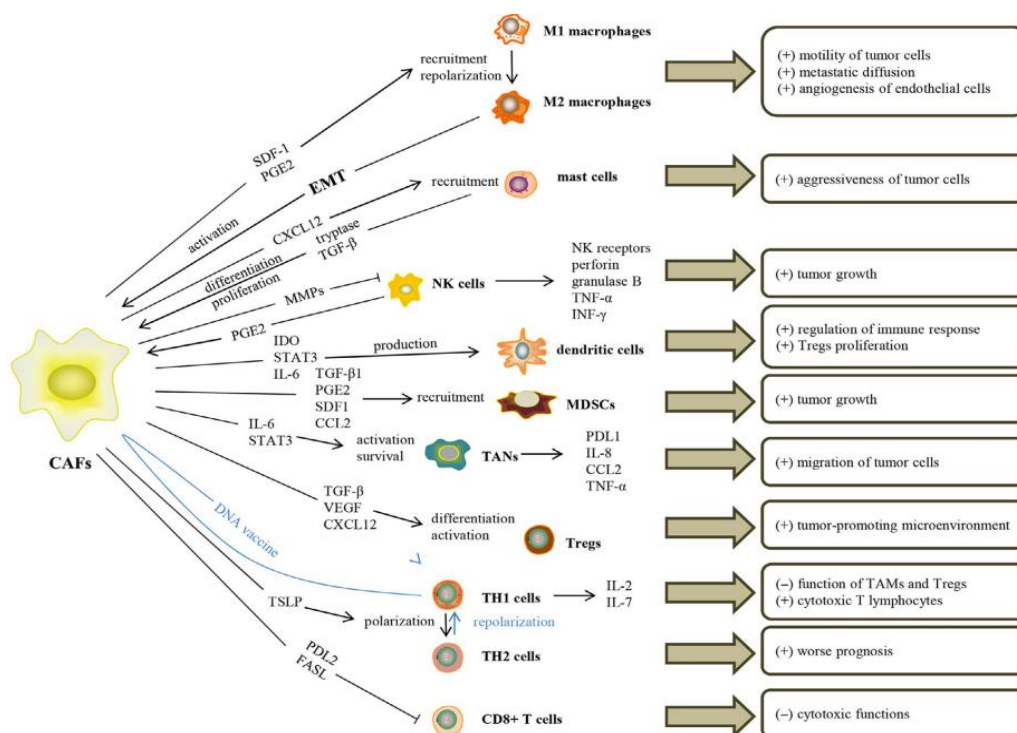


Figure 25 : Cross-talk entre les CAF et les cellules immunitaires. ¹⁸⁵

Les CAF présentent donc des effets pro-tumoraux de différentes sortes. Ils peuvent participer à l'initiation du processus tumoral et soutenir celui-ci dans le temps *via* l'établissement de dialogues avec les cellules cancéreuses, mais aussi favoriser la dissémination métastatique. De plus, ils agissent sur le microenvironnement tumoral : remodelage de la MEC, rôle immunosuppresseur limitant l'infiltration des molécules thérapeutiques et des cellules immunitaires. Pour finir, ils ont également la capacité de séquestrer les molécules thérapeutiques afin d'en réduire leur quantité au niveau des cellules cancéreuses.

Néanmoins, des études récentes soutiennent le fait que la population des CAF est très hétérogène, notamment dans le PDAC (figure 24). On distingue ^{186,187} :

- les myofibroblastes (myCAF), adjacents aux cellules cancéreuses qui vont induire la différenciation des CAF en myCAF de façon juxtacrine *via* la sécrétion de TGF- β . Ils expriment des niveaux élevés de α SMA, sont contractiles et impliqués dans le remodelage du stroma, notamment par leur sécrétion de collagène I,
- les CAF inflammatoires (iCAF), plutôt dans les zones desmoplastiques, qui sont générés par des signaux paracrines tel que IL-1. Ils expriment de faibles niveaux d' α SMA, mais des niveaux élevés de cytokines et de chimiokines avec des propriétés pro-

tumorales (CXCL12, IL6, IL8, TNF α et NF- κ B), permettant un dialogue paracrine avec les cellules tumorales et favorisant ainsi la croissance tumorale, la néovascularisation et le recrutement de macrophages,

- les CAF présentatrices d'antigène (apCAF), exprimant des gènes liés au CMH II et pouvant présenter un antigène au LT CD4 grâce à leur TCR sans molécule de co-stimulation ; ils serviraient ainsi de leurre pour désactiver les LT CD4 induisant leur anergie et réduisant la réponse immunitaire antitumorale.

Ces études ont essayé de classer les CAF en fonction de leur activité "pro-tumorale" ou "anti-tumorale" selon leur phénotype. Les myCAF ont donc premièrement été classés comme des cellules pro-tumorales en raison de leur capacité de remodelage de la MEC et de sécrétion de collagène I dont le taux important est corrélé à un mauvais pronostic pour les patients ¹⁸⁸. Ils participent à la formation de supports stromaux favorisant la dissémination de cellules cancéreuses et formant une barrière limitant la pénétration des chimiothérapies, *etc.* ¹⁸⁹. Néanmoins, une déplétion de ces cellules favorise la progression tumorale et diminue l'espérance de vie des souris ^{187,190}. Le mécanisme par lequel les myCAF agissent de façon bénéfique n'est pas vraiment clair. L'hypothèse est que le ciblage des myCAF, qui induit une diminution du volume stromal, implique également une meilleure vascularisation de la tumeur, favorisant d'un côté, une délivrance des chimiothérapies plus efficace et d'un autre côté la progression de la tumeur grâce à la meilleure vascularisation et une levée d'inhibition des disséminations métastatiques provoquées par la diminution de la sécrétion de collagène I ¹⁹¹.

D'autre part, le phénotype des CAF peut être modifié et induire un changement de sous-type. Par exemple, une cellule myCAF peut devenir une iCAF, puis se redifférencier en myCAF ¹⁸⁷. Ainsi, le ciblage des iCAF par un inhibiteur de la voie de différenciation en iCAF (inhibiteur de JAK) entraîne une up-régulation de la différenciation en myCAF et est associé à une réduction de la progression tumorale sur des souris KPC (PDX1-Cre; Kras^{LSLG12D/+}; p53^{LSLR172H} souris mutées KRAS et TP53 dans le pancréas, développant spontanément une tumeur pancréatique) ¹⁹². Malgré cet effet bénéfique, la sécrétion de collagène (rendant l'accès difficile aux molécules thérapeutiques) est, elle aussi, augmentée en raison de la proportion plus importante de myCAF. Les auteurs concluent qu'il serait intéressant de cibler les iCAF en combinaison avec un inhibiteur de la desmoplasie induite par les myCAF tout en maintenant le phénotype myCAF qui a montré un effet anti-tumoral ¹⁹².

- Ciblage thérapeutique des CAF

Du fait de leurs rôles pro-tumoraux, le ciblage thérapeutique des CAF est envisagé pour potentialiser les effets des thérapies anticancéreuses. En utilisant du minnélide, composé qui permet une régulation négative de la voie du TGF- β dans les CAF, Dauer et ses collaborateurs montrent une diminution du dialogue et de la signalisation oncogéniques des CAF : diminution de la signalisation de Sp1 (facteur de transcription surexprimé dans le PDAC, activant des voies anti-apoptotiques comme la voie NF- κ B) dans les cellules cancéreuses pancréatiques MiaPaca2 incubées avec du milieu conditionné de CAF traités au minnélide.¹⁹³ Des capsules de minnélide™ sont en cours d'étude en association ou non avec le paclitaxel pour le traitement du cancer gastrique, les résultats devraient être connus en juin 2024 (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT05566834).

D'autres études ont été menées pour réduire le nombre de cellules α -SMA et FAP positives. Néanmoins, la suppression des myCAF dans des modèles de PDAC chez la souris KPC a montré une augmentation de l'invasion tumorale caractérisée par une diminution de la fibrose, une augmentation de l'hypoxie dans la tumeur et une stimulation de la Transition Epithélio-Mésenchymateuse (TEM). Ces effets sont corrélés avec une diminution importante de la survie des souris déficientes en myCAF. De plus, la diminution de la sécrétion de collagène de type 1 et de la fibrose engendrée par la déplétion en myCAF ne permettaient pas d'augmenter l'efficacité thérapeutique de la gemcitabine¹⁹⁰.

Suivant les stades de développement du cancer et suivant les phénotypes de CAF, ces cellules peuvent donc avoir des effets plutôt pro- ou anti-tumoraux. La recherche s'oriente donc de plus en plus vers une suppression sélective de certains sous-types de CAF ou une reprogrammation des CAF plutôt que leur suppression totale¹⁹⁴.

Par exemple, l'immunotoxine α FAP-PE38, ciblant les CAF exprimant FAP permet un épuisement des CAF sur un modèle de cancer du sein métastatique 4T1 chez la souris. Le traitement par α FAP-PE38 induit des modifications du microenvironnement tumoral : il induit une réduction de l'expression de TGF- β , VEGF, MP-9, impliqués dans la progression tumorale, et une diminution des macrophages associés aux tumeurs (TAM). La déplétion en CAF exprimant FAP a ainsi permis un ralentissement de la croissance tumorale¹⁹⁵.

Les iCAF sont des cellules pro-tumorales notamment par leur expression élevée d'IL-6 qui va inhiber l'activité des cellules NK, diminuer la sensibilité de la tumeur aux traitements *etc.* L'inhibition de l'activité de l'IL-6 par un anticorps anti-récepteur IL6 (tocilizumab) ou une protéine bloquant sa signalisation (sgp130Fc) sur un modèle orthotopique (cellules Colo357)

de PDAC induit une inhibition de la croissance tumorale et une diminution du nombre de métastases ¹⁹⁶. Une étude clinique de phase 2 est en cours pour évaluer l'efficacité de la combinaison du Tocilizumab en combinaison avec du nab-paclitaxel ou la gemcitabine (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02767557).

En conclusion, il existe plusieurs sous-types de CAF ayant chacun une différenciation et des rôles spécifiques. Cette catégorisation n'est pas figée et le phénotype des CAF peut évoluer en fonction des conditions et des signaux environnementaux. De nombreuses études ont mis en évidence le rôle pro-tumoraux des CAF. Certaines ont essayé de dépléter cette population cellulaire dans le PDAC, mais sans effet bénéfique. Les rôles des CAF sont donc très complexes et continuent encore d'être au cœur de nombreuses recherches. A l'heure actuelle, des stratégies plus ciblées sont envisagées, telles que le ciblage de certain(s) phénotype(s) de CAF ou de certaine(s) de leur(s) voie(s) de signalisation intéressante(s) pour lutter contre le PDAC.

II.3.b - Les cellules immunitaires

Une autre des composantes principales du microenvironnement du PDAC est constituée par la population de cellules immunitaires. L'immunité a des rôles ambivalents. D'une part, elle peut créer de l'inflammation et avoir un rôle clef dans la progression tumorale. D'autre part, elle peut activer des voies de réponse immunitaire anti-tumorale. De plus, les cellules tumorales ont la capacité de mettre en place des systèmes leur permettant d'échapper aux cellules immunitaires.

- Les macrophages

La sécrétion de multiples cytokines, chimiokines au niveau du site tumoral permet le recrutement de monocytes circulants. Ils deviennent alors des macrophages du microenvironnement tumoral, appelés TAM pour Tumor-Associated Macrophage. On distingue deux populations de TAM : les macrophages de type 1 (M1) ont un rôle anti-tumoral et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires alors que les macrophages de type 2 (M2) ont, au contraire, un rôle pro-tumoral *via* la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires, ils sont également associés à un mauvais pronostic ¹⁹⁷. De manière générale, l'infiltration des TAM est

plutôt un marqueur de mauvais pronostic. Cette infiltration participe notamment à l'accélération de la progression tumorale ; leur infiltration dans des souris KPC a été associée à un développement plus rapide des lésions pré-cancéreuses¹⁹⁸. Chez des patients atteints de PDAC, une expression élevée de CCL2 induit un recrutement élevé des macrophages exprimant le récepteur CCR2, corrélé à une faible infiltration des LT CD8 et une survie diminuée. Des souris déficientes en CCR2, donc caractérisées par la voie CCL2/CCR2 inactive, présentent une diminution du recrutement des macrophages, une meilleure infiltration immunitaire et un ralentissement de la croissance tumorale¹⁹⁹. C'est d'ailleurs cette voie CCL2/CCR2 qui a été montrée comme étant à l'origine du recrutement des monocytes qui acquièrent un phénotype M2²⁰⁰. Des études sont donc en cours pour cibler les macrophages M2 associés aux tumeurs, mais également pour essayer de favoriser le phénotype M1 anti-tumoral par rapport au phénotype M2.

- Les cellules suppressives dérivées de myéloïdes

Les MDSC (Myeloid derived suppressor cell) sont une population de cellules hétérogènes, non différenciées provenant de la moelle osseuse. Comme pour les macrophages, ces cellules peuvent être recrutées sur le site tumoral *via* différentes chimiokines et cytokines comme CCL2 ou CSF1 produit par les cellules cancéreuses. Les MDSC sécrètent des facteurs pro-angiogéniques, tel que VEGF. Elles sont également immunosuppressives et corrélées à un taux de survie diminué. Les MDSC surexpriment PD-L1 (Programmed Death-Ligand 1) lorsqu'elles entrent en contact avec des LT CD4 ou LT CD8 et ainsi induisent leur inactivation²⁰¹. De plus, cette population cellulaire est capable de favoriser le développement des LT régulateurs (Treg)²⁰², connus pour leur rôle immunosuppresseur. Pour finir, des études montrent qu'elles participent également aux mécanismes de résistance aux traitements du PDAC²⁰³.

- Les cellules natural killer

Les cellules NK (Natural Killer) sont des lymphocytes issus de la moelle osseuse. Elles expriment CD56, molécule d'adhésion et NCR (récepteur naturel de cytotoxicité) mais ne possèdent pas de TCR (récepteur des lymphocytes T). Acteur clef de l'immuno-surveillance, ces cellules peuvent directement reconnaître et tuer des cellules tumorales (sans activation préalable par un antigène) *via* la libération de granules de perforine et granzyme (molécules

cytotoxiques) ou par la liaison de ligand de mort (TNF et FasL) provoquant l'apoptose des cellules tumorales. Les NK ont montré des activités anti-tumorales très efficaces ²⁰⁴ et une potentialisation des effets antitumoraux de l'immunothérapie anti-PDL1 (Programmed cell Death protein 1) ²⁰⁵. Une étude menée sur 19 patients atteints de PDAC a montré que l'augmentation du taux de NK circulantes était corrélé à un meilleur pronostic pour les patients ²⁰⁶. Néanmoins, à un stade avancé de PDAC, les NK peuvent présenter des défauts de dégranulation et être associées à des récives plus importantes et un pronostic moins bon pour les patients atteints de PDAC ²⁰⁷.

- Les neutrophiles

Les neutrophiles représentent la population la plus abondante de leucocytes circulants. Par la sécrétion de cytokines, les cellules cancéreuses vont attirer les neutrophiles sur le site tumoral. Ils vont alors devenir des TAN (Tumor Associated Neutrophil) qui vont produire des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL12, l'IL10 et le TNF- α . Cette sécrétion notamment d'IL10 et de TNF- α va inhiber l'infiltration des lymphocytes sur le site tumoral. Les neutrophiles favorisent la progression du cancer ²⁰⁸. Leur inhibition a été associée à une inhibition de la croissance tumorale ²⁰⁹. De plus, ces cellules contiennent des granules dont certains, lorsqu'ils sont libérés, relarguent l'enzyme MMP-9 (métalloprotéinase matricielle 9) qui dégrade des protéines de la MEC et facilite l'invasion des cellules tumorales, augmente la vascularisation, *etc*, favorisant la progression de la tumeur ²¹⁰.

- Les lymphocytes T

Les lymphocyte T (LT) font partie de l'immunité adaptative. Ils peuvent être activés par des cellules présentatrices qui vont leur présenter des antigènes tumoraux. Une fois activés, ils peuvent reconnaître et tuer les cellules cancéreuses. Parmi les lymphocytes T, ce sont plus précisément les LT CD8 et LT CD4 qui sont considérés comme anti-tumoraux car leur infiltration est associée à un meilleur pronostic pour le PDAC ²¹¹. Au contraire, une faible infiltration de LT antitumoraux est corrélée à un mauvais pronostic ²¹². L'expression de FAP et CXCL12 par les CAF inhibe l'infiltration des LT dans la tumeur et le ciblage de cette voie permet de potentialiser l'effet de l'immunothérapie anti-PDL1 ²¹³. Dans le PDAC, le microenvironnement dense diminue l'infiltration des LT antitumoraux. La population de

lymphocytes T se répartie de façon très inégale et très variable d'un patient à l'autre. De plus, leurs rôles antitumoraux peuvent être inhibés ou limités par les MDSC, les macrophages de type 2 mais également les lymphocytes Treg dont la présence est associée à un mauvais pronostic dans le PDAC ²¹⁴. Ces cellules Treg sont des inhibiteurs très puissants de l'immunité anti-tumorale, mais leur mécanisme d'action n'est pas encore connu. Néanmoins il a été montré qu'elles peuvent diminuer l'activité des cellules LT CD4, LT CD8 et NK. Par conséquent, de nouvelles stratégies thérapeutiques contre le cancer du pancréas s'orientent vers la déplétion des Treg ²¹⁵.

II.4 - Diagnostic

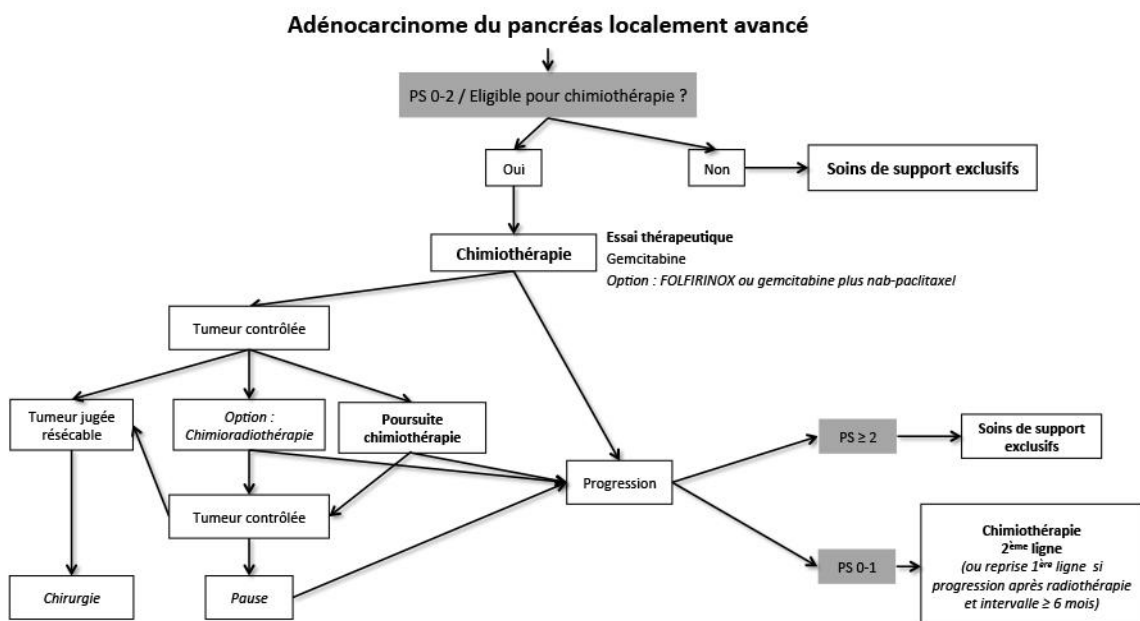
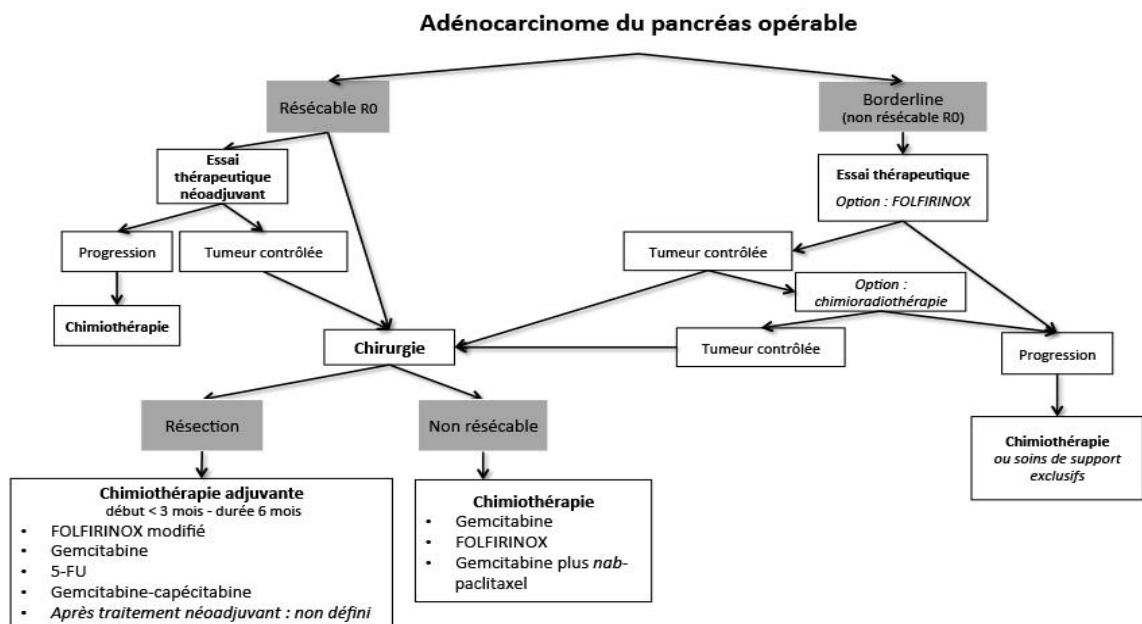
Comme expliqué précédemment, l'adénocarcinome pancréatique reste relativement longtemps asymptomatique. De plus, lors de l'apparition des premiers symptômes, ceux-ci sont relativement aspécifiques. Tout cela contribue à entraîner un retard de diagnostic et donc un pronostic pessimiste.

Des études sont en cours pour évaluer l'utilisation de biomarqueurs précoces dans le diagnostic du PDAC et l'identification des personnes présentant un risque plus important de développer un PDAC et donc pouvant faire l'objet d'une surveillance particulière ²¹⁶.

Au fur et à mesure de l'évolution de la maladie, lorsque le stade devient avancé, des symptômes peuvent apparaître tels que des douleurs dans l'estomac et le dos, une perte de poids, de la fatigue, un ictère, des problèmes digestifs, *etc.* Une échographie endoscopique est alors prescrite pour détecter la présence éventuelle de tumeur. Puis, c'est une tomodensitométrie (scanner) ou une IRM qui est réalisée afin d'évaluer plus précisément la tumeur : sa taille, sa localisation précise, *etc.* De manière générale, la tomodensitométrie est privilégiée car elle permet d'obtenir des renseignements plus précis comme la vascularisation de la tumeur *etc.*, ce qui permet d'affiner le grade du cancer. Néanmoins, l'IRM peut tout de même être fait pour un complément d'information et il est également préconisé pour les patients ne pouvant pas être soumis à la tomodensitométrie (patient avec insuffisance rénale par exemple). Ces examens sont complétés par des analyses sur les tissus cancéreux après biopsie, réalisée notamment lors d'une écho-endoscopie. Toutes ces informations vont permettre de choisir le protocole thérapeutique à privilégier pour le patient.

II.5 – Thérapie

L'adénocarcinome pancréatique est classé en plusieurs catégories qui permettent de déterminer le schéma thérapeutique à suivre : résecable, borderline, localement avancé ou métastatique. Ces "arbres" décisionnels (figure 26) sont publiés sur le site de la Société Nationale Française de Gastro-Entérologie et présentent le schéma thérapeutique à suivre en fonction des différents types de PDAC et de leur réponse lors de la prise en charge.



Adénocarcinome du pancréas métastatique

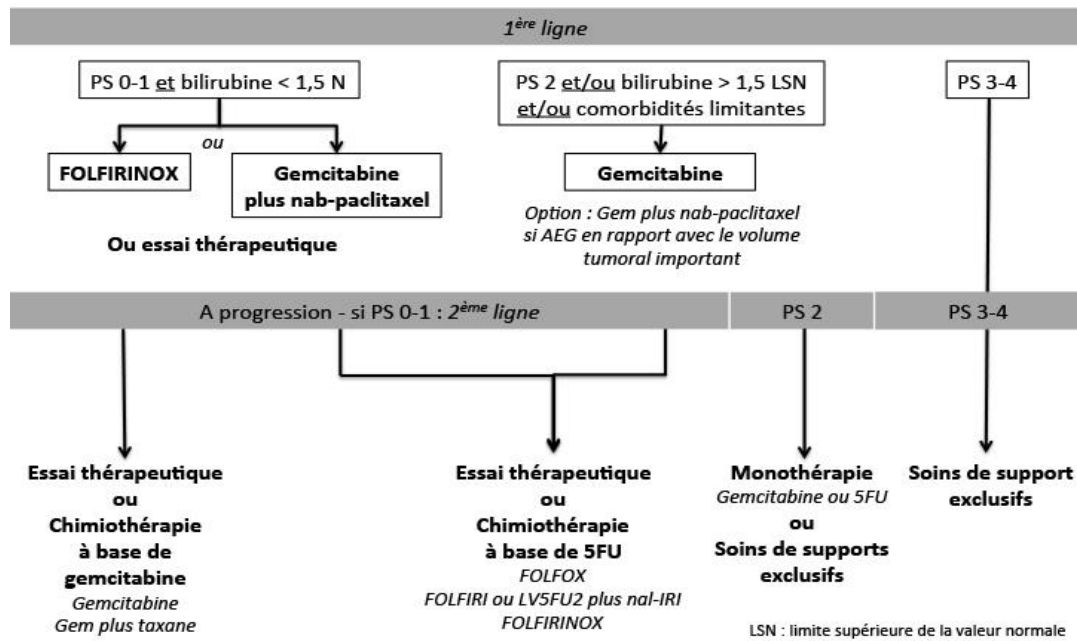


Figure 26 : Algorithmes décisionnels des stratégies thérapeutiques pour le traitement du PDAC en fonction de la classification. <https://www.snfge.org/content/9-cancer-du-pancreas>

II.5.a - Chirurgie

La résection chirurgicale reste à l'heure actuelle la stratégie thérapeutique la plus efficace, lorsqu'elle est possible pour le traitement du PDAC. Les taux de survie peuvent atteindre jusqu'à 20% à 5 ans pour des patients réséqués. Si les examens concluent à une tumeur localisée, sans métastase à distance, sans atteinte au niveau de l'artère mésentérique, l'axe cœliaque, la chirurgie peut être proposée au patient (figure 27). La chirurgie permet de diminuer les risques de mortalité et de morbidité chez le patient. On parle de pancréaticoduodénectomie pour les tumeurs de la tête ou du corps du pancréas et de pancréatectomie distale pour les tumeurs de la queue du pancréas.

Vaisseau en contact	Résécable	Borderline résécable	Non résécable
VP-VMS	IVT < 180°	IVT ≥ 180° «reconstructible»	Occlusion «non reconstructible»
AMS	0	IVT < 180°	IVT ≥ 180°
AHC	0	«reconstructible»	«non reconstructible»
TC	0	IVT < 180°	IVT ≥ 180°

IVT: interface vaisseau tumeur; VP: veine porte; VMS: veine mésentérique supérieure; AMS: artère mésentérique supérieure; AHC: artère hépatique commune; TC: tronc cœliaque.

Figure 27 : Définition de la résécabilité ou non du PDAC ²¹⁷

Lors des premiers rapports médicaux dans les années 1980, la résection était associée à une mortalité opératoire de plus de 30% des patients et combinée à un taux de survie après opération de seulement quelques mois. Le Dr Allen Whipple (1881-1963), chirurgien américain qui a beaucoup travaillé sur la chirurgie du PDAC, a développé la procédure, nommée depuis procédure Whipple, qui a permis d'améliorer la technique et le taux de survie des patients. Depuis, des améliorations constantes ont permis d'augmenter le taux de survie des patients réséqués. La combinaison de la chirurgie à des traitements adjuvants (décrit dans les prochaines parties) a permis d'augmenter la médiane de survie des patients à plus de 4 ans après l'opération ²¹⁸ (figure 28).

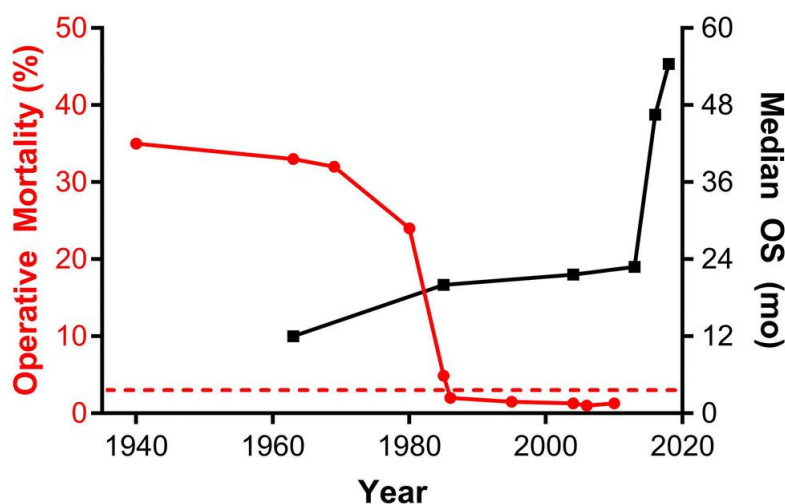


Figure 28 : Amélioration de la mortalité opératoire après une pancréaticoduodénectomie et de la survie médiane des patients atteints d'un PDAC résécable ²¹⁸.

II.5.b - Radiothérapie

La radiothérapie consiste à appliquer des radiations ionisantes de haute énergie de façon localisée afin d'induire des dommages à l'ADN qui conduiront à la mort des cellules. Elle peut se faire avant et/ou après résection et en combinaison ou non avec de la chimiothérapie. La radiothérapie est donc effectuée dans un but curatif si elle est utilisée afin d'éliminer le maximum de cellules cancéreuses, ou adjuvante en combinaison avec d'autres thérapies pour limiter au maximum le risque de récurrence ou en tant que traitement palliatif pour améliorer le confort du patient dont le cancer est à un stade avancé et qui n'a pas de traitement curatif ²¹⁹. Néanmoins, la radiothérapie peut endommager des cellules saines et organes adjacents à la tumeur. Cela peut entraîner de nombreux effets indésirables et altérer la qualité de vie du patient ²²⁰. Le patient peut également présenter des problèmes de peau dû aux radiations.

La radiothérapie pour le traitement du PDAC se fait par l'application de rayonnements externes, le plus souvent avec des séances de 15 minutes par jours, 5 jours par semaines, sur une période de 5 à 6 semaines. La radiothérapie est généralement associée à de la chimiothérapie. On parle alors de chimioradiothérapie.

II.5.c - Chimiothérapies

En 1997, une première étude a comparé l'utilisation de la gemcitabine par rapport au 5-fluorouracile (5-FU) hebdomadaire qui était alors utilisé comme traitement de référence contre le PDAC. Bien que la médiane de survie n'ait augmenté que d'un mois passant de 4 à 5 mois, une proportion non négligeable de patients avait une survie supérieure à un an : 18% pour ceux traités avec la gemcitabine contre 2% pour ceux traités au 5-FU ²²¹. De plus, la gemcitabine était mieux tolérée que le 5-FU par les patients. Le mode d'action de la gemcitabine est décrit dans le Vidal de la façon suivante : « La gemcitabine (dFdC) est métabolisée dans les cellules par des nucléosides kinases en nucléosides diphosphate (dFdCDP) et triphosphate (dFdCTP) actifs. L'action cytotoxique de la gemcitabine semble due à l'inhibition de la synthèse de l'ADN par la double action du dFdCDP et du dFdCTP. D'abord, le dFdCDP inhibe la ribonucléotide réductase qui agit comme unique catalyseur des réactions qui produisent des désoxynucléosides triphosphates destinés à la synthèse de l'ADN. L'inhibition de cette enzyme par le dFdCDP

entraîne une réduction des concentrations de désoxynucléosides en général, et du dCTP en particulier. En second lieu, le dFdCTP entre en compétition avec le dCTP pour son incorporation dans l'ADN (auto-potentialisation). » La gemcitabine permet donc un arrêt du cycle cellulaire et une inhibition de la prolifération des cellules tumorales.

En 2011, Conroy et ses collaborateurs publient les résultats d'une étude utilisant le folfirinox pour le traitement de patients atteints de PDAC à un stade très avancé. Ce traitement associant l'oxaliplatine, le 5-FU, l'irinotécan et l'acide folinique a permis de quasiment doubler la médiane de survie passant de 6 mois pour les patients traités avec la gemcitabine seule, à 11 mois pour les patients avec le protocole folfirinox et un taux de survie après un an de 48%. L'atout du folfirinox est de combiner le mode d'action de 3 molécules : le 5-FU qui est un antimétabolite analogue des bases pyrimidiques, l'oxaliplatine inhibiteur de la synthèse d'ADN et l'irinotécan inhibiteur de l'ADN topoisomérase 1. Bien que le folfirinox présente des effets indésirables non négligeables (diarrhées, nausées, *etc.*), la dégradation de la qualité de vie à 6 mois était présente chez 31% du groupe folfirinox contre 66% des patients du groupe traité à la gemcitabine ²²².

En 2013, une étude a montré l'intérêt de combiner la gemcitabine au nab-paclitaxel appelé Abraxane®. Le nab-paclitaxel est du paclitaxel lié à l'albumine pour une meilleure solubilité et biocompatibilité. Le paclitaxel est "un agent ciblant les microtubules : il stimule l'assemblage des dimères de tubuline en microtubules et stabilise les microtubules en empêchant leur dépolymérisation. Cette stabilité inhibe alors la réorganisation dynamique normale du réseau de microtubules, un phénomène essentiel aux fonctions vitales des cellules au cours de l'interphase et de la mitose. De plus, le paclitaxel induit la formation anormale de groupements ou de faisceaux de microtubules pendant toute la durée du cycle cellulaire et la constitution de multiples asters de microtubules pendant la mitose." d'après le Vidal. Les résultats de l'étude comparative ont montré une amélioration de la survie des patients de quelques mois pour le groupe gemcitabine plus nab-paclitaxel : 8,5 mois de survie globale médiane, par rapport au groupe traité à la gemcitabine seulement : 6,7 mois ²²³.

Le PDAC est connu pour être un cancer particulièrement résistant à la chimiothérapie ²²⁴. Actuellement, les chimiothérapies privilégiées pour le traitement du PDAC sont le folfirinox ou la gemcitabine associée ou non au nab-paclitaxel qui permettent seulement de prolonger l'espérance de vie des patients de quelques mois si le patient n'est pas éligible à la résection.

II.5.d - Immunothérapie

L'immunothérapie est très étudiée pour améliorer la prise en charge des patients atteints de PDAC. L'immunothérapie a déjà fait ses preuves pour le traitement de certains cancers à des stades avancés, lorsque les chimiothérapies conventionnelles seules ne suffisaient plus. Dans leur revue, Hargadon et ses collaborateurs citent un grand nombre de cancers (mélanome non résecable ou métastatique, carcinome urothélial localement avancé ou métastatique, *etc.*) dont le traitement par immunothérapie a été approuvé par le FDA ²²⁵. Néanmoins, cela semble plus compliqué dans le cas du PDAC. Malgré tout, des équipes ont mis en évidence des traitements qui pourraient sensibiliser les cellules cancéreuses aux chimiothérapies et ainsi améliorer l'espérance de vie des patients. L'immunothérapie se base sur la stimulation du système immunitaire du patient dans le but de tuer les cellules cancéreuses.

Cependant, comme nous l'avons détaillé précédemment, le microenvironnement du cancer du pancréas rend l'infiltration des cellules immunitaires compliquée. Le microenvironnement du PDAC peut également mettre en place des systèmes de résistance. Par exemple, PD-1 (Programmed cell Death protein 1) est une protéine présente à la surface des cellules immunitaires dont les lymphocytes T. Son ligand PD-L1 peut être exprimé par les cellules cancéreuses. La liaison PD-1 / PD-L1 provoque une inactivation de la cellule immunitaire (point de contrôle immunitaire) et donc inactive la réponse immunitaire anti-tumorale des lymphocytes T exprimant PD-1. C'est pour cela qu'une équipe a mis en évidence qu'un médicament inhibiteur de Pin1, proline isomérase suractivé dans les cellules cancéreuses du pancréas et les CAF et associée à un mauvais pronostic, combiné avec de la l'immunochimiothérapie anti PD-L1 et la gemcitabine permet d'éradiquer le cancer du pancréas chez 4 modèles de PDAC murins (dont des PDX de patients en greffe orthotopique). Cette étude met en évidence la possibilité de sensibiliser le PDAC à l'immunothérapie et l'intérêt d'utiliser cette stratégie pour sensibiliser les cellules cancéreuses à la chimiothérapie utilisée en clinique, ici la gemcitabine ²²⁶. De même, un essai clinique est en cours pour évaluer l'effet de combiner l'anticorps anti PD-L1 avec une thérapie ciblée anti-CSF1R (anticorps qui permet d'inhiber la prolifération des macrophages pro-tumoraux M2 en se fixant le CSF1 exprimé à leur membrane) afin de sensibiliser le PDAC à l'immunothérapie anti-PD-L1 (<https://www.fondation-arc.org/projets/augmenter-efficacite-immunotherapie-sujets-atteints-cancer-colorectal-cancer-pancreas-phase-avancee-metastatique>) (figure 29). Ces études

soulignent le potentiel atout d'avoir recours à l'immunothérapie anticorps anti-PDL1 après avoir restitué la sensibilité du PDAC à l'immunothérapie.

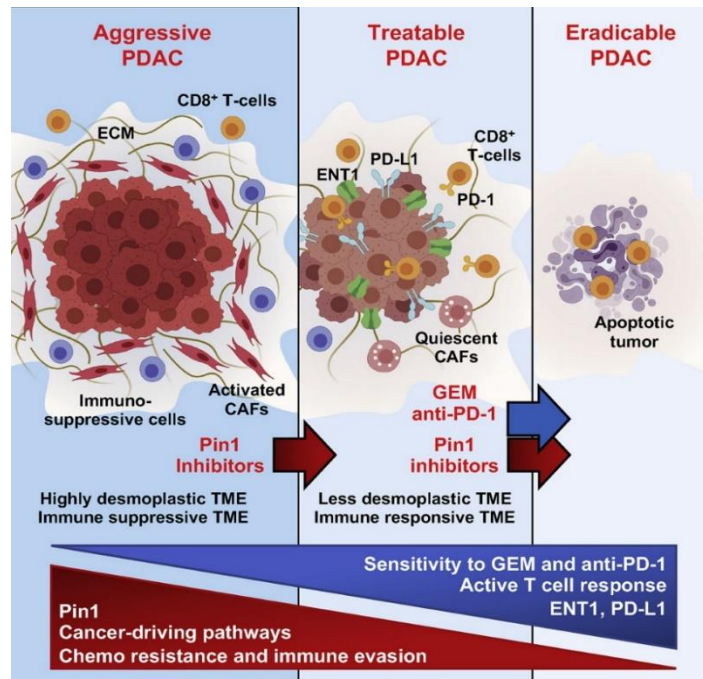


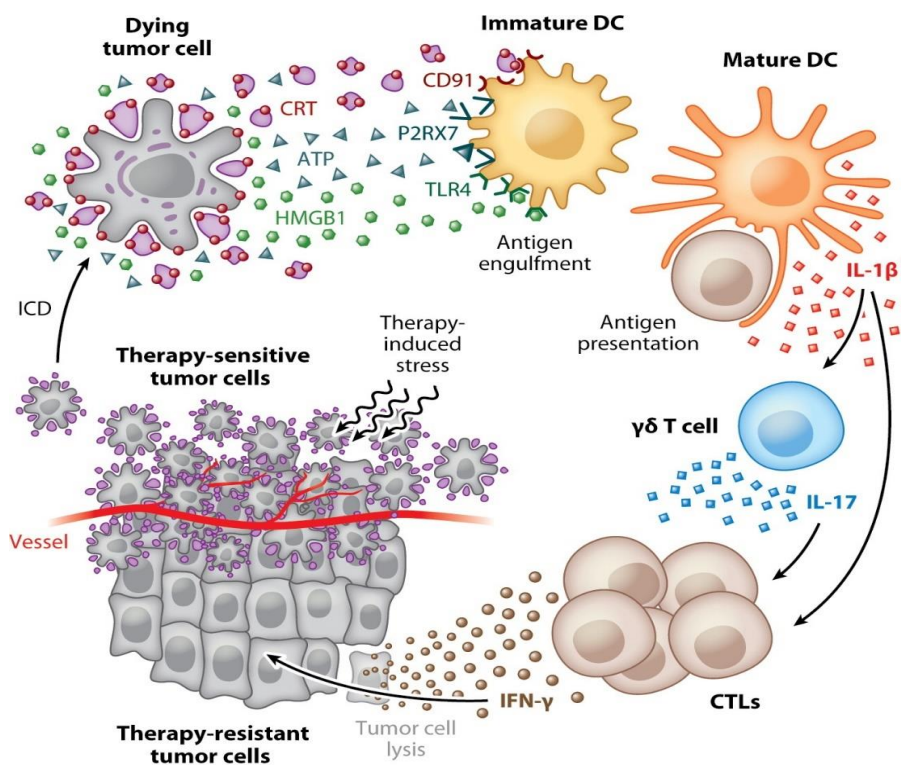
Figure 29 : Schéma représentant l'état du PDAC avec un ciblage de Pin1. Sensibilité accrue à l'immunochimiothérapie permettant le traitement du PDAC par la gemcitabine et un anti-PD-L1.

De par son microenvironnement très dense, l'immunothérapie ne semblait pas être la thérapie idéale pour le PDAC. Mais ces dernières années, des stratégies sont développées pour restaurer la sensibilité du PDAC à l'immunothérapie. Bien qu'elle ne soit pas encore utilisée en routine pour le traitement du cancer du pancréas, de plus en plus d'études montrent son atout pour potentialiser ou agir en synergie avec les traitements conventionnels afin d'éradiquer les tumeurs. Des stratégies utilisant les nanoparticules dans le but de sensibiliser le PDAC à l'immunothérapie sont également étudiées (cf partie II.6 - Nanomédecine et adénocarcinome pancréatique).

II.5.e - Mort cellulaire immunogène

Certaines chimiothérapies utilisées pour le traitement du PDAC peuvent induire de la mort cellulaire immunogène, comme l'oxaliplatine, composant du folfirinox, par exemple

^{227,228}. Il est admis que des cellules cancéreuses qui entrent dans certains processus de mort peuvent sécréter ou exposer à leur surface un certain nombre de DAMP pour Damage Associated Molecular Pattern ²²⁹, initiateur de cette voie de mort immunogène. Ces DAMP peuvent être reconnus par des cellules présentatrices d'antigène, comme les cellules dendritiques et les macrophages, qui vont alors activer les lymphocytes T cytotoxiques et potentialiser une réponse anti-tumorale (figure 30). Parmi ces DAMP, on peut citer les plus couramment étudiés pour l'analyse de la réponse immunitaire anti-tumorale : la calréticuline, les protéines HSP70 et HSP90, l'ATP et HMGB1. Nous développerons donc ces principaux DAMP (figure 29). D'ailleurs, c'est l'exposition membranaire de la calréticuline et de HSP70 et le relargage de HMGB1 et d'ATP qui sont responsables de l'initiation de la voie de mort immunogène après traitement par l'oxaliplatine ²³⁰. De plus, dans des modèles de PDAC (souris C57BL/6 avec xélogreffe orthotopique de cellules KCKO ou Panc02), l'augmentation de l'expression membranaire de la calréticuline et de la sécrétion de HMGB1 après traitement par radiothérapie et folfirinox ont permis une augmentation du nombre de lymphocytes CD8 au niveau de la tumeur induisant une régression tumorale plus efficace que les traitements individuels ²³¹.



R Kroemer G, et al. 2013.
Annu. Rev. Immunol. 31:51–72

Figure 30 : Représentation schématique de la mort cellulaire immunogène sur des cellules cancéreuses.

- La calréticuline

La calréticuline (CalR) est une protéine de 46kDa, résidente du réticulum endoplasmique (RE). C'est une protéine chaperonne qui aide au repliement de protéines et participe à l'homéostasie du calcium. Lors d'un stress cellulaire, elle est excrétée par exocytose du RE vers l'appareil de Golgi, puis exposée à la surface de la membrane plasmique. Cette exposition à la surface des cellules va induire la phagocytose de ces cellules par des cellules présentatrices d'antigènes, participant à l'immunité antitumorale adaptative ²³². L'inhibition de l'expression de CalR induit une diminution de l'efficacité du traitement par anthracyclines, chez des souris immunocompétentes porteuses de xélogreffe réalisée avec des cellules tumorales colorectales murines CT26. Cette baisse d'efficacité est liée à une diminution de la phagocytose des cellules cancéreuses. De plus, des souris qui avaient été guéries de ces tumeurs, puis auxquelles d'autres cellules CT26 ont été greffées n'ont pas développé de cancer, montrant alors l'établissement d'une immunité anti-tumorale durable ²³³. Enfin, chez des patients atteints de leucémie myéloïde aigue, l'exposition de CalR à la surface des cellules leucémiques est positivement corrélée à l'activation des lymphocytes T, permettant d'envisager d'utiliser l'expression membranaire de la calréticuline comme marqueur pronostic ²³⁴.

- Les protéines HSP

Les protéines HSP (Heat Shock Protein) sont des protéines de choc thermique et chaperonnes qui se divisent en plusieurs familles. Elles sont présentes dans plusieurs compartiments cellulaires : cytosol, réticulum endoplasmique, mitochondrie, mais elles peuvent également être membranaires ou sécrétées. Ce sont des protéines de 70 et 90 kDa dont le rôle est assez controversé et dépend de la localisation, du type cellulaire *etc.* Par exemple, la famille des HSP70 et HSP90 sont des DAMP qui peuvent stimuler une réponse immunitaire antitumorale, participer à une meilleure activation des cellules présentatrices de l'antigène, mais elles peuvent également favoriser la progression tumorale ²³⁵. Une étude a montré que le traitement de cellules du myélome U266 par du bortézomib, un anticancéreux (inhibiteur spécifique du protéasome 26S), permet d'augmenter l'expression membranaire de HSP90 par les cellules mourantes. Cette augmentation de l'expression membranaire de HSP90, permet une reconnaissance des cellules mourantes par les cellules dendritiques et ainsi une stimulation de la réponse immunitaire anti-tumorale. Ces effets ne sont pas retrouvés lorsque le

geldanamycine, inhibiteur de HSP90, est ajouté au traitement, soulignant la nécessité de l'exposition de HSP90 pour la stimulation immunitaire dans cette étude ²³⁶.

- **L'ATP**

L'ATP (Adénosine Triphosphate) est un facteur clé du métabolisme bioénergétique de la cellule. En réponse à un stress ou certaines voies de mort cellulaire, il peut être sécrété. La libération d'ATP peut se faire par les cellules apoptotiques caractérisées par une activation des caspases 3 ou 7. L'autophagie est également un processus induisant une libération d'ATP puisque des tumeurs déficientes en autophagie n'ont pas montré de réponse immunitaire anticancéreuse suite au traitement par chimiothérapie. L'ATP sécrété par les cellules mourantes permet alors la stimulation de réponse immunitaire ²³⁷. Sa dégradation par une enzyme, CD39, dans des cellules MCA205 (fibrosarcome) combiné à un traitement chimiothérapeutique (anthracycline mitoxanthrone), ne permet pas une vaccination anti-cancéreuse efficace. En effet, après inoculation sous cutanée des cellules mourantes déficientes en ATP et traitées par chimiothérapie, une greffe de cellules MCA205 a permis un développement de tumeur dans une souris immunocompétente (C57Bl/6), contrairement à la vaccination par des cellules mourantes traitées par chimiothérapie uniquement (sans traitement CD39). Ceci confirme le rôle majeur de la libération d'ATP par les cellules mourantes après traitement chimiothérapeutique pour stimuler la réponse immunitaire anti-tumorale ²³⁸.

- **HMGB1**

HMGB1 (High Mobility Group Box 1) est une protéine nucléaire très abondante. Elle participe à l'organisation de l'ADN et à la régulation de la transcription. Lorsque des cellules sont mourantes et que leur membrane plasmique et nucléaire sont perméabilisées, HMGB1 peut être libérée de façon passive dans le milieu extracellulaire. Elle se lie alors au TLR4 des cellules dendritiques et stimule ainsi la présentation des antigènes tumoraux et l'activation de lymphocytes T, tout en favorisant la sécrétion de protéines pro-inflammatoires par les macrophages ²³⁹. Le rôle nécessaire du couple HMGB1 / TLR4 dans l'activation d'une réponse immunitaire antitumorale suite à une chimiothérapie ou une radiothérapie a été mis en évidence par Apetoh et ses collaborateurs. Ils ont montré que l'inhibition de HMGB1 par un anticorps

bloquant empêche l'activation des lymphocytes T malgré un traitement par irradiation des souris ²⁴⁰.

En résumé, de nombreux traitements peuvent induire une mort cellulaire immunogène et donc induire l'expression membranaire ou la sécrétion des DAMP que nous avons détaillé ci-dessus, qui vont participer à la stimulation de réponse immunitaire anti-tumorale. Dans ce contexte, il paraît intéressant de combiner des chimiothérapies inductrices de mort cellulaire immunogène et les immunothérapies afin de potentialiser les effets pour inhiber la croissance tumorale.

II.6 - Nanomédecine et adénocarcinome pancréatique

Comme nous avons pu le voir, le PDAC présente de multiples aspects (retard de diagnostic, difficulté d'accès à la tumeur pour les molécules médicamenteuses, thérapies non ciblées, mise en place de résistances par les cellules cancéreuses, *etc.*) qui contribuent à un pronostic de survie des patients relativement sombre. De plus, les chimiothérapies utilisées dans le traitement du PDAC sont très agressives et présentent de nombreux effets indésirables. Elles sont donc difficiles à supporter par des patients qui sont souvent à des stades avancés dans la maladie (en raison du retard de diagnostic). Des études récentes se penchent donc sur l'utilisation de nanoparticules pour surmonter cela.

Suite à l'approbation du Doxil en 1995, d'autres médicaments à base de nanoparticules ont été approuvés pour le traitement du cancer et notamment le cancer du pancréas. C'est le cas de Abraxane® : nab-paclitaxel, complexant du paclitaxel à de l'albumine nanoparticulaire, approuvé par la FDA en 2005. Cette formulation permet un meilleur ciblage *via* la liaison de l'albumine sur le récepteur gp-60 des cellules endothéliales, activant ainsi une endocytose, cavéoline dépendante, permettant le transport d'une plus importante quantité de médicament vers la tumeur et donc l'administration de doses plus importantes par rapport à sa forme libre ²⁴¹.

Depuis, des études sont constamment en cours afin d'améliorer les traitements par nanothérapie et de trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques utilisant des nanoparticules.

Des nanoparticules hybrides de lipides et polymères ont été utilisées pour à la fois encapsuler la gemcitabine et un siRNA contre HIF1 α (facteur 1 α inductible par l'hypoxie) qui a été montré comme participant au phénomène de résistance à la chimiothérapie. Ces nanoparticules ont été utilisées par injection dans la veine caudale sur des souris porteuses de xénogreffe sous-cutanée ou orthotopique de cellules du cancer du pancréas Panc-1. Les nanoparticules s'accumulent *via* l'effet EPR dans la tumeur, permettant alors une régression tumorale et induisant une inhibition de la formation de métastases chez les souris porteuses d'une greffe orthotopique ²⁴².

La FDA a approuvé l'administration de plusieurs chimiothérapies chez un même patient pour le traitement du PDAC afin d'améliorer l'efficacité thérapeutique dont la combinaison d'oxaliplatine et de gemcitabine ²⁴³. Les nanoparticules peuvent alors être utilisées pour potentialiser ces combinaisons de molécules thérapeutiques et ainsi améliorer l'efficacité thérapeutique. Par exemple, un nanopolymère développé pour encapsuler l'oxaliplatine et la gemcitabine a montré des effets synergiques en combinant ces deux chimiothérapies pour l'éradication des cellules cancéreuses. En effet, des souris porteuses de xénogreffe sous-cutanée BxPc-3 ou AsPc-1 traitées par des nanoparticules doublement chargées (oxaliplatine et gemcitabine) présentent une régression tumorale plus importante que celles traitées avec des nanoparticules chargées avec une seule des deux chimiothérapies ou par rapport à la combinaison des deux chimiothérapies libres ²⁴⁴.

D'autre part, comme nous l'avons décrit précédemment, le PDAC présente un stroma très dense limitant l'accès des chimiothérapies au niveau des cellules cancéreuses. Des équipes développent donc des nanoparticules permettant le ciblage à la fois du stroma et des cellules cancéreuses ²⁴⁵. Liu et son équipe ont encapsulé, dans des nanoparticules, la molécule AG17724, inhibiteur de Pin-1 (inhibiteur sélectif des CAF). Ces nanoparticules sont vectorisées par un anticorps anti-FAP- α et un aptamère d'ADN permettant le ciblage spécifique des CAF des LT, respectivement. Ces nanoparticules injectées par voie intraveineuse, ont permis de ralentir la progression tumorale sur des souris avec greffe orthotopique de cellules Panc-02, tout en permettant une meilleure infiltration immunitaire ²⁴⁶.

En conclusion,

La nanomédecine, notamment en oncologie connaît un intérêt croissant ces dernières années. En effet, comme nous avons pu le voir, les nanoparticules présentent des caractéristiques physiques, chimiques et biologiques modulables qui en font un outil innovant et façonnable au besoin. D'ailleurs de nombreuses formulations de nanoparticules, notamment liposomales, ont d'ores et déjà une utilisation en clinique pour le traitement de cancers. La majorité des applications reposent, de nos jours, sur la délivrance de médicament médiée par les nanoparticules, permettant ainsi un meilleur adressage du médicament, une diminution des effets indésirables et donc une meilleure efficacité antitumorale.

Parmi les nanoparticules, les nanoparticules d'oxyde de fer, de par leur excellente biocompatibilité et leurs propriétés physico-chimiques, présentent de nombreux avantages. En tant que nanoparticules, elles s'accumulent dans la tumeur grâce à l'effet EPR et peuvent également être fonctionnalisées pour améliorer ce ciblage. De plus, leurs caractéristiques magnétiques leur permettent de répondre à l'application de différents types de champs magnétiques. Elles ont également déjà été utilisées en tant qu'agent de contraste pour le diagnostic par IRM. Aussi, après accumulation aux niveaux des tissus cancéreux, l'application de champ magnétique alternatif à haute fréquence (AMF) va générer de l'énergie qui va se dégager de la nanoparticule sous forme de chaleur et tuer les cellules par hyperthermie magnétique. D'un autre côté, l'application d'un champ magnétique rotatif à basse fréquence (RMF) va permettre le mouvement des nanoparticules, induisant la mort cellulaire en générant des forces mécaniques.

Le cancer du pancréas est un enjeu de santé publique. Malgré les importants progrès qui ont été fait ces dernières années, son incidence ne cesse d'augmenter et il est prédit pour devenir la deuxième cause de mort par cancer d'ici quelques années. Cela s'explique par des retards de diagnostic, par la mise en place de résistances aux traitements de la part des tumeurs ou encore par des traitements pas suffisamment efficaces et non ciblés ayant des effets indésirables entraînant des comorbidités importantes. De plus, comme nous l'avons décrit, le cancer du pancréas est caractérisé par un microenvironnement très dense limitant la pénétration des molécules thérapeutiques et des cellules immunitaires.

C'est dans ce contexte que la nanothérapie pour le traitement du cancer du pancréas se développe afin de permettre le ciblage spécifique et efficace des tissus tumoraux : cellules cancéreuses et cellules du microenvironnement tumoral, tout en limitant les effets indésirables sur les tissus sains adjacents.

Résultats

PARTIE I :

ORIGINE DES IONS FER IMPLIQUES DANS LA
PRODUCTION DE ROS RESPONSABLES DE LA MORT
DES CELLULES CANCEREUSES PAR HYPERTHERMIE
MAGNETIQUE INTRA-LYSOSOMALE

Introduction

La mort cellulaire par hyperthermie magnétique intra-lysosomale (MILH), également appelée hyperthermie magnétique intra-cellulaire dans la littérature, est dépendante de la production de ROS (espèces réactives de l'oxygène) ²⁴⁷⁻²⁴⁹. Cette production de ROS a lieu dans le lysosome par la réaction de Fenton. Les conditions optimales pour la réaction de Fenton sont : la présence de fer, un pH acide autour de 3, une température à 40°C ²⁵⁰. Or, il a été précédemment montré qu'il était possible de délivrer spécifiquement des nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer (IONP) dans les lysosomes des cellules cancéreuses grâce à la vectorisation des IONP par la gastrine, un ligand du récepteur CCK2 qui peut être surexprimé par les cellules cancéreuses et les CAF pancréatiques ^{251,252} et ayant la propriété de s'internaliser après liaison de son ligand agoniste, la gastrine ^{24,118}. Après internalisation des nanoparticules dans les cellules, notre équipe a démontré la possibilité d'éradiquer ces cellules par hyperthermie magnétique intra-lysosomale (MILH) ciblée *via* l'application d'un champ magnétique alternatif haute fréquence (AMF) (275 kHz, 40mT) sans élévation macroscopique de la température ^{24,118}. L'analyse du mécanisme impliqué dans la mort cellulaire par hyperthermie magnétique intra-lysosomale a montré qu'une élévation de température locale à la surface des IONP améliore la production de ROS par la réaction de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}\cdot$) ; puis les ROS peroxydent les protéines et les lipides de la membrane lysosomale, induisent la perméabilisation des lysosomes conduisant à la libération d'enzymes lysosomales et à la mort cellulaire cancéreuses ²⁴.

La première hypothèse est que les ROS, produits par la réaction de Fenton à l'origine de la mort par hyperthermie magnétique intra-lysosomale, proviennent de la libération d'ions fer issus de la dégradation des nanoparticules d'oxyde de fer exposées au champ magnétique AMF. Afin de vérifier cette hypothèse, des nanoparticules multicœurs d'oxyde de fer, appelées "NanoFlowers" ou NF, ont été développées et recouvertes (NF@SiO₂@PEG) ou non (NF@PEG) d'une coquille de silice SiO₂, empêchant la libération de fer du cœur d'oxyde de fer magnétique. Les deux types de nanoparticules, NF@SiO₂@PEG et NF@PEG, présentent des propriétés physico-chimiques et magnétiques très similaires (même puissance thermique, *etc.*). Cependant, les lysosomes sont connus pour contenir un taux élevé de fer, associé à des enzymes contenant de l'hème et/ou libéré par la dégradation d'enzymes lysosomales ²⁵³. Par conséquent, la génération de chaleur locale au voisinage des nanoparticules magnétiques lors de l'exposition à l'AMF pourrait induire la production de ROS en activant la réaction de Fenton en utilisant des ions

Fe²⁺ endogènes libres, présents dans les lysosomes. Ainsi, nous avons également utilisé la Ferristatine-II, un inhibiteur de l'absorption du fer par les cellules, pour diminuer la concentration de fer endogène dans les cellules, afin d'étudier si les ions Fe endogènes peuvent être impliqués dans la production de ROS lors de l'hyperthermie magnétique.

ORIGIN OF FE IONS IN ROS PRODUCTION INDUCED IN MAGNETIC HYPERTHERMIA ANTI-CANCER NANOTHERAPY: RELEASE FROM IRON OXIDE NANOPARTICLES OR NOT?

Justine Journaux-Duclos^{1#}, Megi Bejko^{2,3#}, Pascal Clerc¹, Yasmina Al Yaman³, Ahmed Abdelhamid^{1,4}, Géraldine Ballon⁴, Corinne Bousquet¹, Julian Carrey⁴, Stéphane Mornet^{2*#}, Olivier Sandre^{3*#}, Véronique Gigoux^{1*#}

1. Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, INSERM U1037, Toulouse
2. Institut de Chimie de la Matière Condensée de Bordeaux, CNRS, Univ. Bordeaux, Bordeaux INP, Pessac
3. Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques, CNRS, Univ. Bordeaux, Bordeaux INP, Pessac
4. Laboratoire de Physique et Chimie des Nano-Objets, CNRS-UPS-INSA UMR5215, Toulouse

* : Correspondance : Véronique Gigoux, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, INSERM U1037, Team MICROPANC, 2 Avenue Hubert Curien, 31037 Toulouse, France. Email: veronique.gigoux@inserm.fr – Olivier Sandre, Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques (LCPO) UMR5629 Université de Bordeaux/CNRS/Bordeaux-INP ENSMAC 16 avenue Pey Berland 33607 Pessac Cedex, France. Email: olivier.sandre@enscbp.fr – Stéphane Mornet, ICMCB UMR5026 CNRS-UB-IPB, 87 avenue du Dr. A. Schweitzer, 33608 Pessac Cedex. Email: stephane.mornet@icmcb.cnrs.fr

France

: equal participation

ABSTRACT

The first and critical reaction in magnetic hyperthermia to kill cancer cells is the catalysis of ROS (reactive oxygen species) production. We previously showed that it is possible to specifically deliver iron oxide magnetic nanoparticles (IONPs) in the lysosomes of cancer cells and eradicate them by targeted magnetic intra-lysosomal hyperthermia (MILH) *via* the application of a high frequency alternating magnetic field (AMF) without macroscopic temperature elevation. The mechanism involves a local temperature elevation at the IONPs surface which enhances the ROS production through the Fenton reaction; ROS then peroxide the proteins and lipids of the lysosomal membrane, inducing its permeabilization and leading to lysosomal enzymes release and cell death. Fe ions, critical to produce ROS in MILH, were assumed to be released from IONPs due to their degradation that can be enhanced by AMF. To verify this hypothesis, we developed PEGylated multi-cores IONPs called NanoFlowers (NF@PEG) presenting or not a SiO₂ shell (NF@SiO₂@PEG), the later preventing Fe release from IONPs. NF@PEG released Fe ions and produced ROS production *in vitro*, in acidic medium mimicking lysosome upon AMF exposure, whereas NF@SiO₂@PEG did not. Surprisingly, both nanoparticles increased the ROS production in cells, induced lysosome permeabilization and cell death, and slowed down the proliferation of cancer cells with the same efficacy upon AMF application, indicating that MILH is efficient in absence of Fe release from IONPs. In contrast, Ferristatin-II, an iron uptake inhibitor, prevented the ROS production and cell death in MILH induced by both nanoparticles, elucidating the endogenous Fe responsible for the catalysis of ROS in MILH to kill cancer cells.

Keywords: Cancer, magnetic nanoparticles, targeted nanotherapy, magnetic hyperthermia, ROS, cell death

INTRODUCTION

Iron oxide magnetic nanoparticles (IONPs), which display low toxicity and good biocompatibility in humans, are the subject of renewed interest in the perspective of cancer nanotherapy²⁵⁴. Exposed to a high frequency alternating magnetic field (AMF), IONPs release heat which can be used to develop biological approaches such as the eradication of cancer cells (magnetic hyperthermia), the on-demand drug release or the disruption of extracellular matrix of the tumor microenvironment²⁵⁵⁻²⁵⁸. Magnetic hyperthermia was authorized to treat high grade brain tumors, when combined with radiotherapy²⁵⁹. However, survival rate is still modest (average gain of 2 months lifetime) and neither radiotherapy nor magnetic hyperthermia therapy can discriminate between normal and cancerous tissues. Moreover, the lack of tissue discrimination as well as the large injected doses to increase magnetic hyperthermia therapy effectiveness, can lead to undesirable side effects²⁶⁰. Currently, magnetic hyperthermia in cancer treatment has obtained a renewed interest with the FDA approval of prostate cancer in combination with radiotherapy, in 2018. In order to overcome the limits imposed by macroscopic magnetic hyperthermia using large doses of magnetic nanoparticles mainly injected intratumorally and causing adverse effects on surrounding healthy tissues, alternative magnetic intra-lysosomal hyperthermia (MILH), also called intra-cellular magnetic hyperthermia, investigated the local release of thermal energy by targeted IONPs within the lysosome to induce lysosomal death pathways and kill the cancer cells without macroscopic temperature rise¹¹⁶⁻¹¹⁸. The mechanism involves a local temperature elevation at the IONPs surface which enhances the ROS (reactive oxygen species) production through the Fenton reaction ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^{\bullet}$); ROS then peroxide the proteins and lipids of the lysosomal membrane, inducing its permeabilization and leading to lysosomal enzymes release into the cytosol and cell death^{24,117,118,261}. Cell death induced by magnetic hyperthermia was also characterized to be related to ferroptosis, as it depends on Fe ions and ROS production by Fenton reaction²⁴.

Iron is an important redox-active transition metal involving production of highly reactive free radicals ($\bullet\text{OH}$ and $\text{O}_2^{\bullet-}$) via Fenton and Haber-Weiss reactions in living systems^{262,263}. The Fenton reaction is dependent on Fe concentration, acidic pH (optimal at pH 3) and temperature (optimal at 40-45°C)^{264,265}. The degradation of IONPs within medium mimicking lysosomal composition and pH as well as *in situ* has been described²⁶⁶⁻²⁶⁹. Conceivably, these newly formed Fe ions may affect the intracellular oxido-reduction reactions and homeostasis of ROS inside cells. Thus, the combination of the local temperature rise at the IONPs surface induced

by AMF with the acidic pH of the lysosomal compartment, may enhance the IONPs degradation and the release of Fe ions from IONPs, which may participate in the cytotoxic Fenton reaction leading to cell death upon AMF exposure. However, lysosome is a cellular compartment rich in iron, through the extracellular iron delivering to the lysosomes by endocytosis (*via* the transferrin/transferrin receptor system) and the degradation of intracellular materials (ferritin, old and damaged cellular macromolecules and organelles), making the lysosome a master regulator of cellular iron homeostasis and a crucial determinant of cell death by ferroptosis²⁷⁰. Indeed, the increase of intracellular Fe ions and follow-up Fenton reaction, which elevates ROS levels, lead to ferroptosis cell death. Currently, the origin of iron ions involved in the Fenton reaction (i.e. either exogenous iron ions issued from IONPs degradation or endogenous intracellular iron) during magnetic hyperthermia remains unknown. To test these hypotheses, we developed PEGylated IONPs constituted by an iron oxide multi-core called "NanoFlowers" (NF@PEG) presenting or not a SiO₂ shell (NF@SiO₂@PEG), the later preventing Fe release from IONPs. We analyzed the *in vitro* Fe release of both nanoparticles and their capacity to generate ROS. As expected, NF@PEG released Fe ions and produced ROS production *in vitro*, in acidic medium mimicking lysosome upon AMF exposure, whereas NF@SiO₂@PEG did not. Based on our previous reports^{24,118}, the NF@PEG and NF@SiO₂@PEG were decorated with gastrin (NF@PEG-Gastrin, NF@SiO₂@PEG-Gastrin) in order to enhance the nanoparticles accumulation in the lysosomes of pancreatic cancer cells MiaPaca2 expressing the cholecystokinin type 2 receptor (CCK2) by an active targeting. We then analyzed the efficacy of both nanoparticles to induce ROS production, lysosome permeabilization and affect cell viability. Surprisingly, the NF@SiO₂@PEG-Gastrin increased the ROS production, induced lysosome permeabilization and affected the viability of cancer cells with the same efficacy than NF@PEG-Gastrin upon AMF application, indicating that MILH is also efficient to induce ROS production and kill cells even in absence of Fe release from IONPs. Therefore, we conducted same experiments in the presence of Ferristatin-II, an iron uptake inhibitor that interferes with transferrin-mediated iron delivery by inducing the degradation of transferrin receptor 1 (TfR1)²⁷¹. We showed that Ferristatin-II blocked the ROS production and prevented cell death in MILH induced by NF@SiO₂@PEG-Gastrin and NF@PEG-Gastrin as well, demonstrating that endogenous Fe is necessary to produce ROS during magnetic hyperthermia with IONPs.

RESULTS AND DISCUSSION

Silica shell prevents Fe release from IONPs under AMF application

We developed and characterized iron oxide superparamagnetic multicore nanoparticles, termed nanoflowers, presenting or not a silica shell preventing Fe ions release from the nanoparticle core (Figure S1). The nanoflowers (NF) were synthesized using polyol route. The magnetic core size, measured by TEM, equaled 17.3 ± 2.6 nm (Figure 1A-B and Figures S1 and S2, Table 1). Half of the nanoflowers batch was coated with a silica under shell (NF@SiO₂) Stöber basic conditions; the thickness of the silica shell was determined by TEM at 3.1 ± 0.2 nm. Both nanoflowers types, NF and NF@SiO₂, were then functionalized with polyethylene glycol (PEG) assuring their colloidal stability as well as conferring shielding properties towards opsonization²⁷²: NF was modified by phosphonate pegylated ligands bearing amine functions as terminal group (PO-PEG-2.5k-NH₂) in one-step surface reaction; NF@SiO₂ was multi-step modified by amination surface, grafting of PEG-2k-OH through reductive amination and amination of OH end groups of grafted PEG, as illustrated in figure S1. The PEG corona of NF@PEG and NF@SiO₂@PEG were both situated in brush conformational regime, as determined from the RF/D ratio (2.4 and 2.7 respectively, Table 1). The hydrodynamic diameter of NF@PEG and NF@SiO₂@PEG were respectively equal to 50.3 ± 4.0 and 64.5 ± 6.9 nm in H₂O, and their polydispersity index PDI 0.25 ± 0.15 and 0.17 ± 0.02 , indicating low aggregation (Table 1). The positive zeta potential value of NF@PEG ($+14 \pm 2.0$ mV) and NF@SiO₂@PEG ($+22.6 \pm 5.7$ mV) at pH=7.4, was due to the presence of positively charged -NH₃⁺ end groups of the grafted PEG (Table 1). The NF@PEG and NF@SiO₂@PEG exhibited respectively a saturation magnetization (M_s) of 356 and 340 kA/m respectively, close to the M_s value of bulk maghemite γ -Fe₂O₃ (~400 kA/m) (Figure 1C-D, Table 1). The difference between the M_s of both types of nanoparticles was very low, indicating that the SiO₂ shell did not modify the saturation magnetization of NF@SiO₂@PEG comparatively to NF@PEG. Moreover, the absence of hysteresis in the M vs H curves when the field intensity decreases indicated that NF@PEG and NF@SiO₂@PEG exhibited a superparamagnetic behavior at 293K. The M vs H curves fitting with the Langevin function convolved with a log-normal distribution of nanoparticles core diameters and showed very similar mean number-averaged (d^n) and volumeaveraged (d^v) magnetic size (Figure 1C-D, Table 1). The heat efficiency of NF@PEG and NF@SiO₂@PEG, measured through the AC magnetometry, showed that NF @PEG and NF@SiO₂@PEG presented a similar specific absorption rate (SAR) determined from area of

the dynamic hysteresis loop (Figures 1E and S3). The SAR of NF@PEG and NF@SiO₂@PEG, determined at the conditions close to the ones used ex vivo (275 kHz, 20 kA/m = 25 mT), was respectively 186.0 ± 5.9 and 180.0 ± 4.9 W/g γ -Fe₂O₃ (Figure 1E). Calorimetric assay showed similar SAR for both types of nanoparticles, measured at 93 kHz as a function of the magnetic field amplitude (Figure 1F). All together, these results showed that the surface state, the magnetic properties and the heating efficiency under AMF of both NF@PEG and NF@SiO₂@PEG were very comparable.

The degradation and the temperature of NF@PEG and NF@SiO₂@PEG was then analyzed in a pH4.5 medium mimicking the lysosomal environment, named as Artificial Lysosomal Fluid (ALF) 24, upon AMF exposure or not (Figures 2A and S4). Different concentrations of NF@PEG and NF@SiO₂@PEG in ALF were thermalized at 37 °C, then exposed or not to AMF during 2h. Fe dissolution was analyzed in the supernatant by UV-VIS spectroscopy. The results showed that AMF exposure increased Fe release from NF@PEG but not from NF@SiO₂@PEG whatever the nanoparticles concentration, indicating that AMF enhances the degradation of NF@PEG and the release of Fe ions from NF@PEG and that the silica shell protected and prevented the Fe release from the γ -Fe₂O₃ core (Figures 2A and S4). Once the AMF was applied, the temperature of the NF@PEG and NF@SiO₂@PEG colloidal solutions rapidly increased from 37 °C to 45, 65 or 92 °C for NF@PEG and NF@SiO₂@PEG at 0.5, 3 and 7 g/L γ -Fe₂O₃ respectively, as a result of magnetic hyperthermia (Figure S4A). At 0.5 and 3 g/L γ -Fe₂O₃, the temperature of NF@PEG and NF@SiO₂@PEG solutions remained constant throughout all the duration of AMF exposure, 45 and 65°C respectively, and a progressive degradation of NF@PEG (10.7 ± 1.0 % and 26.6 ± 1.3 %, respectively) was observed whereas the degradation of NF@SiO₂@PEG is negligible (1.6 ± 0.9 % and 0.5 ± 0.1 %, respectively) (Figures 2A and S4B-C). Of note, water bath incubation (at the temperature corresponding to AMF application on the IONP solutions) for 2h induced similar Fe release from NF@PEG (11.2 ± 0.9 % vs 13.4 ± 0.8 % at 0.5 g/L Fe₂O₃; 26.6 ± 1.3 % vs 20.4 ± 0.6 at 3 g/L, Figures S4B-C) than AMF exposure, showing that the NF@PEG dissolution when the magnetic field was applied was a result of macroscopic temperature increase of the nanoparticles solution. At 7 g/L γ -Fe₂O₃, AMF exposure induced a high degradation of NF@PEG with 79.1 ± 0.4 % of Fe released in the supernatant (2.2 ± 0.1 % in absence of AMF), whereas NF@SiO₂@PEG remained intact (1.4 ± 0.2 % and 0.5 ± 0.1 % Fe release in presence or absence of AMF respectively, Figure 2A). Interestingly, the temperature of the NF@PEG and NF@SiO₂@PEG solutions at 7 g/L γ -Fe₂O₃ reached 92°C under AMF application. However, the temperature of the NF@SiO₂@PEG solution remained constant throughout all the duration of AMF exposure,

whereas the one of NF@PEG solution decreased after ~20 minutes of AMF application to a second temperature plateau at 60°C, suggesting that the decrease in the heating power of NF@PEG leading to the decrease of macroscopic temperature of the NF@PEG solution during AMF application could be attributed to their degradation (Figure S4A). The degradation of the NF@PEG induced by AMF exposure was also confirmed by TEM analysis (Figure S5). The diameter of the NF@PEG magnetic core decreased from 17.3 ± 2.6 nm to 12.4 ± 2.5 nm and 10.7 ± 2.4 nm after 1h and 2h under AMF. As expected, the diameter of the NF@SiO₂@PEG magnetic chore was not affected by AMF application. All together, these results indicated that NF@PEG degraded and released Fe ions in acidic medium upon AMF exposure, and that degradation rate of NF@PEG increased with the nanoparticles concentration. The kinetics of Fe release from NF@PEG induced by AMF also indicated that NF@PEG degradation was more rapid and important with highest NF@PEG concentration (Figures S4D-F). In contrast, the degradation of NF@SiO₂@PEG was negligible for the different tested concentrations, demonstrating that the SiO₂ layer was an efficient shield that protected the γ -Fe₂O₃ magnetic core and delayed its degradation in acidic medium under AMF.

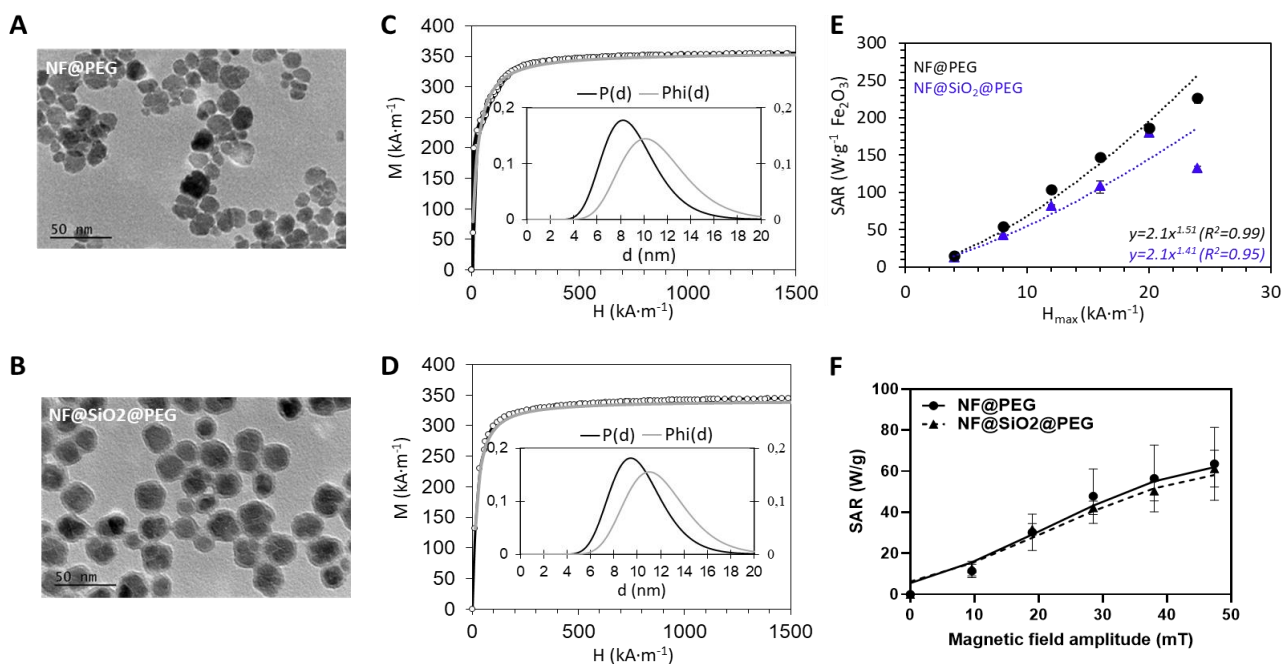


Figure 1: Physico-chemical properties of NF and NF@SiO₂ magnetic nanoparticles.

(A,B) TEM images of NF@PEG (A) and NF@SiO₂@PEG (B). (C,D) *M* vs *H* curves under DC field at 300 K of NF@PEG (C) and NF@SiO₂ (D) both fitted by Langevin's law of superparamagnetism, corresponding to the grey lines. The curves in inset correspond to the magnetic size distribution laws obtained from the Langevin fit of magnetization convolved with a distribution law $\Phi\check{h}(d)$ of the volume fraction of the nanoparticles associated to a log-normal law $P_{-}(d_0, \sigma)$ (*d*) for their number distribution. (E) Specific absorption rate (SAR) of a NF@PEG and NF@SiO₂@PEG solution (6 mg γ -Fe₂O₃/ml) measured at a frequency of 280 kHz as a function of the magnetic field amplitude, through AC magnetometry. Error bars correspond to three separate experiments. (F) Specific absorption rate of a NF@PEG and NF@SiO₂@PEG solution (6 mg γ -Fe₂O₃/ml) measured at a frequency 93 kHz as a function of the magnetic field amplitude, through calorimetric assay. Error bars correspond to three separate experiments.

Silica shell prevents *in vitro* catalysis of ROS by magnetic hyperthermia

Iron and Iron oxide nanoparticles were shown to present peroxidase-like activity, which catalyzes the hydrogen peroxide (H₂O₂) to generate highly cytotoxic hydroxyl radicals (\cdot OH)^{273,274}. In order to evaluate the catalytic performance of NF@PEG and NF@SiO₂@PEG in producing hydroxyl radicals, we employed the colorimetric method based on the oxidation of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) in the presence of H₂O₂ under acidic conditions mimicking lysosome environment. In the presence of H₂O₂ and AMF application, NF@PEG catalyzed the oxidation of TMB to form the oxidized and therefore blue-colored TMB, measured at the characteristic absorbance 652 nm^{273,274}, comparatively to NF@PEG in absence of AMF application, indicating that NF@PEG catalyzed the conversion of H₂O₂ to \cdot OH during magnetic hyperthermia (Figure 2B). In contrast, negligible absorbance was observed in the

presence of NF@SiO₂@PEG, suggesting that NF@SiO₂@PEG did not promote the oxidation of TMB, in response or not to AMF application (Figure 2b). This result demonstrated that the SiO₂ layer was an efficient shield that protected efficiently the γ -Fe₂O₃ magnetic core preventing Fe release from it and the production of hydroxyl radicals from H₂O₂. Moreover, these results indicated that NF@PEG peroxidase-like activity may involve the Fe ions released from the degradation of the γ -Fe₂O₃ magnetic core or be catalyzed at the surface of the magnetic core of NF@PEG. Thus, hydrophilic PEG layer does not raise a sufficient barrier preventing the Fe release from the γ -Fe₂O₃ magnetic core and/or the catalysis of peroxidase-like activity at the γ -Fe₂O₃ magnetic core surface of NF@PEG.

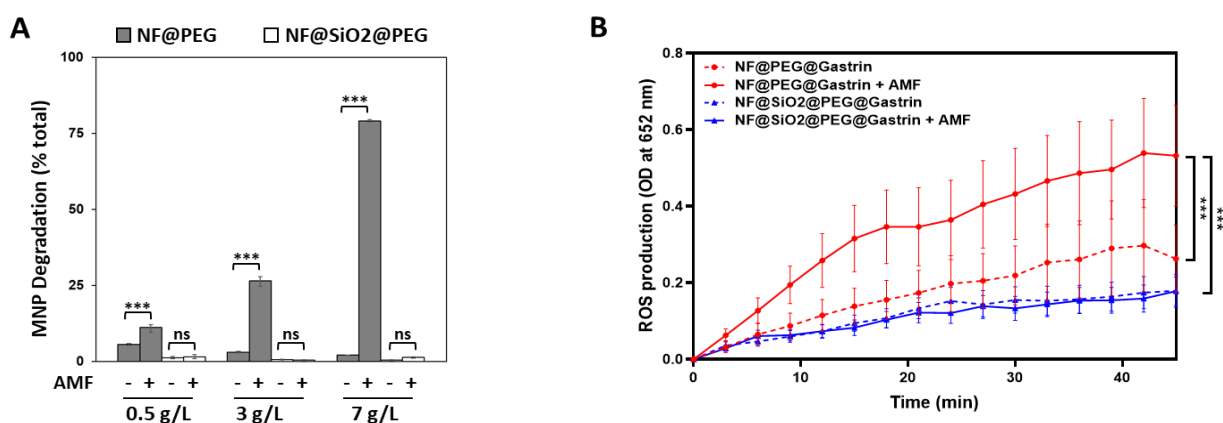


Figure 2: (A) *In vitro* Fe dissolution from IONPs. NF@PEG and NF@SiO₂@PEG solutions in Artificial Lysosomal Fluid (ALF) were exposed or not to AMF during 2h, then centrifuged (60,000g, 25 min). Fe dissolution was analyzed in the supernatant by UV-VIS spectroscopy. (B) *In vitro* ROS production by IONPs exposed or not AMF. 10 μ g γ -Fe₂O₃ of NF@PEG and NF@SiO₂@PEG were incubated 72h in pH 4,4 solution, then exposed or not to AMF for 2h with the temperature maintained at 37°C. H₂O₂ and TMB were then added, and optical absorbance was analyzed by spectrometry at

IONPs uptake and subcellular localization

To investigate the capacity of NF@PEG and NF@SiO₂@PEG to generate intracellular •OH and induce cell mortality under magnetic hyperthermia experiments, we first decorated both NF@PEG and NF@SiO₂@PEG nanoparticles with a synthetic peptide analog of gastrin, to increase their uptake by pancreatic cancer cells expressing the type 2 cholecystokinin receptor (CCK2 receptor), chosen as a model, and their accumulation in the lysosomes. NF@PEG and NF@SiO₂@PEG were also decorated with a fluorophore (DY647), allowing their fluorescence

detection. The hydrodynamic diameter and surface charge of NF@PEG@Gastrin and NF@SiO₂@PEG@Gastrin were respectively of 75.8 ± 5.1 and 79.3 ± 7.3 nm, -21.6 ± 1.1 and 1.0 ± 0.5 mV (Table 1), measured in PBS pH7.4. We then analyzed the cytotoxicity, the uptake and subcellular localization of these nanoparticles in pancreatic MiaPaca2 cells expressing or not the CCK2 receptor. NF@PEG@Gastrin and NF@SiO₂@PEG@Gastrin did not present cytotoxic activity on MiaPaca2 and MiaPaca2-CCK2 cells up to 128 μ g γ -Fe₂O₃/ml (Figure S6). The hemocompatibility was also investigated, and the hemolysis ratios of the red blood cells for NF@PEG and NF@SiO₂@PEG were negligible at concentrations up to 345 μ g γ -Fe₂O₃, indicating that these magnetic nanoparticles are biocompatible for intravenous administration (Figure S7). We then characterized the binding properties and the uptake of NF@PEG@Gastrin and NF@SiO₂@PEG@Gastrin (Figures 3 A-B). The kinetics of NF@PEG@Gastrin and NF@SiO₂@PEG@Gastrin binding and internalization determined by flow cytometry indicated that the amount of both nanoparticles taken up by MiaPaca2-CCK2 increased with the time of incubation. Furthermore, both NF@PEG@Gastrin and NF@SiO₂@PEG@Gastrin bound and internalized much higher and faster in MiaPaca2-CCK2 than in MiaPaca2 cells, indicating that gastrin improved the uptake kinetics of both nanoparticles' types in MiaPaca2-CCK2 cells thanks to the specific and high affinity binding of gastrin to the CCK2 receptor. Indeed, the uptake of NF@PEG@Gastrin and NF@SiO₂@PEG@Gastrin was respectively 3.7 ± 1.0 and 2.0 ± 0.2 -fold more important in MiaPaca2-CCK2 cells compared to MiaPaca2 cells, after 72 hours of incubation. The targeting efficiency was also determined by flow cytometry after 72h of incubation and confirmed that NF@PEG@Gastrin and NF@SiO₂@PEG@Gastrin uptake was more important in cells expressing the CCK2 receptor than control cells, at any nanoparticle's concentrations, confirming that the use of gastrin is efficient to target pancreatic cancer cells expressing the CCK2 receptor (Figure S8). The absolute amount NF@PEG@Gastrin and NF@SiO₂@PEG@Gastrin internalized by MiaPaca2-CCK2 cells was determined by NMR relaxometry, being in the same order for both nanoparticles: 2.8 ± 0.7 (T1) / 2.9 ± 0.7 (T2) pg Fe γ -Fe₂O₃ / cell and 3.0 ± 1.6 (T1) / 3.1 ± 2.0 (T2) pg Fe γ -Fe₂O₃/ cell and 3.0 ± 1.6 (T1) / 3.1 ± 2.0 (T2) pg Fe γ -Fe₂O₃/ cell incubated for 72h with NF@PEG@Gastrin or NF@SiO₂@PEG@Gastrin, respectively (Figure 3 C).

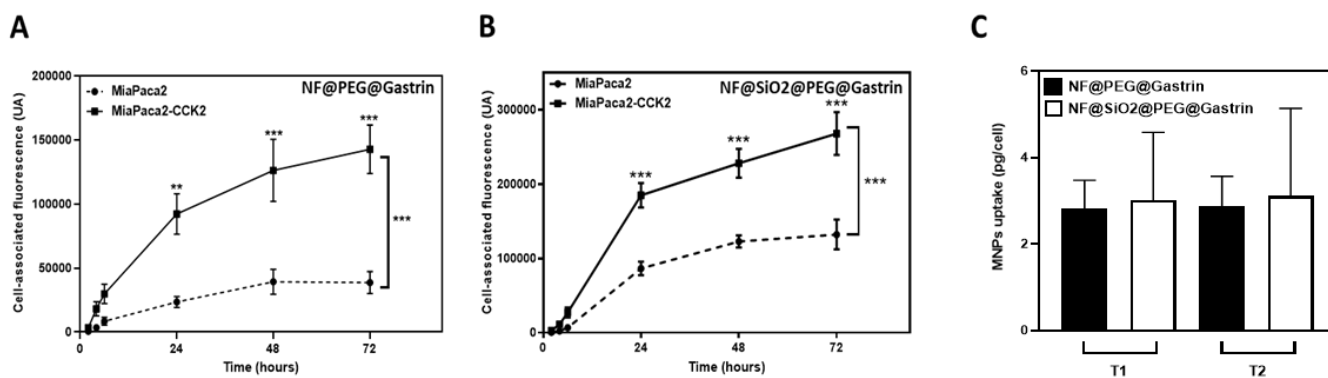


Figure 3: Analysis of NF@PEG@Gastrin and NF@SiO₂@PEG@Gastrin uptake.

Kinetics of NF@PEG@Gastrin (A) and NF@SiO₂@PEG@Gastrin (B) uptake. MiaPaca2 and MiaPaca2-CCK2 cells were incubated with 16 μg $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{ml}$ of fluorescent NF@PEG@Gastrin or NF@SiO₂@PEG@Gastrin for 2, 4, 6, 24, 48 or 72h at 37°C. Fluorescence was measured by flow cytometry, and results are expressed as fluorescence associated with the cells and are the mean \pm SEM of at least four separate experiments. (C) Analysis of NF@PEG@Gastrin and NF@SiO₂@PEG@Gastrin uptake by relaxometry. MiaPaca2-CCK2 cells were incubated with 16 μg $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{ml}$ of NF@PEG@Gastrin or NF@SiO₂@PEG@Gastrin for 72h at 37°C, centrifuged. results are expressed as the mean \pm SEM of at least four separate experiments.

Then, we characterized the cellular fate of NF@PEG@Gastrin or NF@SiO₂@PEG@Gastrin in MiaPaca2-CCK2 (Figure 4). The transmission electron microscopy (TEM) images of MiaPaca2-CCK2 cells incubated with NF@PEG@Gastrin or NF@SiO₂@PEG@Gastrin were mainly localized in the lysosomes of MiaPaca2-CCK2, after 72h of incubation (Figures 4 A-B). Confocal microscopy study confirmed that NF@PEG@Gastrin or NF@SiO₂@PEG@Gastrin accumulated in the lysosomal vesicles (Figure 4 C-D). Analysis of NF@PEG@Gastrin or NF@SiO₂@PEG@Gastrin colocalization with LysoTracker demonstrated that 78.4 ± 1.2 and 78.4 ± 1.0 % of internalized NF@PEG@Gastrin or NF@SiO₂@PEG@Gastrin were localized inside the lysosomes of MiaPaca2-CCK2 cells, respectively (Figures 4 E). Taken together, these results indicated that both nanoparticles had similar *ex vivo* behavior since NF@PEG@Gastrin and NF@SiO₂@PEG@Gastrin presented both a preferential accumulation in MiaPaca2-CCK2 cells and trafficking in their lysosomes. Moreover, both nanoparticles accumulated in the MiaPaca2-CCK2 cells with similar minute amounts, allowing their comparison of their performance during magnetic hyperthermia experiments.

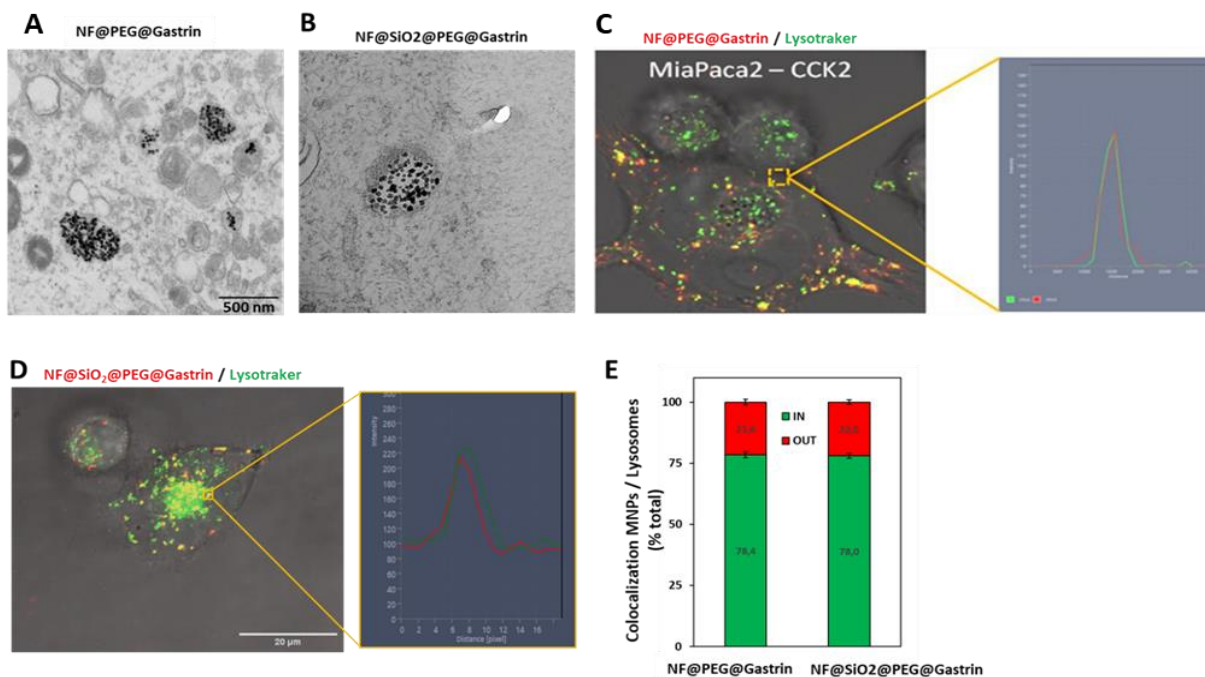


Figure 4: Subcellular localization of NF@PEG@Gastrin and NF@SiO₂@PEG@Gastrin nanoparticles. Electron microscopy analysis of NF@PEG@Gastrin (A) and NF@SiO₂@PEG@Gastrin (B) accumulation in MiaPaca2-CCK2 cells. Image representative of NF@PEG@Gastrin (A) and NF@SiO₂@PEG@Gastrin (B) accumulated in lysosomes. Analysis of NF@PEG@Gastrin (C) and NF@SiO₂@PEG@Gastrin (D) localization by confocal microscopy. MiaPaca2-CCK2 cells were incubated with 16 $\mu\text{g } \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{ml}$ of NF@PEG@Gastrin or NF@SiO₂@PEG@Gastrin for 72 h, then incubated with 10 nM Green Lysotraker and observed by confocal microscopy. (E) Quantification of nanoparticles accumulation in lysosomes by analysis of confocal microscopy images: green = inside lysosomes, red = outside lysosomes. MiaPaca2-CCK2 cells were incubated with 16 $\mu\text{g } \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{ml}$ of NF@PEG@Gastrin or NF@SiO₂@PEG@Gastrin for 72 h.

Analysis of NF@PEG@Gastrin and NF@SiO₂@PEG@Gastrin efficacy as anticancer agent by magnetic hyperthermia

Although we previously showed that cell death depended on ROS production by Fenton reaction, the origin of Fe ions, critical to produce ROS in magnetic intra-lysosomal hyperthermia (MILH), is still elusive²⁴. In the literature, Fe ions were assumed to be released by IONPs surface resulting in a greater extent of ROS catalysis in acidic medium such as lysosome compartment. To gain insight into the cell death mechanism, we investigated the efficacy of NF@PEG@Gastrin and NF@SiO₂@PEG@Gastrin as anticancer agent by MILH. The effect of AMF application to induce the death of MiaPaca2-CCK2 cells having internalized NF@PEG@Gastrin or NF@SiO₂@PEG@Gastrin was first evaluated. For this purpose, MiaPaca2-CCK2 cells were incubated with increasing concentrations of NF@PEG@Gastrin or NF@SiO₂@PEG@Gastrin for 72h, washed to eliminate unbound and non-internalized

nanoparticles and exposed to AMF (25 mT, 250 kHz) for 2h. Surprisingly, both NF@PEG@Gastrin and NF@SiO₂@PEG@Gastrin induce cell mortality with the same efficacy, by MILH so without perceptible temperature rise (Figure 5A). The effect of MILH on cell viability was also studied by exposing cells for 2h three times (days 5, 7 and 9) and showed that both NF@PEG@Gastrin and NF@SiO₂@PEG@Gastrin inhibited the cell proliferation with the same efficacy (Figure 5B). The cell mortality induced by NF@SiO₂@PEG@Gastrin may at first suggest that SiO₂ coating did not ensure the complete protection of its γ -Fe₂O₃ core in cells, and that it may be degraded in the endo-lysosomal compartment releasing Fe³⁺ ions similarly as for NF@PEG@Gastrin. However, we previously demonstrated that SiO₂ shell protected the γ -Fe₂O₃ core and prevented the release of Fe ions even under highly dissociating conditions such as AMF application or water bath increasing the temperature up to 92°C, in ALF acidic medium (Figures 2 and S4). Moreover, the kinetics of IONPs degradation was shown to be slowed down in the endo-lysosomal compartment of cultured cancer cells or murine liver and spleen, comparatively to *in vitro* lysosome-like medium, due to IONPs aggregation that may protect them to the degradation²⁶⁸. The alternative explanation was that protected NF@SiO₂@PEG@Gastrin induced cell mortality and inhibited cell viability by the release of thermal energy under AMF without involving Fe³⁺ liberation from IONPs degradation. We thus investigated whether NF@SiO₂@PEG@Gastrin enhanced the production of ROS upon AMF application. As shown in Figure 5C, the protected NF@SiO₂@PEG@Gastrin increased the production of ROS with the same efficacy than NF@PEG@Gastrin under MILH (increased ROS levels by 4.4 ± 0.5 and 3.4 ± 0.5-fold compared to control cells, respectively). Moreover, this effect was associated with an increased permeabilization of lysosomes (Figure 5D). All together, these results demonstrated that both unprotected NF@PEG@Gastrin and protected NF@SiO₂@PEG@Gastrin IONPs induced similarly the production of ROS leading to lysosome membrane permeabilization and cell death. It should be highlighted that lysosomes contain iron, mainly in the form of Fe²⁺, as a result of degradation of iron-containing proteins^{275,276}. Thus, in the absence of Fe liberation from protected NF@SiO₂@PEG@Gastrin IONPs, local heat release by NF@SiO₂@PEG@Gastrin IONPs during MILH may induce the catalysis of ROS production through Fenton reaction using endogenous Fe²⁺. Concerning the NF@PEG@Gastrin, we cannot exclude that these unprotected IONPs catalyzes ROS production upon MILH through two parallel routes: the local heat release from IONPs that induced ROS production through Fenton reaction using endogenous Fe²⁺ as well as from dissolution of Fe³⁺ ions from its γ -Fe₂O₃ core degradation.

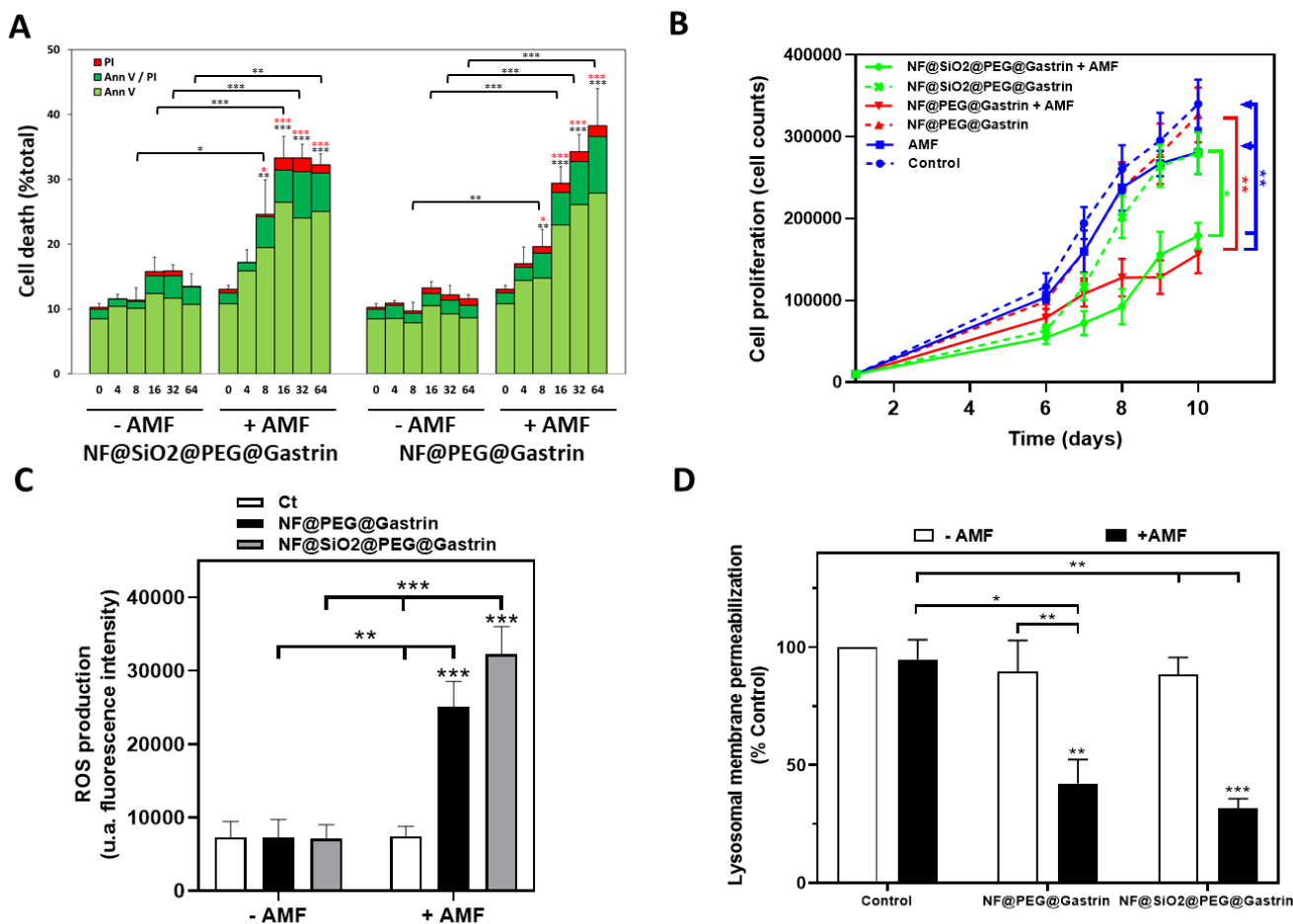


Figure 5: Analysis of NF@PEG@Gastrin or NF@SiO₂@PEG@Gastrin efficacy in magnetic intra-lysosomal hyperthermia (MILH).

MiaPaca2-CKK2 cells were incubated or not with 16 μg $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{ml}$ of NF@PEG@Gastrin or NF@SiO₂@PEG@Gastrin for 72h, then exposed or not to AMF for 2h. (A) Dead cells were labeled with AnnV/PI and counted 4 h after AMF exposure by confocal microscopy. Results are the mean \pm SEM of 4 separate experiments. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA test: significant difference compared to the control condition (cells devoid of nanoparticles in absence of AMF exposure) or AMF condition (without nanoparticles) indicated respectively in black or red above histogram bar, statistical significances between other conditions indicated by lines/brackets. (B) Cells incubated or not with nanoparticles were exposed to AMF three times (days 5, 7 and 9) for 2 h. Cell proliferation was evaluated by counting cells each day. Results are expressed as mean \pm SEM of at least four separate experiments. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA test. (C) ROS production was analyzed using CellROX Green, immediately after AMF exposure, by analyzing the fluorescence intensity from confocal microscopy images and expressed as fold change of fluorescence intensity overcontrol cells (in absence of nanoparticles and AMF). 2000–3000 cells/experiments were analyzed, and results are the mean \pm SEM of 4 separate experiments. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA test: significant difference compared to the control condition (cells devoid of nanoparticles in absence of AMF exposure) indicated above histogram bar, statistical significances between other conditions indicated by lines/brackets. (D) After AMF application, cells were incubated with 10 nM Green Lysotraker and observed by confocal microscopy. Lysosomal membrane permeabilization was analyzed by measuring the Lysotraker fluorescence intensity from confocal microscopy images and expressed as a % of fluorescence intensity overcontrol cells (in absence of nanoparticles and AMF). 2000–3000 cells/experiments were analyzed, and results are the mean \pm SEM of 4 separate experiments. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA test: significant difference compared to the control condition (cells devoid of nanoparticles in absence of AMF exposure) indicated above histogram bar, statistical significances between other conditions indicated by lines/brackets.

Impact of endogenous Fe depletion on ROS production and cell death induced by magnetic intra-lysosomal hyperthermia

To elucidate the role of endogenous Fe^{2+} in the cell death mechanism, MILH experiments were conducted in the presence of Ferristatin-II, which inhibit iron uptake by the cell by promoting the degradation of transferrin receptor 1 (TfR1) ^{271,277}. Fe transportation in cells involves transferrin (Tf) and TfR1. Iron bound to Tf/TfR1 is transported to cells and internalizes through receptor-mediated endocytosis. The iron is then released from Tf in the acidic endo-lysosomal compartment. Following the aforementioned studies, MiaPaca2-CCK2 cells were treated with 50 μM Ferristatin-II for 24h in SVF-free medium. Fe depletion in the cells was evidenced by confocal microscopy using FerroOrange, a dye that detects and shows strong fluorescence signal upon reaction with free Fe^{2+} ²⁷⁸. As expected, the quantity of Fe^{2+} was significantly and strongly reduced in the cells treated with 50 μm Ferristatin-II for 24h, compared to control cells in absence of Ferristatin-II, indicating that Ferristatin-II depleted the Fe^{2+} content in the MiaPaca2-CCK2 cells (Figure 6A). MILH experiments were then conducted on NF@PEG@Gastrin or NF@SiO₂@PEG@Gastrin-loaded cells in the presence or not of Ferristatin-II. For this, MiaPaca2-CCK2 cells were incubated with NF@PEG@Gastrin or NF@SiO₂@PEG@Gastrin for 72h allowing their accumulation in the lysosomes, washed and incubated with 50 μM Ferristatin-II in SVF-free medium for 24h. After AMF application, ROS production was then analyzed. We showed that Ferristatin-II prevented MILH-increased ROS production which returned to the basal value in NF@SiO₂@PEG@Gastrin-loaded cells, indicating that Fenton reaction producing ROS can be carried out using endogenous Fe^{2+} and catalyzed by local heat release from IONPs upon AMF application (Figure 6B). Surprisingly, ROS production was also prevented by Ferristatin-II in NF@PEG@Gastrin-loaded cells during MILH, although these unprotected IONP are prone to degradation, strongly suggesting that Fe ions provided from NF@PEG@Gastrin degradation induced by AMF did not constitute the main source of Fe ion to generate ROS during MILH (Figure 6C). Moreover, these results highlighted that the endogenous Fe^{2+} was crucial to catalyze the production of ROS during MILH. Although the unprotected NF@PEG@Gastrin surely released Fe^{3+} ions during their trafficking in the endo-lysosomal compartment and MILH, the local heat generated by MILH was sufficient to generate ROS by upregulating the Fenton reaction involving the intracellular Fe^{2+} ions. These results elucidated thus the origin of iron ions involved in ROS production during MILH as we demonstrated here that MILH engendered ROS production through Fenton reaction using endogenous Fe^{2+} rather than the Fe^{3+} released from IONPs degradation,

indicating that local heat at the IONPs surface was capable to catalyze and upregulated the Fenton reaction using endogenous Fe^{2+} .

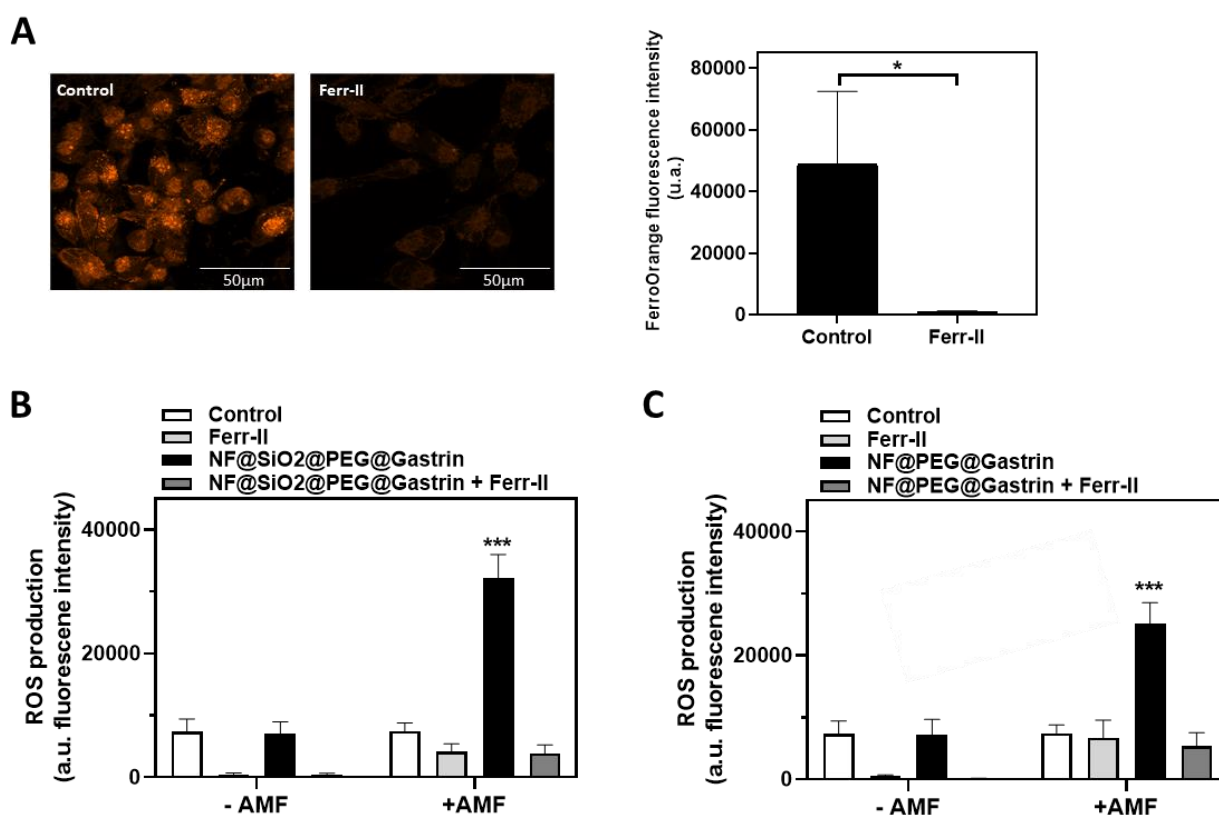


Figure 6: Impact of endogenous Fe depletion on ROS production induced by magnetic intra-lysosomal hyperthermia.

(A) Endogenous Fe depletion by Ferristatin-II treatment. MiaPaca2-CCK2 cells were incubated with $50 \mu\text{M}$ Ferristatin-II (Ferr-II) in SVF-free DMEM medium for 24h, then stained with FerroOrange. FerroOrange fluorescence intensity was analyzed from confocal microscopy images (2000–3000 cells/experiments). Results are the mean \pm SEM of 4 separate experiments. Statistical analysis was performed using *t*-test. (B, C) MiaPaca2-CCK2 cells were incubated or not with $16 \mu\text{g}$ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{ml}$ NF@PEG@Gastrin or NF@SiO₂@PEG@Gastrin for 72h, then incubated or not with Ferr-II in SVF-free DMEM medium for 24h and exposed or not to AMF for 2h. ROS production was analyzed using CellROX Green, immediately after AMF exposure, by analyzing the fluorescence intensity from confocal microscopy images. 2000–3000 cells/experiments were analyzed, and results are the mean \pm SEM of 4 separate experiments. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA test: significant difference compared to all other conditions indicated above histogram bar.

We further analyzed the impact of Ferristatin-II treatment on MILH efficacy to induce cell death in NF@PEG@Gastrin or NF@SiO₂@PEG@Gastrin-loaded cells (Figure 7). We found that the addition of Ferristatin-II, which depleted cells in iron and prevented ROS production during MILH, inhibited cell death induced by MILH in both NF@PEG@Gastrin and NF@SiO₂@PEG@Gastrin-loaded cells. Of note, Ferristatin-II did not inhibit the gemcitabine-

induced cell death (Figure S9). All together, these results demonstrated that ROS production was enhanced by MILH through Fenton reaction using endogenous Fe²⁺ leading to cancer cell death.

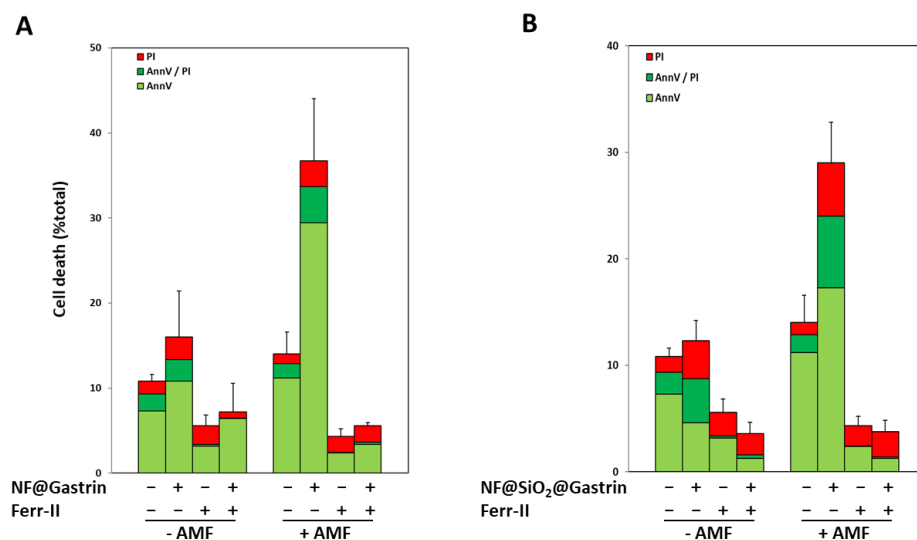


Figure 7: Impact of endogenous Fe depletion on the death of NF@PEG@Gastrin and NF@SiO₂@PEG@Gastrin-loaded cells induced by magnetic intra-lysosomal hyperthermia.

CONCLUSION

In conclusion, unprotected NF@PEG rapidly degraded, released Fe ions and engendered ROS upon AMF exposure *in vitro* in an acidic lysosome-like medium, whereas the protected NF@SiO₂@PEG did not. Both IONPs were efficient for MILH, as they both induced similarly cell mortality (35-40%) with minute amounts of nanoparticles (3 pg γ -Fe₂O₃ per cell) and without a perceptible temperature rise during AMF application. Moreover, this study elucidated the origin of Fe ions involved in ROS production during MILH by demonstrating that MILH engendered ROS production through Fenton reaction using endogenous Fe²⁺ rather than the Fe³⁺ released from IONPs degradation thanks to local heat at the IONPs surface that was capable to catalyze and upregulated the Fenton reaction using endogenous Fe²⁺.

MATERIALS AND METHODS

Chemical materials

Iron (II) chloride tetrahydrate ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 98%), iron (III) chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, >97%), iron (III) nitrate nonahydrate ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, >98%), diethylene glycol (DEG, 99%), N-methyldiethanolamine (NMDEA, 99%), sodium hydroxide micropellets (NaOH, 98%), nitric acid fuming (HNO_3 , 69%), hydrochloric acid (HCl, 37%), ethanol (EtOH, anhydrous, $\geq 99.5\%$), acetone, ethyl acetate, tetraethyl orthosilicate (TEOS, 99.999%), N-[3-(trimethoxysilyl)propyl]ethylenediamine (EDPS, 97%), ammonium hydroxide solution (30%, ACS reagent), glycerol (BioXtra, $\geq 99\%$), dichloromethane (DCM, anhydrous, $\geq 99.8\%$), trifluoroacetic acid (TFA, 99% reagent grade), pyridine (anhydrous, 99.8%), N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC, $\geq 99\%$), petroleum ether (puriss., high boiling, bp 50-70 °C), poly(ethylene glycol) (Mn=2 kDa), sodium borohydride (NaBH_4 , 99.99%), methanol (MeOH, anhydrous, 99.8%), triethylamine (Et_3N , $\geq 99.5\%$), thionyl chloride (SOCl_2 , $\geq 99\%$), ethylenediamine (puriss. $\geq 99.5\%$ (GC)), citric acid ($\geq 99.5\%$, ACS reagent), sodium chloride ($\geq 99.0\%$, ACS reagent), calcium chloride dehydrate ($\geq 99.0\%$, ACS reagent), sodium tartrate dehydrate (BioXtra, $\geq 99\%$), sodium pyruvate ($\geq 99.0\%$, ReagentPlus®), sodium lactate ($\geq 99.0\%$, ReagentPlus®), sodium citrate ($\geq 99.0\%$), sodium hydrogen phosphate dibasic (99.99%), glycine ($\geq 99.0\%$, ReagentPlus®), magnesium chloride (anhydrous, $\geq 98\%$), sodium sulfate (anhydrous, $\geq 99.0\%$) were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France) and used without further purification. Poly(ethylene glycol) α -ammonium chloride, ω -phosphonic acid (M \approx 2-3 kDa) was purchased from Specific Polymers, France (<https://specificpolymers.com/>) and was used without further purification.

Nanoparticle Synthesis and Functionalization

Magnetic iron oxide nanoparticles, called nanoflowers, were synthesized by the polyol route, as previously described²⁷². The NF batch was separated into two parts to perform two distinct surface modifications.

The first part was modified through direct anchoring of PEG2k-NH₂. NF dispersed in water at 16 g/L γ -Fe₂O₃ with 23.3 PEG2k-NH₂ macromolecules.nm-2 and with the pH set to 2 with HNO₃ 10 mM, were placed in the ultrasonic bath under agitation overnight. The NF were washed through tangential ultrafiltration (Merck Millipore, Mw cutoff = 300 kDa) with mQH₂O.

The second part of NF was dispersed in a citric acid solution (14 g/L) under agitation for 5 minutes, then magnetically decanted, washed twice with mQH₂O, and coated with a silica (NF@SiO₂) shell Stöber conditions, in an ultrasonic bath for 10 min to help break the remaining aggregates. NF@SiO₂ was then modified with EDPS-amination step, before the covalent grafting of PEG2k-NH₂ on the silica shell to obtain NF@SiO₂@PEG-NH₂.

The NF@PEG and NF@SiO₂@PEG nanoparticles were then decorated with ~100 molecules of a synthetic replicate of gastrin (Cys-Lys-Ser-Ser-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH₂, Covalab) and ~20 molecules of the fluorescent label NHS-DY647-PEG1 (Dyomics GmbH, Jena, Germany), and termed respectively as NF@PEG@gastrin and NF@SiO₂@PEG@Gastrin. An aliquot of nanoparticles was sonicated for 5 min on melting ice (Bioblock Scientific 88154). Firstly, the linkage of the fluorophore NHS-DY647-PEG1 (20 molecules per IONP) was performed in phosphate buffer pH 8.3, at room temperature for 1 h. Then, 3-Maleimidopropionic acid N-hydroxysuccinimide ester (BMPS, 1n NH₂) in solution in DMF was added and incubated at room temperature for 1h. After 5 washes with 10 volumes of H₂O, gastrin (~100 peptides per nanoparticles) in solution in 30% DMF, 70% H₂O was added in phosphate buffer pH 7.2 and let to react for 2h. Finally, free maleimide functions were saturated by addition of an excess of cysteine (10n NH₂) in phosphate buffer pH7.2. After 8 washes with 10 volumes of H₂O, NF@PEG@gastrin and NF@SiO₂@PEG@Gastrin were stored at 4°C.

Physico-chemical characterization of nanoparticles

Transmission Electron Microscopy (TEM) samples were prepared by depositing a drop of nanoparticles suspension on carbon coated copper grids placed on a filter paper. TEM images were obtained. The median diameter was deduced from TEM data measurements, simulating the diameter distribution with a lognormal function.

Suspension of NF@PEG@gastrin and NF@SiO₂@PEG@Gastrin at 0.1 mg/ml was prepared in phosphate buffer pH7.4. The suspension was sonicated for 10 min on ice. After temperature equilibrium to 20°C, particle size was measured by dynamic light scattering using Nanotracc 250 (Microtrac, York, PA).

The magnetization curve of NF@PEG and NF@SiO₂@PEG was measured on a VSM magnetometer (PPMS, Quantum Design, USA) at room temperature. VSM measured magnetization cycles by applying a field from -3000 to 3000 mT with a sampling rate of approximately 10 mT/s.

A 300 μ L solution of NF@PEG and NF@SiO₂@PEG at 7 mg Fe₂O₃/mL was used for specific absorption rate measurements. The temperature increases of the sample placed in a 93 kHz alternating magnetic field delivered by a magnetic inductor (Fives Celes, Lautenback, France) during 100 s was measured. A blank sample containing water was used in parallel in order to remove the contribution of eddy current to the temperature increase. Temperature measurements were performed using a thermal probe (Reflex, Neoptix, Canada). The specific absorption rate was calculated using standard formula and taking into account the specific heat of water.

Analysis of *in vitro* NF degradation

MNP solution in Artificial Lysosomal Fluid (ALF) were incubated exposed to AMF or incubated in water bath (37, 45 or 65°C) during 2h, then centrifuged (60,000g, 25 min). Fe dissolution was analyzed in the supernatant by measuring absorbance at 350 nm by UV-VIS spectroscopy.

In vitro ROS production

For *in vitro* ROS production analysis after NF dissolution, 16 μ g of NF@PEG@Gastrin or NF@SiO₂@PEG@Gastrin was incubated into 84 μ L of 0.2 M acetate buffer pH 4.5 and exposed or not to AMF (25 mT, 250 kHz) for 2 h. Then 1 μ L of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) (20 mg/mL in DMSO) and 5 μ L of H₂O₂ (10 mM) were added. The UV–VIS absorbance spectra of oxidized TMB were recorded *via* a microplate reader (SpectroStar BMG) for 45 minutes.

Cell Culture

Pancreatic cancer cells MiaPaca2 were permanently transfected with the human CCK2 receptor (CCK2R) using the cDNA encoding CCK2R subcloned in pcDNA3 vector (BD Biosciences Clontech) and Lipofectamine 2000 (Invitrogen), and selected with 600 μ g/ml geneticin (Sigma-Aldrich) and termed MiaPaca2-CCK2. MiaPaca2 and MiaPaca2-CCK2 were cultured in complete DMEM medium (DMEM GlutaMAX™, Thermofisher Scientific) containing 10% FBS (fetal bovine serum), 100 IU/ml penicillin/streptomycin (Penicillin-Streptomycin P4333, Sigma-Aldrich) in a humidified atmosphere at 95% air and 5% CO₂ at 37°C. MiaPaca2-CCK2 cells were grown with 600 μ g/ml geneticin (Sigma-Aldrich).

Analysis of MNP cytotoxicity

10^4 cells/well of MiaPaca2-CCK2 were seeded in a 96-well plate, grown overnight and incubated with increased concentrations of NF@PEG@Gastrin or NF@SiO₂@PEG@Gastrin in complete DMEM medium for 24, 48 or 72h. The cells maintained in the incubation medium without IONPs served as negative controls. 10 μ L of MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) at 5 mg/mL were added and incubated for 2 h at 37 °C. After cell culture medium removal, 100 μ L of dimethylsulfoxide were added and incubated for 1h at 37 °C, and the absorbance values were measured at 570 nm.

Hemolysis Assay

Heparinized blood was obtained from male CD-1 mice and male Sprague-Dawley rats by cardiac puncture under anesthesia, and from male human healthy volunteers (with no major medical history and absence of medications). Red blood cells were incubated with increasing concentrations of NF@PEG@Gastrin or NF@SiO₂@PEG@Gastrin, 1 mg/ml Triton X- 100 (positive control) or PBS (negative control) for 4h at 37C. The samples were centrifuged at 1,000 g for 10 min. Optical density of the supernatant was measured at 540 nm with a Tecan Safire 2 plate reader. All measurements were performed in triplicates. The % is calculated relative to the positive control (Triton X-100) inducing 100% hemolysis. Results are expressed as mean \pm sem.

Analysis of MNP uptake by Flow Cytometry

10^5 MiaPaca2 or MiaPaca2-CCK2 cells were seeded onto 24-well plates and grown overnight. For the uptake kinetics, the cells were incubated with NF@PEG@Gastrin or NF@SiO₂@PAG@Gastrin ($[\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3] = 16 \mu\text{g/mL}$) for 2 to 72h at 37°C in DMEM medium. For the uptake specificity, the cells were incubated with increased concentrations of NF@PEG@Gastrin or NF@SiO₂@PEG@Gastrin ($[\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3] = 2$ to 64 $\mu\text{g/mL}$) for 72h. Then, the cells were washed 3 times with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.5% BSA (Bovine serum albumin), collected with 300 μ L of trypsin and centrifuged 10 min at 1500 rpm. The cells were resuspended in 300 μ L of PBS, 2 mM EDTA. The cell-associated fluorescence was determined using a BD FACSCalibur™ flow cytometer.

Quantification of IONPs uptake by relaxometry

~10⁶ MiaPaca2-CCK2 cells were seeded onto 35 mm dishes in complete DMEM medium. Cells were incubated with NF@PEG@Gastrin or NF@SiO₂@PEG@Gastrin ([Fe₂O₃] = 16 µg/mL) in complete DMEM medium for 72 h, at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere, washed twice with ice-cold PBS, and centrifuge 10 min at 1500 rpm. The iron content was determined through relaxometric method, inspired by a previously published report ²⁷⁹. Cell pellets were mineralized in 350 µL of freshly prepared aqua regia (mix of HNO₃ (69%) and HCl (37%) with a volume ratio of 1:4 (v/v)) in a 1.5 mL Eppendorf® Tube. The cell suspension was then sonicated for 20 min, by carefully degassing the tube every few minutes. Then, a volume of 350 µL of H₂O was added and the tubes are placed at 42°C in a thermomixer for 48 h. Then, the cell suspensions were transferred into NMR tubes (7.5 mm diameter) and incubated in a Julabo™ f25 ED circulation bath with a temperature set at 37°C. After 10 minutes, the tube was inserted in a Bruker™ mq60 relaxometer equipped with a 60 MHz/1.41 Tesla Magnet. Longitudinal T₁ relaxation times were measured using an inversion recovery sequence with a first duration of ≈0.1×T₁, a final duration of ≈10×T₁, with a recycling delay RD of ≈5×T₁ in between each of 25 experimental points, 4 scans, and an automatic receiver gain, as recommended for T₁ measurement in proton relaxometry ²⁸⁰. Transverse T₂ relaxation times were measured using Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) pulse sequence, with a delay τ of 4-10 ms, a duration time of ≈4×T₂, a RD of ≈5×T₁, 4 scans, and automatic receiver gain as recommended for T₂ measurements ²⁸⁰. The iron content was quantified through previously established calibration curves by recording the T₁ and T₂ relaxation of Fe³⁺ standards in HCl 5M.

IONPs localization by transmission electron microscopy

10⁵ MiaPaca2-CCK2 cells were grown in 6-dishes plates (Thermo Scientific™) and incubated with NF@PEG@Gastrin or NF@SiO₂@PEG@Gastrin ([γ-Fe₂O₃] = 16 µg/mL) for 72 h. After removing medium, cells were fixed with 4% glutaraldehyde in Sorensen buffer for 4 h at 4°C. Fixed cells were washed with cold Sorensen buffer for 12 h and post-fixed in 1% osmium tetroxide (osmium 2%, saccharose 0.25 M, Sorensen 0.05 M) for 1 h at 20°C, followed by washings with distilled water and uranyl acetate 2% for 12 h at 4°C. The cells were dehydrated by sequential washings of 10 min in 30, 50, 70 and 95% ethanol followed by 3 washes of 15 min in absolute ethanol. Cells were then embedded in EMBed 812 resin for 12 h. Resin

polymerization was obtained at 60°C for 48 h. Ultrathin sections of 70 nm were prepared, stained with uranyl acetate and lead citrate and examined with a transmission electron microscope (Hitachi HU12A, Japan) operating at 75 kV.

IONPs localization by confocal microscopy

50 x 10³ MiaPaca2-CCK2 cells/compartments were plated onto 4-compartments Cellview culture dishes (Greiner Bio-One). After overnight growth, the cells were incubated with NF@PEG@Gastrin or NF@SiO₂@PEG@Gastrin ([γ -Fe₂O₃] = 16 μ g/mL) in complete DMEM medium for 72 h. The cells were then incubated for 15 min with 10 nM LysoTracker Green DND-26 (excitation: 488 nm, Life technologies). IONPs (excitation: 633 nm) and LysoTracker co-localization was analyzed using a LSM780 confocal microscope (Zeiss) and quantified using ImageJ software.

Cell exposure to AMF

The cells were seeded 24 h before the experiments onto four-compartments Cellview dishes (Greiner Bio-One), grown overnight and incubated with NF@PEG@Gastrin or NF@SiO₂@PEG@Gastrin for 72h at 37 °C in complete DMEM medium to allow IONPs internalization and accumulation in lysosomes. The cells were rinsed with complete medium and exposed or not to AMF (275 kHz, 25 mT) for 2h. The temperature of the incubation medium was strictly maintained at 37 °C and controlled using a thermal probe (Reflex, Neoptix, Quebec City, QC, Canada) placed in the incubation medium, during AMF exposure. At the end of the experiments, the cells were placed in a humidified atmosphere at 5% CO₂ at 37 °C for further analyses.

Analysis of cell Death

25 x 10³ cells/compartments of MiaPaca2-CCK2 cells were seeded onto four-compartments Cellview dishes, incubated with NF@PEG@Gastrin or NF@SiO₂@PEG@Gastrin in complete DMEM medium for 72h, washed and exposed to AMF as previously described. 4h after AMF exposure, the dead cells were labeled with FITC-annexin V (AnnV) and/or propidium iodide (PI) (Cell Meter Annexin V apoptosis assay kit, AAT Bioquest, Sunnyvale, CA, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. The counting of labeled cells was carried out

through the analysis of confocal microscopy images (LSM510, Zeiss) representing populations of 2000–3000 cells/experiment using ImageJ software.

For cell mortality analysis in presence of Ferristatin-II, the cells were seeded, NF@PEG@Gastrin or NF@SiO₂@PEG@Gastrin ([γ -Fe₂O₃] = 16 μ g/mL) or 10 μ M gemcitabine, washed, incubated with 50 μ M Ferristatin-II in FBS-free DMEM medium for 24h, and exposed to AMF as previously described. The dead cells were labeled and counted as previously described.

Analysis of cell viability

10⁴ cells/compartment of MiaPaca2-CCK2 cells were seeded onto 4-compartments Cellview dishes (Greiner Bio-One), grown overnight and incubated with NF@PEG@Gastrin or NF@SiO₂@PEG@Gastrin ([γ -Fe₂O₃] = 16 μ g/mL) for 72h. Then, the cells were washed, incubated in complete DMEM medium and exposed to AMF for 2h, 3 times every 48 h. The cell viability was evaluated by counting the cell number using a cell counter (Beckman cell counter z2) once per day for 6 days.

Analysis of ROS production

25 x 10³ cells/compartment of MiaPaca2-CCK2 cells were seeded onto 4-compartments Cellview dishes (Greiner Bio-One), grown overnight, incubated with NF@PEG@Gastrin or NF@SiO₂@PEG@Gastrin ([γ -Fe₂O₃] = 16 μ g/mL) for 72h in complete DMEM medium, washed, incubated in complete DMEM medium and exposed to AMF for 2h. The cells were then incubated with CellROX Green reagent (Molecular probes, Excitation wavelegnth: 488nm) immediately after AMF exposure, in incubation medium according to manufacturer's instructions. The quantification of ROS production was performed by analyzing the intensity of CellROX Green reagent labeling of confocal microscopy images (LSM780 confocal microscope, Zeiss) using ImageJ software. 2,000-3,000 cells/experiments were analyzed in at least 4 independent experiments.

For experiment with Ferrisatin-II, the cells were incubated NF@PEG@Gastrin or NF@SiO₂@PEG@Gastrin ([γ -Fe₂O₃] = 16 μ g/mL) for 72h in complete DMEM medium, washed, then incubated in FBS-free DMEM medium in the presence or absence of 50 μ M Ferristatin-II (Sigma-Aldrich).

Analysis of lysosomal membrane permeabilization

25 x 10³ cells/compartment of MiaPaca2-CCK2 cells were seeded onto 4-compartment Cellview dishes (Greiner Bio-One), grown overnight, incubated with NF@PEG@Gastrin or NF@SiO₂@PEG@Gastrin ([γ -Fe₂O₃] = 16 μ g/mL) for 72h in complete DMEM medium, washed, then incubated in complete DMEM medium, and exposed to AMF for 2h. The cells were then incubated with 10 nM LysoTracker Green DND-26 (Invitrogen, excitation wavelength: 488 nm) in DMEM complete medium for 15 min, and washed with DMEM complete medium. The lysosome integrity was determined by analyzing LysoTracker fluorescence intensity by confocal microscopy images (LSM780 confocal microscope, Zeiss) using ImageJ software.

Fe(II) detection

To detect intracellular Fe(II), FerroOrange (Dojindo, Japan) was used based on the manufacturer's protocol. Briefly, the MiaPaca2-CCK2 cells were incubated or not with 50 μ M Ferristatin-II in FBS-free DMEM medium for 24h, washed with FBS-free DMEM medium, and incubated with 1 μ M FerroOrange working solution at 37°C for 30 min. Fluorescence images were captured by a LSM780 confocal microscope (Zeiss, excitation: 543 nm). Analysis of Fe(II) was performed by measuring the intensity of fluorescence per cell, using ImageJ software.

Statistical Analysis

Results are expressed as the mean \pm SEM of at least three independent experiments. The statistical analysis was performed using ANOVA tests, as mentioned in each figure legend. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

SUPPLEMENTARY FIGURES

	NF@PEG	NF@PEG @GASTRIN	NF@SiO ₂ @PEG	NF@SiO ₂ @PEG @GASTRIN
DTEM (NM)	17.3 ± 2.6		23.4 ± 3.7 (SiO ₂ SHELL 3.1 ± 0.2)	
DH (NM)	50.3 ± 4.0	75.8 ± 5.1	64.5 ± 6.9	79,3 ± 7.3
PDI	0.24 ± 0.15	0.15 ± 0.01	0.17 ± 0.02	0.15 ± 0.08
Z (MV)	+14.0 ± 2.5	-21,6 ± 1.1	+22.6 ± 5.7	-1.0 ± 0.5
RF/D (PEG REGIMEN)	2.4 (BRUSH)		2.7 (BRUSH)	
MS (KA.M⁻¹)	356		340	
DN (NM)	9.1		10.2	
DW (NM)	11.2		11.9	

Table 1: Physicochemical properties of MNPs.

NF@PEG@Gastrin and NF@SiO₂@PEG@Gastrin correspond to NF@PEG and NF@SiO₂@PEG MNPs functionalized with Dy-647 fluorophore and Gastrin peptide to detect and target the IONPs respectively. D_{TEM} value corresponds to the outer diameter of bare NF or NF@SiO₂, determined through ImageJ analysis of $N=300$ IONPs on TEM micrographs. Hydrodynamic diameter D_H and polydispersity index PDI of IONPs dispersion (0.1 mg γ -Fe₂O₃/mL) are measured through DLS in H₂O and calculated through Cumulant method. ζ -potential of IONPs dispersion (0.1 mg γ -Fe₂O₃/mL) was measured in 1 mM HEPES with pH set at 7.4. The conformational regime of PEG is given from the ratio between Flory radius RF ($RF = \alpha(DP)^{3/5}$, where α is the effective monomer PEG length = 0.358 nm, DP the degree of polymerization) and average distance D ($D=2(\pi\sigma)-1/2$) between adjacent PEG chains.

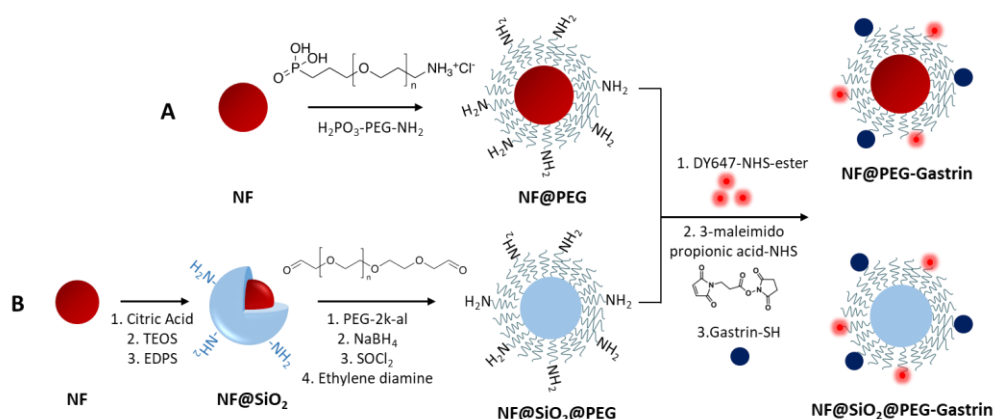


Figure S1: Simplified illustration of two distinct surface modification techniques to generate unprotected or protected surfaces on $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoflowers (NF).

(A) Unprotected coating was done through direct PEG anchoring on bare NFs generating NF@PEG bearing free surface NH_2 groups. The latter were used for further coupling with DY647 and Gastrin, necessary to detect and target the IONPs respectively. (B) Protective coating was done by firstly growing a silica shell on bare NFs under Stöber conditions. Then, EDPS was added to generate NF@SiO_2 IONPs with free -NH_2 surface groups, used for covalent PEG-2k-al attachment through reductive amination. The terminal -OH groups of attached PEG were transformed firstly into -Cl groups through SOCl_2 . Ethylenediamine was then used to generate terminal -NH_2 bonds by nucleophile substitution of -Cl groups. The generated NH_2 groups on PEG corona were then used to attach DY647 and Gastrin. Each step of surface modification is detailed in Materials and Methods section.

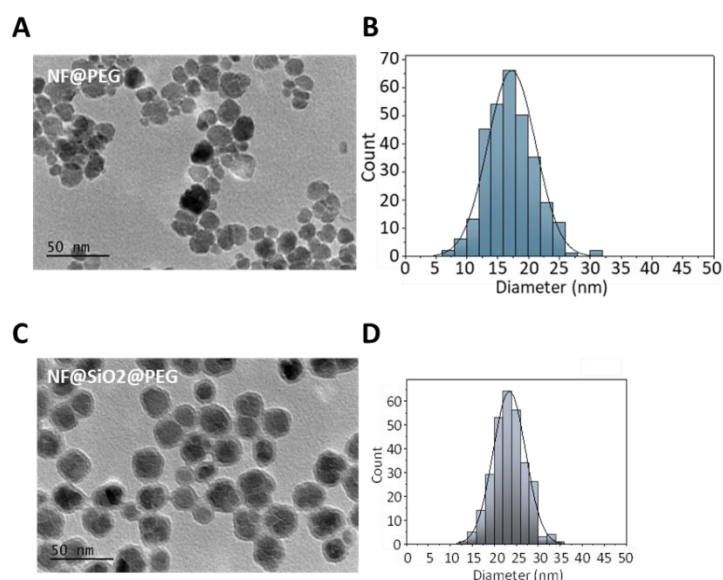


Figure S2: (A) TEM image representative of $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ NF@PEG after their synthesis through polyol route and (B) its corresponding histogram plotted after manual size determination of $N=300$ NF@PEG using ImageJ software and fitted with a normal distribution. (C) TEM image representing the core-shell structure of $\text{NF@SiO}_2\text{@PEG}$ with and (D) its corresponding histogram plotted after manual size determination of $N=300$ $\text{NF@SiO}_2\text{@PEG}$ using ImageJ software and fitted with a normal distribution.

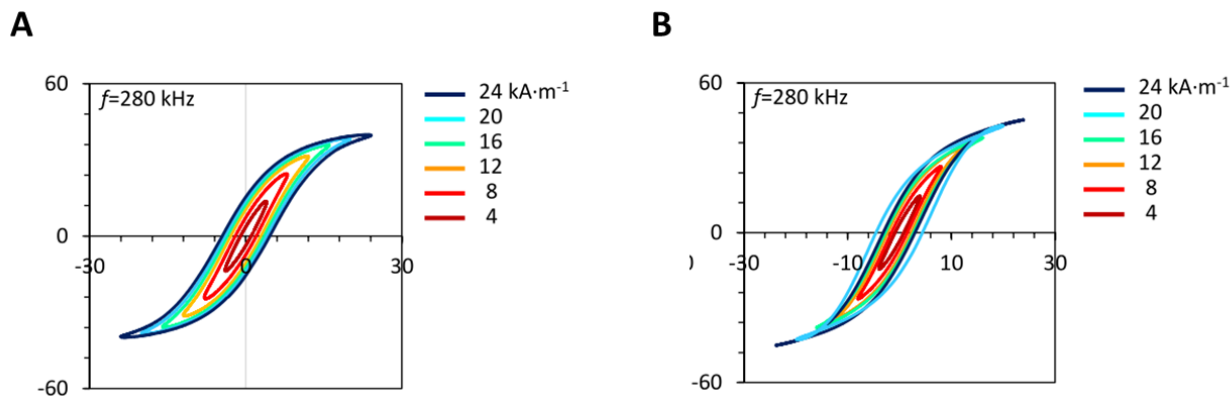


Figure S3: AC magnetometry of NF@PEG (A) and NF@SiO₂@PEG (B). Hysteresis loop (Mass magnetization vs field intensity H) measured at 280 kHz and indicated magnetic field amplitudes.

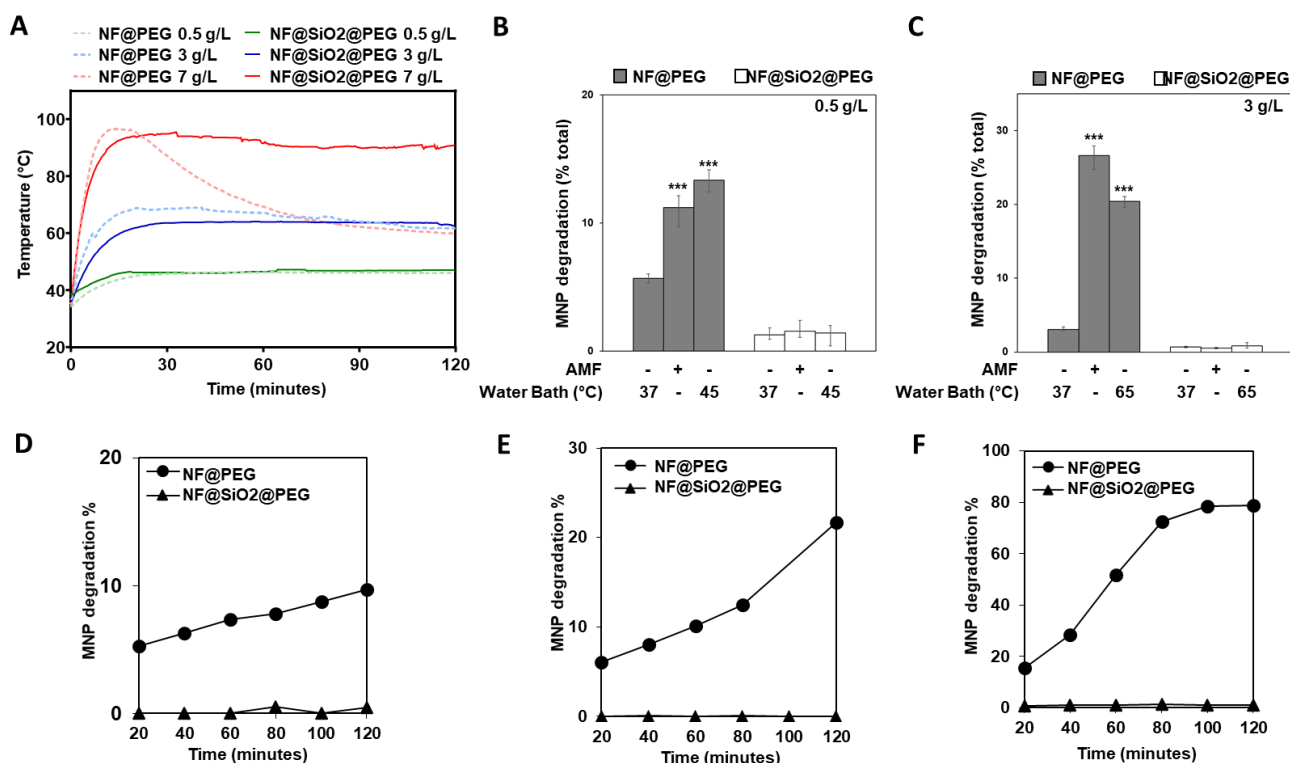


Figure S4: (A) Temperature monitoring of IONPs solutions during AMF exposure. (B, C) In vitro Fe dissolution from IONPs. NF@PEG and NF@SiO₂@PEG solution at 0.5 g/L (B) or 3 g/L (C) in Artificial Lysosomal Fluid (ALF) were incubated in water bath at 37°C or 45°C (corresponding to IONPs solution temperature during AMF exposure) or exposed to AMF during 2h. (D, E, F) In vitro Fe dissolution from IONPs. NF@PEG and NF@SiO₂@PEG solution at 0.5 g/L (D), 3 g/L (E) or 7 g/L (F) in Artificial Lysosomal Fluid (ALF) were exposed to AMF for 2h. Fe dissolution was analyzed in the supernatant by UV-VIS spectroscopy

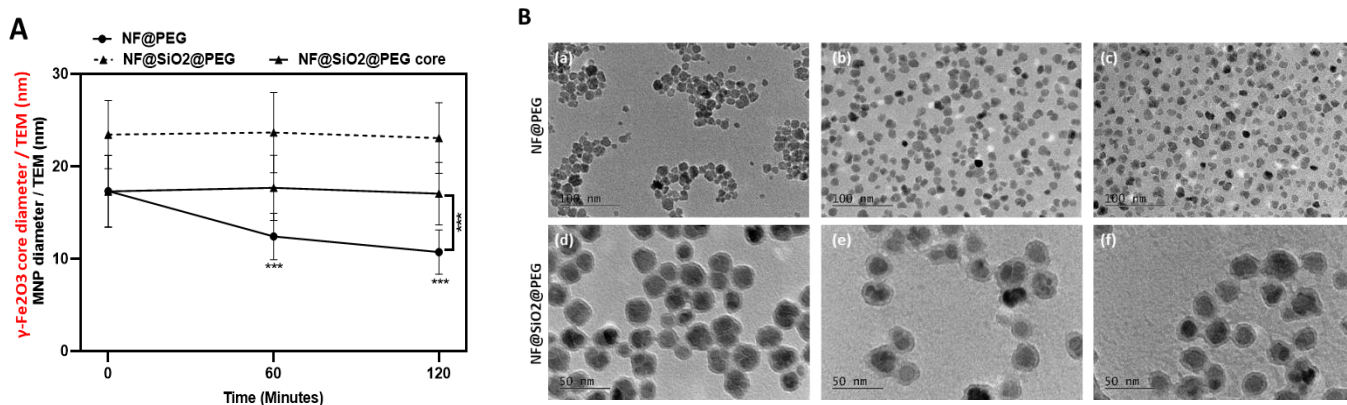


Figure S5: (A) *In vitro* Fe dissolution from IONPs. NF@PEG and NF@SiO₂@PEG solution at 7 g/L $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (B) in Artificial Lysosomal Fluid (ALF) were exposed to AMF during 1 or 2h. $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ core diameter were then analyzed by TEM (~300 nanoparticles per condition). (B) TEM images of NF@PEG and NF@SiO₂@PEG at 7 g/L $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$: (a) and (d) prior to AMF treatment; (b) and (e) after 1h AMF exposure; (c) and (f) after 2h AMF exposure.

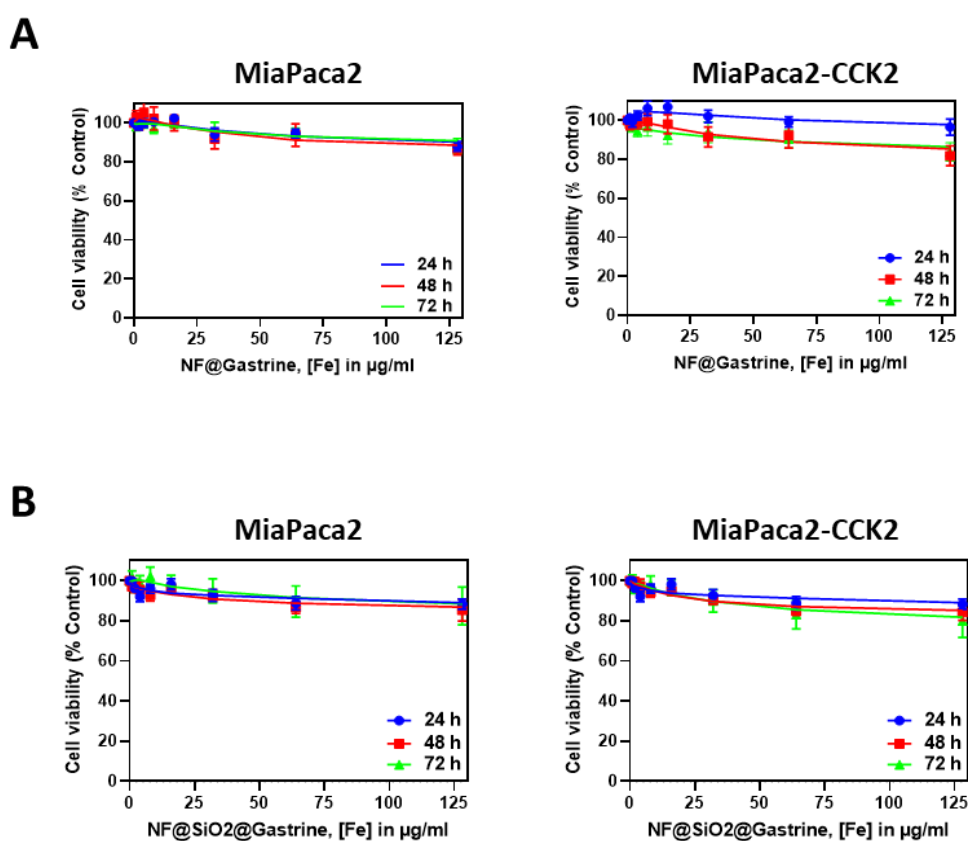


Figure S6: Analysis of the cytotoxicity of NF@PEG@Gastrin and NF@SiO₂@PEG@Gastrin. MiaPaca2 and MiaPaca2-CCK2 were incubated with increased concentrations of NF@PEG@Gastrin or NF@SiO₂@PEG@Gastrin during 24, 48 or 72h. Cell viability was determined by MTT assay.

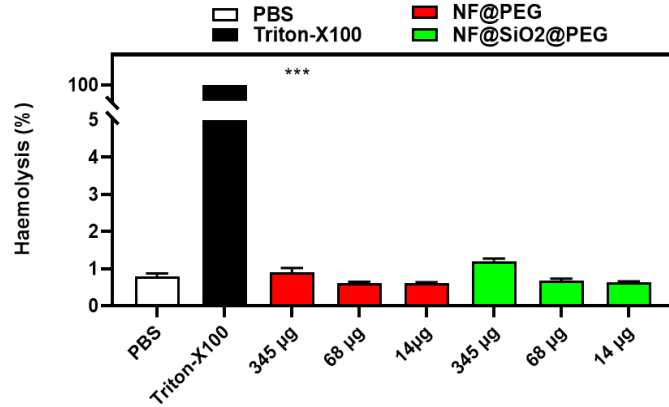


Figure S7: Analysis of hemocompatibility of NF@PEG and NF@SiO₂@PEG.

Murine, rat or human red blood cells from were incubated with increasing concentrations of NF@PEG and NF@SiO₂@PEG, 1 mg/ml Triton X- 100 (positive control) or PBS (negative control) for 4h at 37C. Optical density of the supernatant was then measured at 540 nm and the % of hemolysis was calculated relative to the positive control (Triton X-100) inducing 100% hemolysis. Results are expressed as mean ± sem.

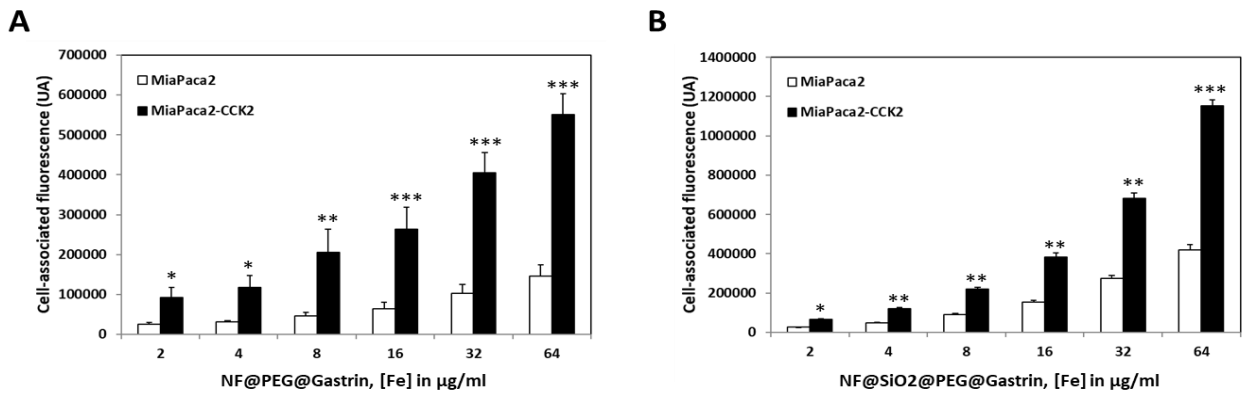


Figure S8: Targeting efficacy of NF@PEG@Gastrin (A) and NF@SiO₂@PEG@Gastrin (B).

MiaPaca2 and MiaPaca2-CCK2 were incubated with increased concentrations of MNPs during 72h. Cell-associated fluorescence was measured by flow cytometry, and results are expressed as fluorescence associated with the cells and are the mean ± SEM of at least four separate experiments.

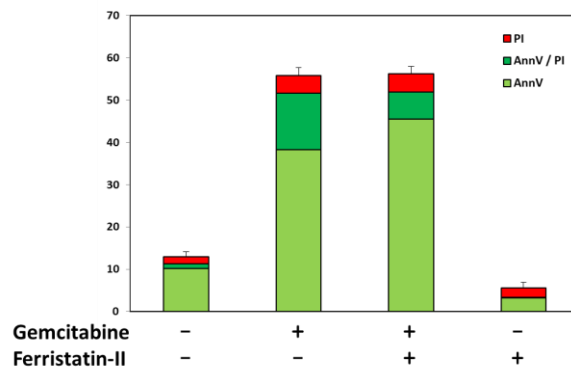


Figure S9: Analysis of cell death induced by gemcitabine in presence or not of Ferr-II.

Discussion

La mort cellulaire par hyperthermie magnétique intra-lysosomale (MILH) implique la réaction de Fenton pour induire la mort cellulaire^{24,117}. La réaction de Fenton $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}\cdot$ produit des ROS qui peroxydent les lipides et les protéines de la membrane lysosomale, induisent la perméabilisation de la membrane lysosomale (LMP), conduisant à la mort cellulaire. Mais jusqu'à maintenant, le mécanisme par lequel ce traitement augmente la réaction de Fenton n'est pas clair. En raison de l'utilisation de nanoparticules d'oxyde de fer, la première hypothèse est que la libération de fer par les nanoparticules d'oxyde de fer associée au chauffage des nanoparticules sous exposition au champ magnétique AMF et à l'environnement acide lysosomal catalyse la production de ROS par la réaction de Fenton^{24,281}. Pour valider cette hypothèse, nous avons développé des nanoparticules recouvertes (NF@SiO₂@PEG) ou non (NF@PEG) d'une coque de silice pour empêcher la libération de fer par les nanoparticules d'oxyde de fer. Tout d'abord, nous avons validé la capacité de la coque de silice à empêcher la libération de fer du noyau d'oxyde de fer et la production de ROS dans un milieu acide imitant l'environnement lysosomal, sous champ magnétique. Ensuite, nous avons comparé l'induction de la production de ROS, la perméabilisation de la membrane lysosomale et la mort cellulaire par MILH en utilisant les deux types de nanoparticules : NF@SiO₂@PEG ou NF@PEG vectorisées pour optimiser leur accumulation dans les lysosomes des cellules cancéreuses. Étonnamment, nous avons montré que les nanoparticules NF@SiO₂@PEG@Gastrin augmentaient la production de ROS, induisaient la LMP et la mort cellulaire, et diminuaient la viabilité cellulaire lors de l'exposition au champ AMF avec la même efficacité que les nanoparticules NF@PEG@Gastrin. Ces résultats indiquent que les nanoparticules NF@SiO₂@PEG protégées pourraient induire la production de ROS et la mort cellulaire en raison de la génération de chaleur des nanoparticules sous AMF sans impliquer la libération d'ions Fe par dégradation des cœurs d'oxyde de fer des nanoparticules.

Cependant, les lysosomes contiennent un taux élevé de fer, associé à des enzymes contenant de l'hème et/ou libéré par la dégradation de ces enzymes. Par conséquent, la génération de chaleur locale au voisinage du NF@SiO₂@PEG pourrait induire la production de ROS en activant la réaction de Fenton en utilisant des ions Fe²⁺ endogènes libres présents dans les lysosomes ou provenant de la dégradation des enzymes contenant de l'hème induite par l'hyperthermie magnétique. Ici, nous montrons que le chauffage des nanoparticules, lorsqu'il est exposé au champ magnétique alternatif à haute fréquence, sert de catalyseur de la réaction de Fenton et

que les ions Fe^{2+} provenant du pool de fer intracellulaire sont nécessaires et suffisants pour induire la mort cellulaire par hyperthermie magnétique intra-lysosomale. Ces résultats sont en accord avec une étude qui montre une augmentation de la production de ROS et de la mort cellulaire sous hyperthermie magnétique intra-lysosomale dans les cellules supplémentées en fer. En effet, lorsque les cellules INR1G9-CCK2R sont traitées avec $120 \mu\text{M}$ de FeCl_3 : la production de ROS lysosomales et la mort cellulaire augmentent (jusqu'à $4,0 \pm 0,3$ fois plus que la valeur basale $2,6 \pm 0,2$ fois en présence de Gastrin-MNP seul) ²⁴. Le fer endogène, lié à des protéines ou présent sous forme libre, pourrait être potentiellement disponible à proximité des nanoparticules pour entrer dans la réaction de Fenton. Il serait intéressant de pouvoir doser uniquement le fer magnétique donc le fer de la nanoparticule d'oxyde de fer, avant et après exposition au champ magnétique et de rapporter ces quantités au dosage de fer cellulaire globale, ainsi que d'analyser si les deux types de nanoparticules accumulées dans les lysosomes se dégradent ou non après application du champ magnétique. Une telle analyse est en cours par résonance paramagnétique électronique (pEPR). D'autre part, Clerc et ses collaborateurs n'ont pas détecté de relargage de fer des nanoparticules après application d'AMF ($0,94 \pm 0,06$ vs $0,92 \pm 0,03$ pg Fe magnétique/cellule dans respectivement les cellules incubées avec l'IONP et soumis à l'AMF ou cellules incubées avec l'IONP uniquement) ²⁴. Cela met en évidence le fait que la libération de fer par l'IONP pourrait être négligeable / non détectable, la quantité est très petite devant le pool de fer disponible dans les lysosomes des cellules pour induire la réaction de Fenton.

D'ailleurs, nos résultats confirment que la MILH n'induit pas de mort cellulaire lorsque les cellules sont déplétées en fer endogène, *via* l'utilisation de la Ferristatin-II, malgré la présence du fer relargué par les NF@gastrin soumises à l'AMF. Les nanoparticules d'oxyde de fer agissent donc en tant que catalyseur de la réaction de Fenton en utilisant le pool cellulaire de fer endogène dans l'induction de la mort cellulaire par hyperthermie magnétique intra-lysosomale.

PARTIE II :

THERMAL OR MECHANICAL ENERGY RELEASED BY
MAGNETIC NANOPARTICLES UPON HIGH OR LOW
FREQUENCY MAGNETIC FIELD INDUCE
IMMUNOGENIC CELL DEATH IN PANCREATIC
ADENOCARCINOMA

THERMAL AND OR MECHANICAL ENERGY RELEASED BY MAGNETIC NANOPARTICLES UPON HIGH OR LOW FREQUENCY MAGNETIC FIELD EXPOSURE INDUCE IMMUNOGENIC CELL DEATH IN PANCREATIC ADENOCARCINOMA

Justine Journaux-Duclos^{1#}, Loubna Kehal-Laib^{1#}, Angéla Agaesse¹, Pascal Clerc¹, Megi Bejko^{2,3}, Corinne Bousquet¹, Julian Carrey⁴, Stéphane Mornet², Olivier Sandre³, Véronique Gigoux^{1*}

1. Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, INSERM U1037, Toulouse
2. Institut de Chimie de la Matière Condensée de Bordeaux, CNRS, Univ. Bordeaux, Bordeaux INP, Pessac
3. Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques, CNRS, Univ. Bordeaux, Bordeaux INP, Pessac
4. Laboratoire de Physique et Chimie des Nano-Objets, CNRS-UPS-INSA UMR5215, Toulouse

* : Correspondance : Véronique Gigoux, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, INSERM U1037, Team MICROPANC, 2 Avenue Hubert Curien, 31037 Toulouse, France.
Email: veronique.gigoux@inserm.fr

: equal participation

ABSTRACT

PDAC is particularly resistant to conventional therapies and characterized by the presence of a large and dense microenvironment with a key role of CAFs (Cancer-Associated Fibroblast). CAFs promote proliferation and progression of the tumor, secrete extracellular matrix proteins forming a physical barrier that limits not only the penetration and the diffusion of therapeutic drug but also the infiltration of immune cells and so an efficient anti-tumoral immune response. Consequently, immunotherapy turned out to be disappointing against PDAC and PDAC was classified as a “cold” tumor or a “immune desert” cancer. Thanks to their physico-chemical properties, iron oxide magnetic nanoparticles (IONPs) are innovative tool notably as theranostic agent for cancer diagnosis and therapy. IONPs exposed to high frequency (AMF) or low frequency rotating (RMF) magnetic field can induce thermal or mechanical related damages, leading to cell death and tumor regression. The aim of the study was to investigate whether local thermal or mechanical forces released by IONPs upon AMF or RMF application, respectively, can stimulate immunogenic cell death and improve anti-tumoral response, in the PDAC model. We developed IONPs that specifically target pancreatic cancer cells and CAFs expressing the CCK2 (MiaPaca2-CCK2 and CAF-CCK2) receptor to optimize their accumulation in the lysosomes of these cells. We showed that these IONPs vectorized with gastrin, called NF@Gastrin, bound, internalized and accumulated in the lysosomes of MiaPaca2-CCK2 and CAF-CCK2 cells. We demonstrated that AMF or RMF application killed cancer cells and CAFs having internalized NF@Gastrin and slowed down their proliferation without affecting cells lacking the nanoparticles, on 2D MiaPaca2-CCK2 or CAF-CCK2 culture and on 3D MiaPaca2-CCK2/CAF-CCK2 spheroid models. Then, we demonstrated that magnetic hyperthermia as well as mechanical forces generated by NF@Gastrin upon AMF or RMF exposure increased the expression of calreticulin and HSP70 proteins, known as Damage-Associated Molecular Pattern (DAMP), at the surface of MiaPaca2 cancer cells and CAF. This effect is associated with an increased phagocytosis of these cells by human THP1 macrophages. Altogether, these results strongly suggest that magnetic hyperthermia or mechanical forces generated by IONPs upon AMF or RMF application are two potential new strategies capable of inducing immunogenic cell death and restoring anti-tumor response within the PDAC.

INTRODUCTION

Pancreatic cancer is a cancer with a very poor prognosis since the 5-year survival rate is less than 10%¹⁴⁸, with more than 220,000 deaths each year worldwide. Despite advances in oncology research and medicine, its incidence continues to rise, and it is predicted to be the second leading cause of cancer death within a few years. Pancreatic adenocarcinoma (PDAC) is particularly resistant to conventional therapies and characterized by the presence of a large and dense microenvironment with a key role of CAFs (Cancer-Associated Fibroblast). These cells can promote proliferation and progression of the tumor²⁸², formed a physical barrier²⁸³ that limits the penetration and diffusion of therapeutic agent and limit immune cells infiltration²⁸⁴. Moreover, pancreatic cancer has a lot of intrinsic properties limiting immune cell infiltration and so anti tumoral immune response. Thus, PDAC is considered as a ‘‘cold tumor’’. Consequently, immunotherapy turned out to be disappointing against pancreatic cancer in contrast to other cancers such as melanoma. That is why many strategies aim to transform this cold tumor in hot tumor to improve anti-cancer immunotherapies²⁸⁵.

Emergent strategies to eradicate tumors are based on hyperthermia. Hyperthermia is an increase of temperature, between 40 and 43 °C, that can radio- or chemo-sensibilize cancers^{286–288}. Indeed, a phase III clinical trial was conducted showing an increase of 15% of local progression-free survival in patients with sarcoma treated with chemotherapy (etoposide, ifosfamide, and doxorubicin) in combination with hyperthermia compared to chemotherapy alone²⁸⁹. However, hyperthermia induces side effects such as pain and burn skin²⁸⁹. It is in this context that nanotechnology know a fast-growing. Thanks to their size and their physico-chemical properties, nanoparticles are innovative tools. For example, iron oxide nanoparticles (IONP) exposed to a high frequency alternating magnetic field (AMF) can heat²⁹⁰ and induce thermal related damages, increase DAMP expression and phagocytosis related to stimulation of immune response¹⁴⁵, *etc.* A clinical trial was conducted to treat high-grade brain tumors with magnetic hyperthermia in 2011¹¹³, and on prostate cancer, in combination with radiotherapy¹¹⁴. Although the feasibility of the protocol has been confirmed, the benefit on life expectancy remains minimal and neither radiotherapy nor magnetic hyperthermia can distinguish between normal and cancerous tissues, leading to adverse effects. On the other hand, IONP exposed to low frequency rotating or alternating magnetic field, can generate mechanical forces⁹⁷ that induce mechanical related damages. As this strategy is poorly investigated, we decide to study it in parallel with magnetic hyperthermia.

Our two strategies are based on the design of IONP, capable of specifically recognizing target cells and therefore specifically treating cancerous tissue with targeted magnetic hyperthermia or targeted mechanical ablation *via* the application of an external AMF or RMF, while minimizing damages to healthy tissue. These targeted strategies consist of specifically delivering IONPs into the lysosomes of target cells. The AMF exposure will then specifically eradicate these cells by magnetic hyperthermia or mechanical disruption, without macroscopic temperature elevation. Cancer cells as well as pancreatic CAFs can overexpress the CCK2 receptor (membrane receptor that internalizes after binding of its specific agonist: gastrin). We have developed IONPs with high thermal power, termed "NanoFlowers" (NF), decorated with fluorophore and gastrin molecules (NF@ Gastrin) allowing respectively their detection and targeting.

Herein, we confirm that these IONPs (NF@ Gastrin) specifically target the cancer cells (MiaPaca2-CCK2) and CAF (CAF-CCK2) expressing the CCK2 receptor, internalize and accumulate in high quantities in their lysosomes. The AMF (275 kHz, 20 mT) or RMF (1 Hz, 40 mT) application kills specifically the cancer cells and CAFs that have internalized NF@Gastrin and slows down their proliferation without affecting the cells lacking the nanoparticles on 2D culture and in 3D mixed spheroid model. Then, we demonstrate the ability of magnetic hyperthermia and mechanical ablation to increase membrane expression of Damage-Associated Molecular Pattern (DAMP): calreticulin and HSP70, proteins able to induce an anti-tumor immune response. Finally, we demonstrated that these treatments increased the phagocytosis of targeted cells by macrophages.

MATERIALS AND METHODS

Nanoparticle Synthesis, Functionalization and characterization

Magnetic iron oxide nanoparticles, called nanoflowers, were synthesized by the polyol route, as previously described²⁸⁵. The NF was modified through direct anchoring of PEG2k-NH₂. NF dispersed in water at 16 g/L γ -Fe₂O₃ with 23.3 PEG2k-NH₂ macromolecules·nm⁻² and with the pH set to 2 with HNO₃ 10 mM, were placed in the ultrasonic bath under agitation overnight. The NF were washed through tangential ultrafiltration (Merck Millipore, Mw cutoff = 300 kDa) with mQH₂O.

The NF@PEG nanoparticles were then decorated with ~100 molecules of a synthetic replicate of gastrin (Cys-Lys-Ser-Ser-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Nle-Asp-Phe-NH₂, Covalab) and ~20

molecules of the fluorescent label NHS-DY647-PEG1 (Dyomics GmbH, Jena, Germany), and termed as NF@PEG@gastrin. An aliquot of nanoparticles was sonicated for 5 min on melting ice (Bioblock Scientific 88154). Firstly, the linkage of the fluorophore NHS-DY647-PEG1 (20 molecules per IONP) was performed in phosphate buffer pH 8.3, at room temperature for 1 h. Then, 3-Maleimidopropionic acid N-hydroxysuccinimide ester (BMPS, 1n NH₂) in solution in DMF was added and incubated at room temperature for 1h. After 5 washes with 10 volumes of H₂O, gastrin (~100 peptides per nanoparticles) in solution in 30% DMF, 70% H₂O was added in phosphate buffer pH 7.2 and let to react for 2h. Finally, free maleimide functions were saturated by addition of an excess of cysteine (10n NH₂) in phosphate buffer pH7.2. After 8 washes with 10 volumes of H₂O, NF@ Gastrin were stored at 4°C. The size of the magnetic core determined by transmission electron microscopy was 17.3 ± 2.6 nm. The hydrodynamic diameter of NF@ Gastrin was 50.3 ± 4.0 nm in H₂O, determined by Dynamic Light Scattering. The saturation magnetization (M_s) is $356 \pm ?$ kA/m. The specific absorption rate of NF@PEG is 226.6 ± 4.9 W/g γ -Fe₂O₃ at 275 kHz and 24 mT.

Cell culture

The pancreatic cancer cell line MiaPaca2 and the Cancer-associated fibroblast (CAF) were permanently transfected with the human CCK2 receptor (CCK2R) using the cDNA encoding CCK2R subcloned in pcDNA3 vector (BD Biosciences Clontech) and Lipofectamine 2000 (Invitrogen), and selected respectively with 600 or 400 μ g/ml geneticin (Sigma-Aldrich) and termed MiaPaca2-CCK2 and CAF-CCK2. MiaPaca2 and MiaPaca2-CCK2 were cultured in complete DMEM medium (DMEM GlutaMAX™, Thermofisher Scientific) containing 10% FBS, 100 IU/ml penicillin/streptomycin (Penicillin-Streptomycin P4333; Sigma-Aldrich) in a humidified atmosphere at 95% air and 5% CO₂ at 37°C. Lentivirus-transduced GFP-expressing MiaPaca2-CCK2 (MiaPaca2-CCK2-GFP) cancer cells were sorted for GFP with BD Influx™ cell sorter. MiaPaca2-CCK2 cells were grown with 600 μ g/ml geneticin (Sigma-Aldrich). CAF and CAF-CCK2 were cultured in complete DMEM-F12 medium containing 10% FBS, 100 IU/ml penicillin/streptomycin (Penicillin-Streptomycin P4333; Sigma-Aldrich) in a humidified atmosphere at 95% air and 5% CO₂ at 37°C. THP1 monocytes were cultured in RPMI 1640 medium (RPMI 1640 GlutaMAX™, Thermofisher Scientific) containing 10% FBS, 100 IU/ml penicillin/streptomycin (Penicillin-Streptomycin P4333; Sigma-Aldrich), 10 mM HEPES, 50 mM β -mercaptoethanol in a humidified atmosphere at 95% air and 5% CO₂ at 37°C.

Analysis of nanoparticles cytotoxicity

10⁴ cells/well were seeded in a 96-well plate, grown overnight, and treated with increased concentrations of NF@PEG-Gastrin in complete DMEM medium for 24, 48 or 72h. The cells maintained in the incubation medium without MNPs served as negative controls. 10 μ L of MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) at 5 mg/mL were added and incubated for 2h at 37°C. After cell culture medium removal, 100 μ L of dimethylsulfoxide were added and incubated for 1h at 37°C, and the absorbance values were measured at 570 nm.

Analysis of nanoparticles uptake by Flow Cytometry

10⁵ cells/well were seeded onto 24-well plates and grown overnight. For the kinetic, cells were incubated with NF@ Gastrin ($[\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3] = 16 \mu\text{g/mL}$) for 2 to 72h at 37°C in complete DMEM or DMEM-F12 medium. For the specificity, the cells were incubated with increased concentrations of NF@ Gastrin (2 to 64 $\mu\text{g/mL}$) for 24 or 72h. Then, cells are washed 3 times with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.5% BSA (Bovine serum albumin), collected with 300 μ L of trypsin and centrifuge 10 min at 1500 rpm. The cells were resuspended in 300 μ L of PBS, 2 mM EDTA. The cell-associated fluorescence was determined using a LSRII BD Fortessa (BD Biosciences) flow cytometer.

Quantification of MNP uptake by relaxometry

~10⁶ MiaPaca2-CCK2 or CAF-CCK2 cells were seeded onto 35 mm dishes in complete DMEM medium. Cells were incubated with NF@ Gastrin ($[\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3] = 16 \mu\text{g/mL}$) in complete DMEM or DMEM-F12 medium for 72 h, at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere, washed twice with ice-cold PBS, and centrifuge 10 min at 1500 rpm.

The amount of internalized IONPs was determined through NMR relaxometry, as previously described ²⁷⁹.

IONP localization by confocal microscopy

50 x 10³ cells/compartiment were plated onto 4-compartment Cellview culture dishes (Greiner Bio-One). After overnight growth, the cells were incubated with NF@ Gastrin ($[\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3] = 16 \mu\text{g/mL}$) in complete DMEM or DMEM-F12 medium for 72 h. The cells were then incubated for 15 minutes with 10 nM LysoTracker Green DND-26 (excitation: 488 nm, Life technologies).

NF@ Gastrin (excitation: 633 nm) and Lysotraker co-localization was analyzed using a LSM780 confocal microscope (Zeiss) and quantified with ImageJ software.

Cell Exposure to high frequency alternating (AMF) or low frequency rotating (RMF) magnetic fields

The cells were seeded 24h before the experiments onto four-compartment Cellview dishes (Greiner Bio-One), grown overnight and incubated with NF@PEG-Gastrin for 72h at 37 °C in complete DMEM or DMEM-F12 medium to allow nanoparticles internalization and accumulation in lysosomes, washed, incubated with complete medium, and exposed or not to AMF (275 kHz, 20 mT) or RMF (1 Hz, 40 mT) for 2h. The temperature of the incubation medium was strictly maintained at 37 °C and controlled using a thermal probe (Reflex, Neoptix, Quebec City, QC, Canada) placed in the incubation medium. At the end of the experiments, the cells were placed in a humidified atmosphere at 5% CO₂ at 37 °C for further analyses.

Analysis of cell death

The effects of AMF or RMF exposure on cell death were investigated as follows: cells were seeded onto four-compartment Cellview dishes (Greiner Bio-One), incubated with NF@Gastrin (γ -Fe₂O₃: 4 to 64 μ g/mL) in incubation medium for 72h, washed and exposed to AMF or RMF as previously described. 4h after AMF or RMF exposure, the dead cells were labeled with FITC-annexin V (AnnV) and/or propidium iodide (PI) (Cell Meter Annexin V apoptosis assay kit, AAT Bioquest, Sunnyvale, CA, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. The counting of labeled cells was carried out through the analysis of confocal microscopy images (LSM510, Zeiss) representing populations of 2000–3000 cells/experiment using ImageJ software.

Analysis of cell survival

10⁴ cells/compartment were seeded onto 4-compartment Cellview dishes (Greiner Bio-One), grown overnight and incubated with NF@Gastrin ($[\gamma$ -Fe₂O₃] = 16 μ g/mL) for 72h. Then, the cells were washed, incubated in complete DMEM medium and exposed to AMF for 2h, 3 times every 48 h. The effects of magnetic field treatments were investigated on cell proliferation by counting the cell number using a cell counter (Beckman cell counter z2) once per day for 6 days.

Analysis of clonogenicity

10³ MiaPaca2-CKK2 cells were seeded onto 35 mm dishes in complete DMEM medium, grown overnight and incubated with NF@ Gastrin ([γ -Fe₂O₃] = 16 μ g/mL) for 72h. Then, the cells were washed, incubated in complete DMEM medium and exposed to AMF for 2h, 3 times every 48 h, then incubated for 8 days. After removing medium, the cells were washed twice with PBS, fixed with 10% buffered formalin solution for 30 minutes at room temperature, washed twice with PBS, stained with 0.04% (w/v) crystal violet in H₂O for 10 minutes at room temperature, then washed with H₂O and dried. The colonies number was counted.

MiaPaca2-CCK2/CAF-CCK2 3D spheroids

1,500 cells of MiaPaca2-CCK2-GFP are mixed with 1,500 cells CAF-CCK2 in 25 μ L drop in DMEM containing 20% FBS, 100 IU/ml penicillin/streptomycin, 1.2% methylcellulose. Droplets are formed and deposited on lid of petri dish and let on returned lid overnight. Then, the spheroids are transferred into 35 mm dishes pre-treated with anti-adherence solution, and grown in complete medium DMEM containing 20% FBS, 100 IU/ml penicillin/streptomycin a humidified atmosphere at 95% air and 5% CO₂ at 37°C. To analyze the ratio of cell types, spheroids are dissociated with trypsin, centrifuged, resuspended in 300 μ L of PBS, 2 mM EDTA, and analyzed by flow cytometry (LSRII BD Fortessa, BD Biosciences). To analyze nanoparticles cytotoxicity, spheroids are dissociated with trypsin and the number of cells is determined using a cell counter (Beckman cell counter z2).

Cellular localization of NF@PGE-Gastrin in spheroids

MiaPaca2-CCK2-GFP/CAF-CCK2 spheroid are incubated NF@ Gastrin ([γ -Fe₂O₃] = 32 μ g/mL) for 72h, then wash with PBS, fixed with buffered formalin 4% overnight at 4°C, washed with PBS, permeabilized with Triton-X100 2% for 24h, washed with PBS, and finally treated with radiplear (ref) overnight. Spheroid are observed by LSM780 confocal microscopy (Zeiss).

Analyze of DAMPs expression at cell surface

10⁴ MiaPaca2-CCK2 or CAF-CCK2 cells cultured in 2D were incubated with NF@ Gastrin ([γ -Fe₂O₃] = 16 μ g/mL) for 72h, washed, incubated in complete medium and exposed to AMF

or RMF for 2h, 3 times every 48 h the cells were then incubated with anti-HSP70 (Heat Shock Protein 70, Santa Cruz Biotechnology, sc-24 AF488, 1/100), anti-CalR (Calreticulin, StressMarq Biosciences, SPC-1228-FITC, 1/200) or anti-CD47 (Life technologies, A15734, FITC, 1/50) at 37°C during 45 minutes in PBS, 0.5% BSA. Then, the cells were washed and the cell-associated fluorescence is analyzed by flow cytometry (Fortessa, BD Biosciences).

Analysis of phagocytosis

10⁵ THP-1 monocytes/well were seeded in 48-well plates, and differentiated into macrophages with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) at 25 nM for 24h, then incubated with FBS-free RPMI-1640 medium for 24h. 10⁴ MiaPaca2-CCK2 or CAF-CCK2 cells cultured in 2D were incubated with NF@ Gastrin ([γ -Fe₂O₃] = 16 μ g/mL) for 72h, washed, incubated in complete medium and exposed to AMF or RMF for 2h, 3 times every 48 h. After the last exposure to magnetic fields, MiaPaCa2-CCK2 or CAF-CCK2 cells are labeled with ultra-green CytoTell (AAT Bioquest, 1/500) for 20 min at 37°C. The cells were then dissociated with trypsin, washed twice with PBS, resuspended in 250 μ L of non-supplemented RPMI 1640 (Gibco), and incubated with THP-1 cells with a 2/1 ratio (2 MiaPaCa2-CCK2 or CAF-CCK2/1 THP-1) for 2 hours. The cells were then collected, centrifuged 7 minutes at 1500 rpm, and incubated with the anti-CD11b (Santa Cruz Biotechnology/ITGAM APC, 1/150) in PBS, 0.5% BSA buffer for 30 minutes at 4°C and analyzed by flow cytometry (Cytek[®] Aurora cell sorter, Cytek biosciences). The phagocytosis index was calculated by taking the percentage of THP1 macrophages co-labeled with CD11band ultra-green CytoTell.

Statistical Analysis

Results are expressed as the mean +/- SEM of at least three independent experiments. The statistical analysis was performed using ANOVA tests. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

NF@Gastrin are specifically internalized and accumulated in the lysosomes of CCK2 receptor expressing cells.

The cancer progression and aggressiveness are not only dictated by the tumor cells, but also involve the tumor microenvironment notably the cancer-associated fibroblasts (CAF) that play a critical role in tumor progression and resistance acquisition to anti-cancer treatments such as in pancreatic cancer. The type 2 cholecystokinin receptor, CCK2R, was showed to be expressed on preneoplastic cancer lesions and cancer-associated fibroblasts (CAFs) in pancreatic adenocarcinoma²⁵². Based on previous studies, the NF@PEG magnetic nanoparticles were decorated with gastrin (NF@ Gastrin) in order to possess active targeting properties and increase nanoparticles accumulation in the lysosomes of pancreatic cancer cells MiaPaca2 and CAF expressing the cholecystokinin type 2 receptor (CCK2). We analyzed the cytotoxicity, the uptake and subcellular localization of NF@Gastrin magnetic nanoparticles on pancreatic cancer cells MiaPaCa2 and cancer-associated fibroblasts (CAF), chosen as models. The NF@PEG-Gastrin did not present any cytotoxic activity on MiaPaca2-CCK2 cancer cells up to 128 $\mu\text{g/ml}$ Fe_2O_3 and 72 h of incubation (Figure 1A). The NF@Gastrin present a low cytotoxic activity ($19.1 \pm 3.6\%$) on CAF-CCK2 cells up to 16 μg $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{ml}$ and 72 h of incubation that increase at higher concentrations ($42.8 \pm 3.2\%$ at 128 $\mu\text{g/ml}$ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) (Figure 1B). Same results were observed on MiaPaca2 and CAF lacking the CCK2 receptor (supplementary Figure S1).

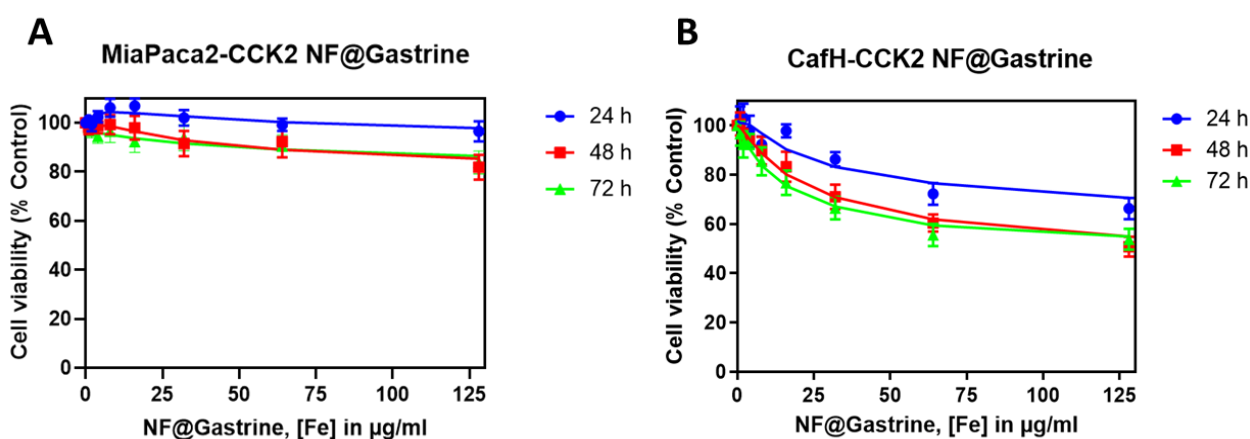


Figure 1: Analysis of NF@ Gastrin cytotoxicity.

MiaPaca2-CCK2 (A) or CAF-CCK2 (B) cells were incubated with increasing concentrations of NF@Gastrin (1 to 128 μg $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{mL}$) for 24, 48 or 72h in complete medium. The cell viability was analyzed by MTT assay. Results are expressed as mean \pm SEM of at least three independent experiments.

The kinetics of NF@Gastrin uptake determined by flow cytometry indicated that the amount of NF@Gastrin taken up by MiaPaca2-CCK2 and CAF-CCK2 increased with the time of incubation and stabilized after 48h of incubation for MiaPaca2-CCK2 and still increased continuously for CAF-CCK2 (Figure 2 A-B). Furthermore, the amount of bound and internalized NF@Gastrin was higher and faster in cells expressing the CCK2 receptor, MiaPaca2-CCK2 and CAF-CCK2, than in MiaPaca2 and CAF cells lacking the CCK2 receptor, indicating that the NF@Gastrin uptake depends on the CCK2R expression at the cell surface. Indeed, the NF@Gastrin uptake is respectively 3.8 ± 1.0 and 2.9 ± 0.7 -fold more important in MiaPaca2-CCK2 and CAF-CCK2 compared to MiaPaca2 and CAF, after 72h of incubation. The targeting efficiency of NF@Gastrin was also determined by flow cytometry after 72h of incubation and confirmed that NF@Gastrin uptake is more important in cells expressing the CCK2 receptor than control cells, at any NF@Gastrin concentrations (Figure 2 C-D). We also confirm these results from 24h of incubation (supplementary Figure S2). Moreover, the amount of NF@Gastrin taken up by cells increased with the nanoparticle's concentration (Figure 2 C-D). The internalized amount of NF@Gastrin was then determined through R1 (R2) measurement by NMR relaxometry and corresponded to 2.8 ± 0.7 pg γ -Fe₂O₃/cell (2.9 ± 0.2 pg γ -Fe₂O₃/cell) and 0.6 ± 0.1 pg γ -Fe₂O₃/cell (1.2 ± 0.2 pg γ -Fe₂O₃/cell) in MiaPaca2-CCK2 and CAF-CCK2 cells respectively (Figure 2E).

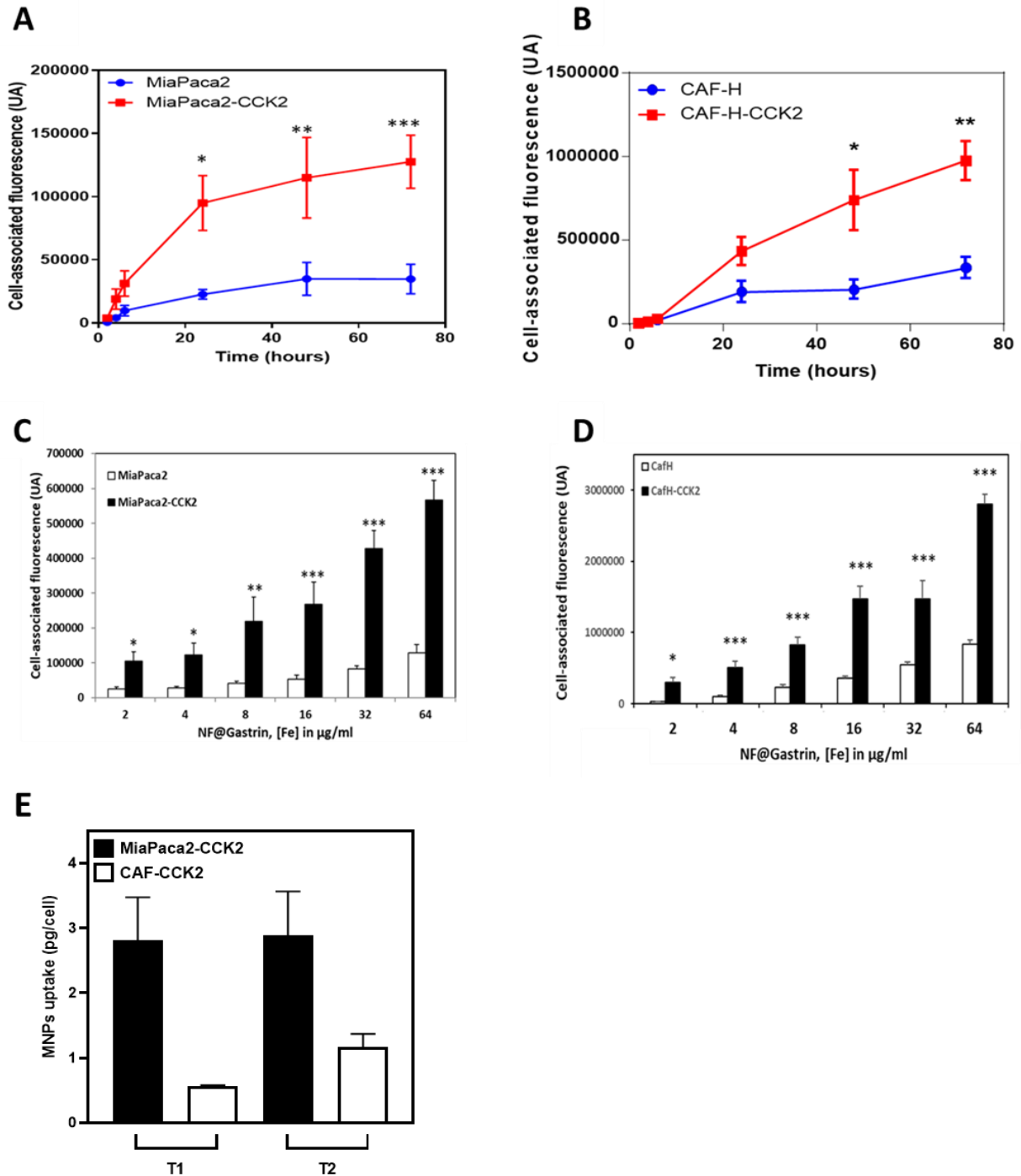


Figure 2: Analysis of NF@Gastrin uptake by cancer cells and CAF expressing or not the CCK2 receptor.

A and B) Kinetics of NF@Gastrin uptake (16 µg γ -Fe₂O₃/mL γ -Fe₂O₃) on MiaPaca2-CCK2 (in red) and MiaPaca2 (in blue) (A) or CAF-CCK2 (in red) and CAF (in blue) (B), incubated for 2 to 72 hours. C and D) Binding specificity of NF@Gastrin (2 to 64 µg γ -Fe₂O₃/mL γ -Fe₂O₃) on MiaPaca2-CCK2 (in black) compared to MiaPaca2 (in white) (C) or CAF-CCK2 (in black) compared to CAF (in white) (D), incubated for 72h. (E) MiaPaca2-CCK2 and CAF-CCK2 cells were incubated with NF@Gastrin (16 µg γ -Fe₂O₃/ml) for 72h. The quantity of Fe³⁺ contained in the cells was determined by NMR relaxometry. Results are expressed as mean \pm SEM of at least three independent experiments.

Then, we characterized the cellular fate of NF@Gastrin in MiaPaca2-CCK2 and CAF-CCK2 cells (Figure 3). The confocal microscopy study demonstrated that NF@Gastrin accumulated in the lysosomal vesicles (Figure 3 A-B). Analysis of NF@Gastrin / LysoTracker colocalization demonstrated that 78.4 ± 1.2 and 78.8 ± 1.4 % of NF@Gastrin uptaken by cells were respectively localized inside the lysosomes of MiaPaca2-CCK2 and CAF-CCK2 cells (Figure 3 C).

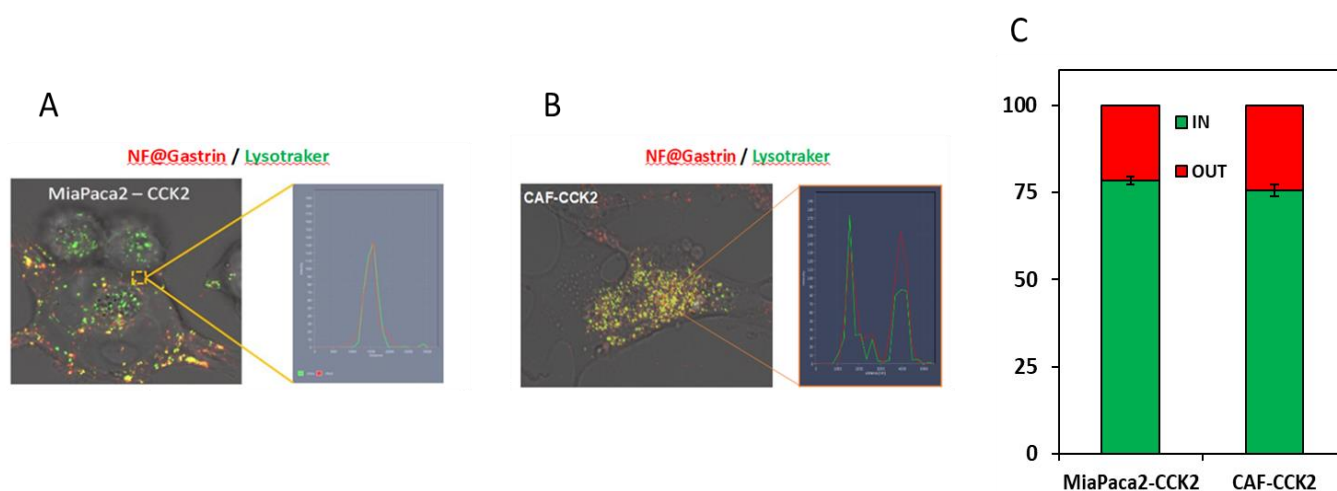


Figure 3: Subcellular localization of NF@gastrin MiaPaca2-CCK2 cancer cells and CAF-CCK2 cells.
A and B: Analysis of subcellular localization of NF@Gastrin in MiaPaca2-CCK2 (A) or CAF-CCK2 (B) cells. The cells were incubated with NF@Gastrin (16 μg $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{ml}$) for 72h, then with 10 nM LysoTracker Green DND-26 for 10 minutes and observed by confocal microscopy. C: Quantification of NF@Gastrin accumulation in lysosomes of MiaPaca2-CCK2 or CAF-CCK2 cells by analysis of confocal microscopy images.

These results indicated that NF@Gastrin were biocompatible, internalized and accumulated in the lysosomes of cancer cells as well as CAF, confirming that cancer cells or cells from tumoral microenvironment overexpressing a surface receptor can be efficiently targeted by vectorized nanoparticles.

AMF or RMF actuation of MNPs affects cancer cells and CAF viability

After studying the magnetic nanoparticles internalization, we examined the cell mortality and viability after magnetic field treatments. Two magnetic field conditions were used: the high frequency alternating (AMF: 20 mT / 250 kHz) and the low frequency rotating (RMF: 40 mT / 1 Hz) ones generating respectively the release of thermal or mechanical energy from magnetic

nanoparticles. For this purpose, MiaPaca2-CCK2 or CAF-CCK2 cells were incubated with 4 to 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of NF@Gastrin for 72h, washed to eliminate unbound and non-internalized NF@Gastrin and exposed to AMF or RMF for 2h while temperature was maintained at 37°C. Controls were composed of cells lacking NF@Gastrin and cells having internalized NF@Gastrin but that were not exposed to magnetic field. After AMF or RMF exposure, the cells were cultured under standard conditions for recovery. The impact of treatments was determined by counting the dead cells labeled with iFluor488-tagged annexin V (AnnV) and/or propidium iodide (PI) by confocal microscopy, 4h after AMF or RMF exposure (Figure 4 A-D). As shown in the figures 4A and AB, AMF exposure caused the MiaPaca2-CCK2 and CAF-CCK2 cells having internalized NF@Gastrin to die. The cell mortality rates increased with the magnetic nanoparticles concentrations, reaching $42.9 \pm 8.1 \%$ and $58.9 \pm 2.2\%$ of MiaPaca2-CCK2 and CAF-CCK2 cells incubated with 64 μg $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{ml}$ of NF@Gastrin respectively (compared to $11.9 \pm 0.9 \%$ and $20.8 \pm 3.2 \%$ in absence of AMF application). Interestingly, RMF also caused cell death: $25.13 \pm 1.8 \%$ and $31.9 \pm 3.5 \%$ of MiaPaca2-CCK2 and CAF-CCK2 cells incubated with 64 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of NF@Gastrin respectively (compared to $11.9 \pm 0.9 \%$ and $20.8 \pm 3.2 \%$ in absence of RMF application). However, 64 μg $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{ml}$ of NF@Gastrin presents a low cytotoxicity observed by measuring cell mortality ($20.8 \pm 3.2 \%$) and cell viability ($44.5 \pm 4.5 \%$) of CAF-CCK2 cells, whereas nanoparticles concentrations up to 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ are biocompatible (figures 4 and 1). The non-cytotoxic 16 μg $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{ml}$ concentration of NF@Gastrin also caused an efficient cell death upon AMF or RMF exposure: $31.3 \pm 2.9 \%$ and $33.5 \pm 2.2 \%$ of MiaPaca2-CCK2 and CAF-CCK2 cells exposed to AMF, and of $29.9 \pm 2.5 \%$ and $31.6 \pm 3.7 \%$ of MiaPaca2-CCK2 and CAF-CCK2 cells exposed to RMF respectively (compared to $11.9 \pm 0.9 \%$ and $12.9 \pm 0.7 \%$ in absence of RMF application). We thus used this nanoparticles concentration for further experiments. Noticeably, AMF and RMF did not affect the viability of MiaPaca2-CCK2 and CAF-CCK2 cells devoid of NF@Gastrin.

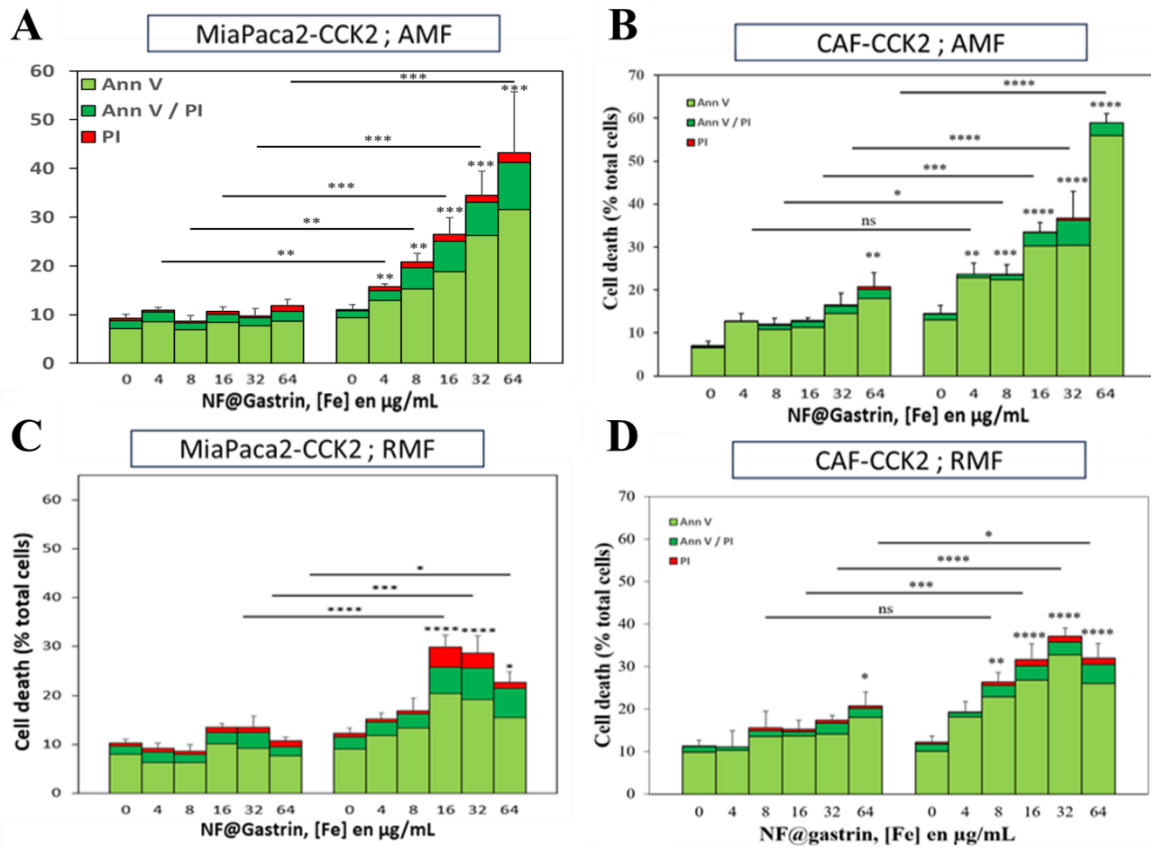


Figure 4: AMF or RMF actuation of MNPs affects cancer cells and CAF viability.

MiaPaca2-CCK2 (A, C) and CAF-CCK2 (B, D) cells were incubated or not with increasing concentrations of NF@Gastrin during 72h, then exposed or not to 2h of AMF (275 kHz, 20 mT) (A, B) or RMF (1Hz, 40mT) (C, D). The cell death was analyzed by iFluor488-Annexin V and Propidium Iodide labeling and visualized by confocal microscopy. The histograms represent the mean \pm SEM.

We then investigated the impact of AMF or RMF actuation of MNPs on the cell viability (Figures 5 A-D). MiaPaca2-CCK2 and CAF-CCK2 were incubated with NF@Gastrin at 16 $\mu\text{g } \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{ml}$ for 72h, washed to eliminate unbound and non-internalized nanoparticles and exposed to AMF or RMF for 2 h three time, separated by 48h, while the temperature was maintained at 37°C. While the AMF treatment had no significant effect on the number of nanoparticles-unloaded MiaPaca2-CCK2 and CAF-CCK2 cells when compared to control cells, the viability of NF@Gastrin-loaded MiaPaca2-CCK2 and CAF-CCK2 cells was significantly inhibited by AMF exposure (figures 5 A and B). We also showed that RMF actuation of NF@Gastrin decreased the viability of MiaPaca2-CCK2 and CAF-CCK2 cells (Figures 5 C and D). Of note, NF@Gastrin tends to decrease the viability of the CAF-CCK2

cells (Figures 4 B and D), which may be attributed to the anti-proliferative activity of the CCK2 receptor on pancreatic CAF that has been previously described ²⁵¹.

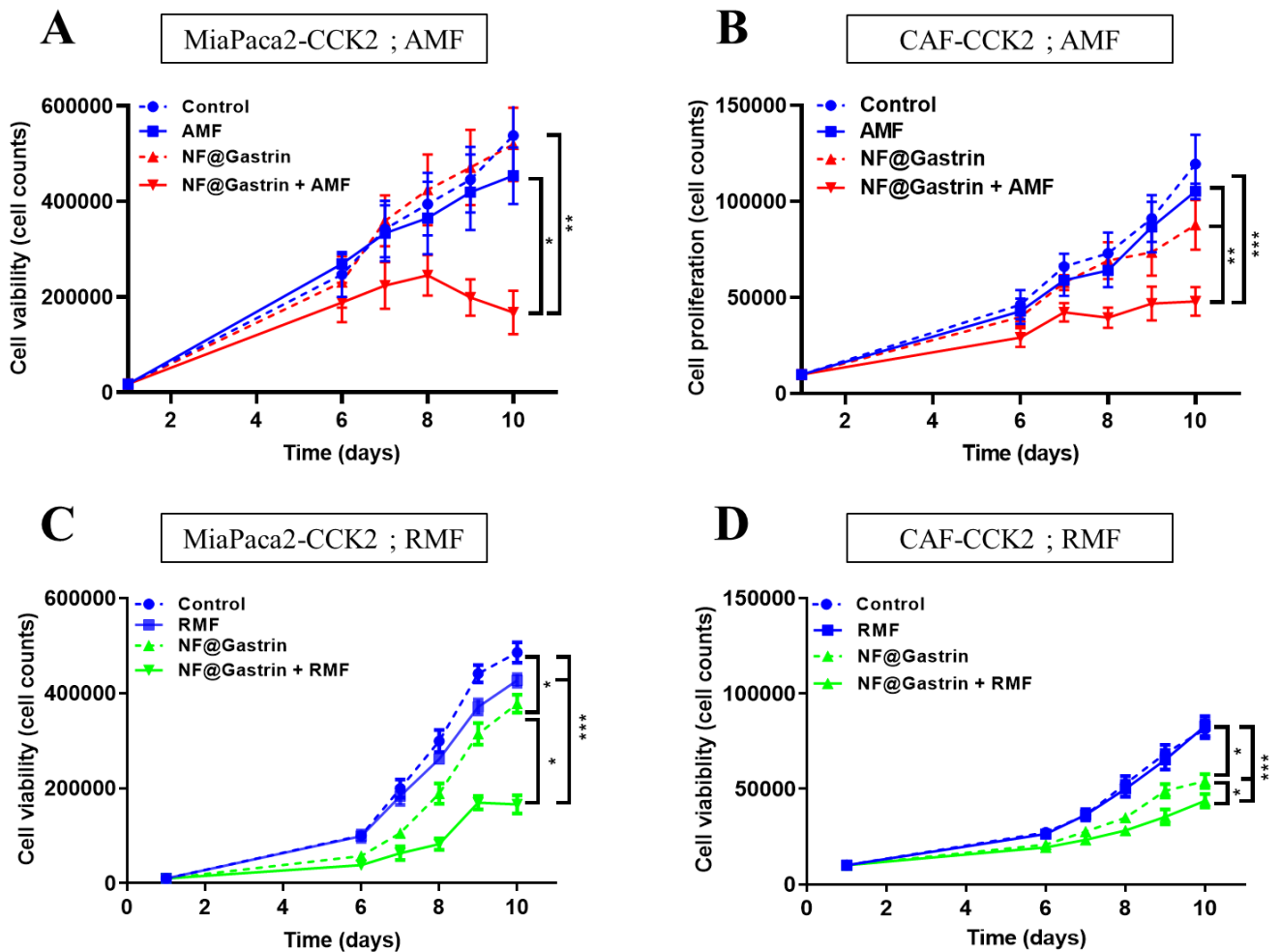


Figure 5: AMF or RMF actuation of MNPs affects cancer cells and CAF survival.

The inhibition of cell survival was analyzed on the MiaPaca2-CCK2 (A, C) and CAF-CCK2 (B, D) were incubated or not by increasing concentrations of NF@Gastrin for 72 hours, then exposed or not to 2 h of AMF (275 kHz, 20 mT) (A, B) or RMF (1Hz, 40 mT) (C, D), 3 times every 48h hours and the cells were counted every day.

The cytotoxic effect of AMF actuation of MNPs was also confirmed by a clonogenic assay evaluating the ability of a single cancer cell to grow into a colony. As shown in the supplementary Figure S3, local magnetic hyperthermia strongly inhibited the clone formation by MiaPaca2-CCK2 by $65.3 \pm 15.0\%$ (102 ± 44 compared to 292 ± 22 colonies in control cells in absence of AMF application). NF@Gastrin (328 ± 27 colonies) as well as AMF exposure

(272 ± 30 colonies) exhibited no adverse effect on MiaPaca2-CCK2 clone formation compared to control condition.

All together, these results indicated that the local release of thermal as well as mechanical energy by IONPs upon AMF or RMF exposure in the lysosomes induced the death of pancreatic cancer cells and CAF and affected the growth of these cells.

AMF or RMF actuation of MNPs inhibited the tumor growth in 3D tumor spheroids

To investigate the effect of NF@Gastrin on the tumor growth in a complex 3D microenvironment *ex vivo*, we established a 3D heterospheroid tumor model integrating different cellular components and capable to mimic the heterogeneity of the PDAC tumor, by co-culturing MiaPaca2-CCK2 cancer cells and CAF-CCK2 cells. We first examined whether co-culturing of CAF-CCK2 with MiaPaca2-CCK2 cancer cells induced the *ex vivo* tumor growth heterospheroids composed of both cell lines (ratio 1:1). We found that the heterospheroids increased in number of cells, confirming cancer cells/CAF heterospheroids as a good 3D *ex vivo* model of tumor growth (Figure 6A). After the tumor spheroids were established, we treated the tumor spheroids with different concentrations of NF@Gastrin (16, 32 and 64 $\mu\text{g } \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{mL}$) and examined for their viability by cell counting. The number of cells in NF@Gastrin-loaded and unloaded spheroids increased as a function of time and similarly, indicating that these NF@Gastrin concentrations were not cytotoxic for the MiaPaca2-CCK2/CAF-CCK2 heterospheroids (Figure 6A). We next monitored the MiaPaca2-CCK2 and CAF-CCK2 cell ratio during the heterospheroids growth (Figure 6B). Whereas heterospheroids were established with 50% of MiaPaca2-CCK2 and 50% of CAF-CCK2 cells, we observed that the heterospheroids are composed of $70 \pm 7\%$ of MiaPaca2-CCK2 and $30 \pm 7\%$ of CAF-CCK2 cells, 24h after seeding, indicating that MiaPaca2-CCK2 cancer cells proliferated more rapidly than the CAF-CCK2 at the beginning of the heterospheroids growth. Then, these ratios of the MiaPaca-CCK2 and CAF-CCK2 cells are maintained at 48 and 72h of heterospheroids growth and were not affected by the NF@Gastrin incubation. These results validated that heterospheroids constituted the right model to investigate the effect of MNPs actuation on tumor growth.

We next investigated the NF@Gastrin uptake in the 3D heterospheroids model. Pancreatic heterospheroids were incubated with NF@Gastrin for 24, 48 and 72h. At 72h, spheroids showed an average diameter of about 600 μm (Figure S4). Moreover, confocal images showed the

NF@Gastrin penetrated and diffused in the heterospheroids, and internalized in the MiaPaca2-CCK2 as well as in CAF-CCK2 cells. After spheroids dissociation, the NF@Gastrin uptake was determined by flow cytometry (Figures 6 C and D). The kinetics of NF@Gastrin uptake showed that the percentage of MiaPaca2-CCK2 cells having internalized NF@Gastrin is more important than the CAF-CCK2 cells (66.1 ± 6.0 vs 9.9 ± 0.9 %, 73.6 ± 2.1 vs 6.3 ± 1.4 %, 65.6 ± 4.1 vs 8.6 ± 1.0 % for 24, 48 and 72h of incubation with $32 \mu\text{g } \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{ml}$ NF@Gastrin, respectively).

Furthermore, the analysis of fluorescence intensity showed that the amount of NF@gastrin in CAF positive cells is more important than in MiaPaCa-2 positive cells (2.0, 2.0 and 2.2-fold higher in CAF-CCK2 than MiaPaca2-CCK2 at 24, 48 and 72h of incubation with $32 \mu\text{g}/\text{ml}$ NF@Gastrin, respectively), suggesting that the CAF populations are probably heterogenous and present different capacity to uptake nanoparticles. These results also indicate that the efficiency of NF@Gastrin uptake depends on cell type. These results showed that optimal NF@Gastrin uptake is obtained with the $32 \mu\text{g}/\text{ml}$ concentration and 48h to 72h of incubation.

We next studied the effect of AMF or RMF actuation of IONPs on the heterospheroid growth by cell counting (Figures 6 E and F). AMF and RMF exposure decreased significantly the growth of NF@Gastrin-loaded heterospheroids by 40.2 ± 4.4 % and 42.2 ± 7.1 %, respectively, compared to control cells, while the AMF or RMF exposure had no significant effect on the growth of unloaded heterospheroids (figures 6 E and F). NF@Gastrin incubation did not show also any significant effect on the heterospheroids growth, confirming the absence of cytotoxicity of the NF@Gastrin. In parallel, the size of heterospheroids was measured by microscopy (Figure S4). The results showed that AMF or RMF actuation of IONPs did not induce significant effect on the heterospheroids size compared to control condition. However, we observed a difference in cell density of NF@Gastrin-loaded heterospheroids exposed to AMF or RMF comparatively to unloaded ones or loaded spheroids in absence of magnetic field application, confirming the inhibition of cell growth induced by the release of thermal or mechanical energy from IONP upon AMF or RMF exposure. Further studies, analyzing the stiffness and elasticity, using atomic force microscopy, may bring new insights into the relationship between the spheroid physical properties and their response to magnetic hyperthermia or mechanical antitumor treatment. All together, these results demonstrated that the local release of thermal as well as mechanical energy by IONPs upon AMF or RMF

exposure halts the growth and may modify the physical property of the 3D heterospheroid pancreatic tumor model.

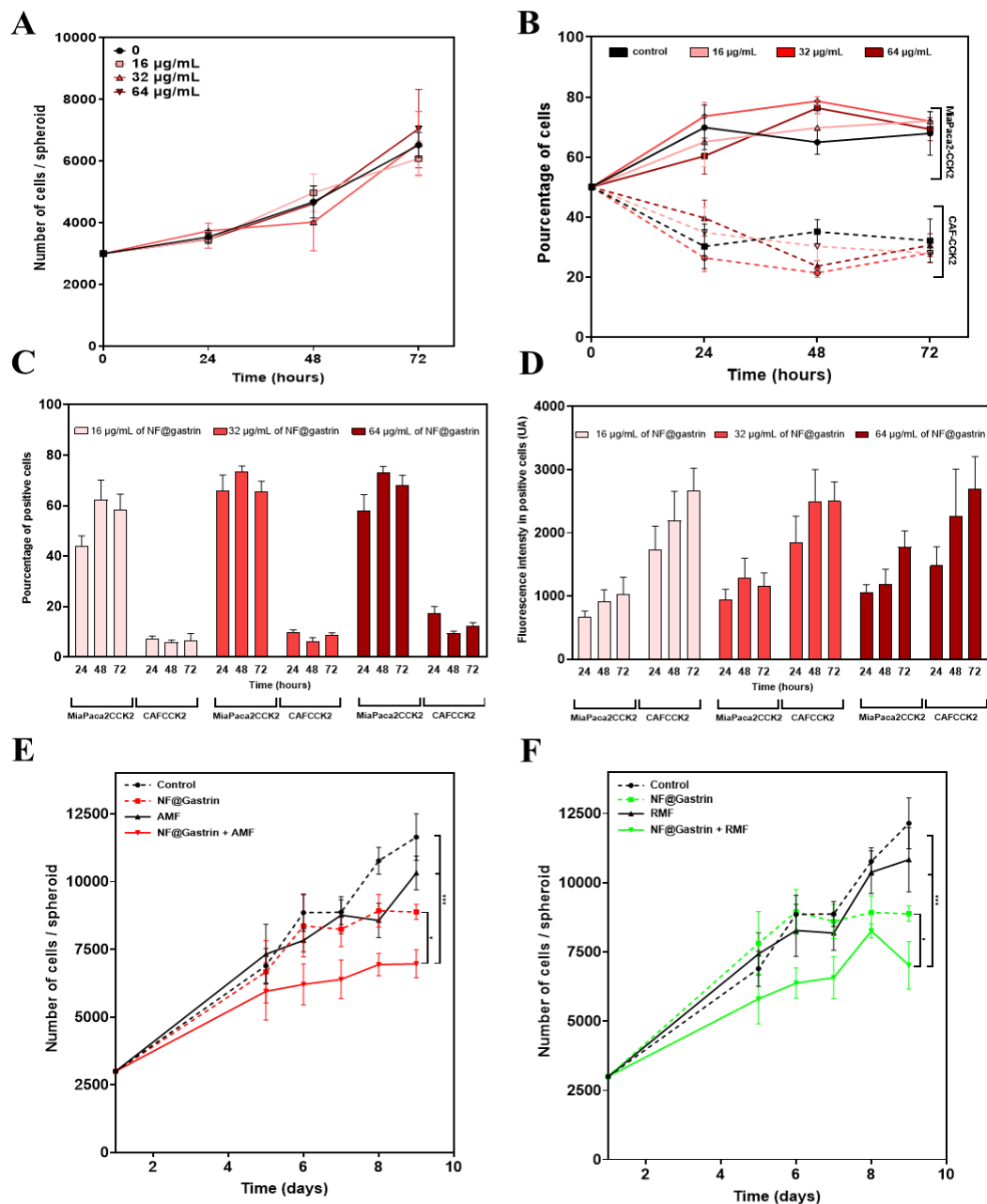


Figure 6: The study of magnetic hyperthermia and mechanical ablation on a 3D spheroid model of cancer cells and CAF.

The spheroids formed by MiaPaca2-CCK2 GFP and CAF-CCK2 (ratio 1/1) are incubated during 24, 48 or 72 hours with 16, 32 or 64 $\mu\text{g/mL}$ of NF@gastrin and the number of cells per spheroid is counted every day (A). The composition of the spheroids is monitored every day as a function of the dose of NF@gastrin (B).

The binding of NF@gastrin is studied on the 2 cell lines making up the spheroids, incubated with 16, 32 or 64 $\mu\text{g/mL}$ for 24, 48 or 72 hours, by flow cytometry: percentage of cell which uptakes NF@gastrin, called "positive cells" (C), and relative quantities of NF@gastrin uptaken by positive cells (D).

The effects of magnetic hyperthermia and mechanical ablation are analyzed by counting the number of cells per spheroid after incubation or not of the spheroids with 32 $\mu\text{g/mL}$ of NF@gastrin for 72 hours then application of AMF (275 kHz, 40 mT) (E) or RMF (1 Hz, 30 mT) (F), 3 times (1h30) with an interval of 24 hours.

AMF or RMF actuation of MNPs induces the expression of DAMPs in pancreatic cancer cells and CAFs

As previously shown with Annexin V and propidium iodide markers, thermal or mechanical energy release by IONP upon AMF or RMF exposure induced apoptosis-related cell death (Figure 4). Apoptotic cells usually secrete or express at their plasma membrane damage-associated molecular motifs (DAMPs) such as calreticulin (CalR) or heat shock proteins (HSP70, HSP90), that act as danger signals to induce immunogenic cell death (ICD) and stimulate antitumoral immune response. To investigate whether AMF or RMF actuation of IOPNs acts as ICD inducer in PDAC, MiaPaca2-CCK2 and CAF-CCK2 were incubated with NF@Gastrin and exposed to AMF or RMF. Then, the expression of ICD-associated proteins – CalR, HSP70 and CD47 – at the cell surface was analyzed by flow cytometry (Figures 7 and S4). AMF exposure upregulated the expression of CalR and HSP70 at the surface of NF@Gastrin-loaded MiaPaca2-CCK2 and CAF-CCK2 cells (CalR: 5.8 ± 1.5 and 3.6 ± 0.6 , HSP70: 2.6 ± 0.6 and 2.6 ± 0.4 -fold increase respectively), compared to control cells (Figures 7A, B, E, F). Similarly, the expression of CalR and HSP70 increased upon RMF-actuation of NF@Gastrin in MiaPaca2-CCK2 and CAF-CCK2 cells (CalR: 2.1 ± 0.3 and 2.0 ± 0.1 , 1.5 ± 0.2 and 2.5 ± 0.6 -fold increase respectively), compared to control cells (figures 7C, D, G, H). AMF or RMF exposure as well as NF@Gastrin had no significant effect on the CalR and HSP70 expression at the surface on these pancreatic cells. In contrast, AMF or RMF did not affect the expression of CD47 “don’t eat me” signal at the surface of NF@Gastrin-loaded MiaPaca2-CCK2 and CAF-CCK2 cells (Figure S6). All together, these results indicated that the AMF or RMF actuation of internalized MNP enhanced the expression of CalR and HSP70 “eat me” signals at the surface of cancer cells as well as CAF from tumor microenvironment, making these cells recognizable by macrophages. The potential activation of ICD routes may be thus triggered by the thermal or mechanical energy release from IONP accumulated in the lysosomes of pancreatic cancer cells and CAF.

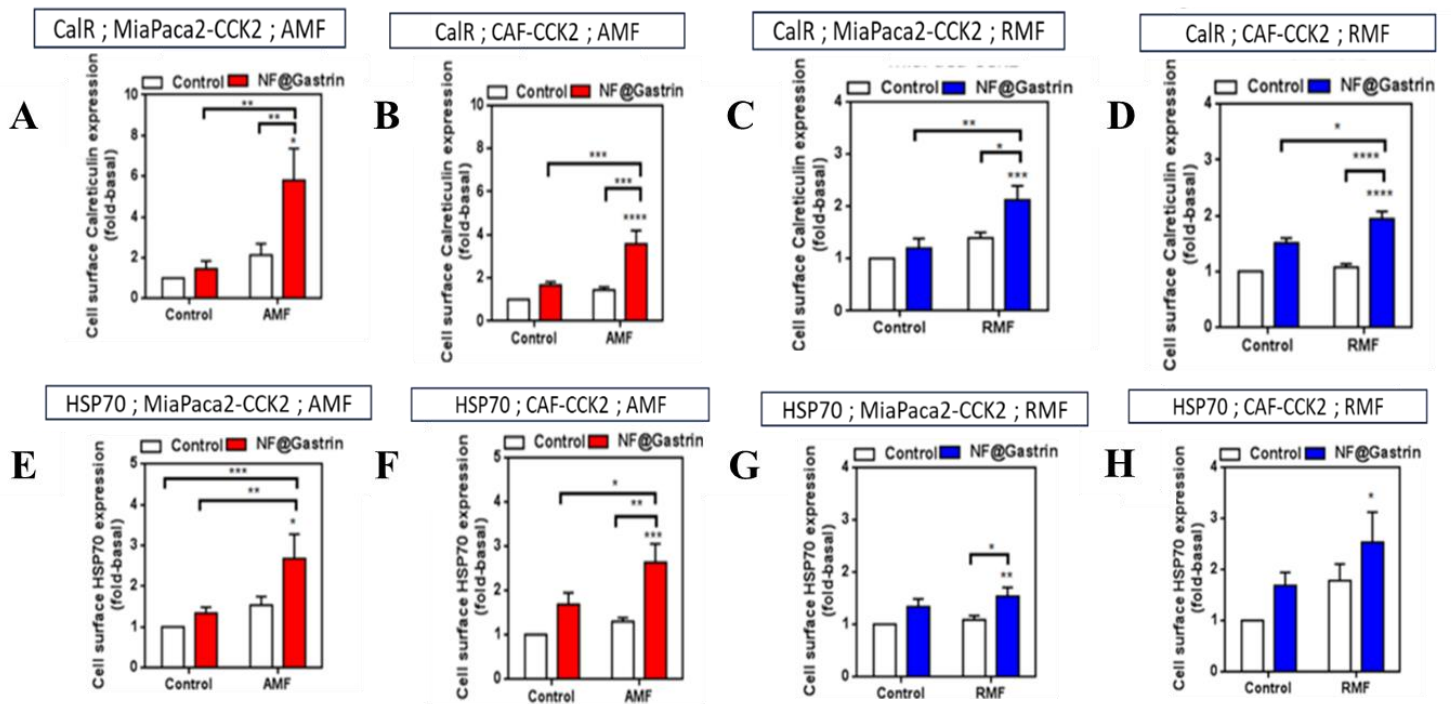


Figure 7: Analysis of the membrane expression of DAMP on the surface of MiaPaCa-2-CCK2 and CAF-CCK2 after magnetic hyperthermia or mechanical ablation. The MiaPaca2-CCK2 (A, C, E, G) or CAF-CCK2 (B, D, F, H) are incubated 72h with 16 μg $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{mL}$ of NF@Gastrin, then exposed or not to the magnetic field AMF (250 kHz, 20 mT) (A, B, E, F) or RMF (1 Hz, 40 mT) (C, D, G, H), 3 times (1h30) every 48 hours. The expression of calreticulin (A, B, C, D) or HSP70 (E, F, G, H) at the surface of the cells is analyzed by flow cytometry, using the antibody anti-CalR or anti-HSP70, coupled with FITC.

AMF or RMF actuation of IONPs increases the phagocytosis of pancreatic cancer cells and CAFs

We then investigated whether AMF or RMF actuation of IONPs increased the phagocytosis of MiaPaca2-CCK2 and CAF-CCK2 cells by THP-1 macrophages (Figure 8). The MiaPaCa2-CCK2 or CAF-CCK2 cells were incubated or not with NF@Gastrin, labelled with CytoTell™ UltraGreen, exposed or not to the AMF or RMF, then co-cultured with human THP-1 macrophages. The phagocytosis was analyzed by flow cytometry, by evaluating the % of macrophages (labeled by APC-coupled CD11b antibody) presenting CytoTell™ UltraGreen fluorescence (Figure 9). AMF exposure significantly increased the phagocytosis of NF@Gastrin-loaded MiaPaCa-2 CCK2 and CAF-CCK2 cells by 5.2 and 7.5-fold respectively (MiaPaCa-2-CCK2: $24 \pm 2.2\%$ vs control $4.6 \pm 1\%$; CAF-CCK2 $51.8 \pm 5.2\%$ vs control $6.9 \pm 0.3\%$). Similarly, RMF actuation of IONPs enhanced the phagocytosis NF@Gastrin-loaded

MiaPaCa-2-CCK2 and CAF-CCK2 cells by 4.8 and 6.3-fold respectively (MiaPaCa-2-CCK2: $22.3 \pm 3.3\%$ vs control cells $4.6 \pm 1\%$; CAF-CCK2: $43.3 \pm 2.2\%$ vs control $6.9 \pm 0.3\%$). AMF or RMF exposure did not induce the phagocytosis of unloaded cells. Of note, NF@Gastrin slightly increased the phagocytosis of cancer cells and CAF by 3.1 and 3.4-fold (MiaPaCa-2-CCK2: $14.1 \pm 1.4\%$; CAF-CCK2 $23.4 \pm 6.1\%$). Consistent with the previous increased expression of “eat me” DAMPs, the co-culture of THP-1 macrophages resulted in the enhancement of NF@gastrin-loaded cancer cells and CAF treated by AMF or RMF, indicating that both thermal and mechanical energy release from IONP accumulated in the lysosomes of these cells constituted new routes of ICD activation.

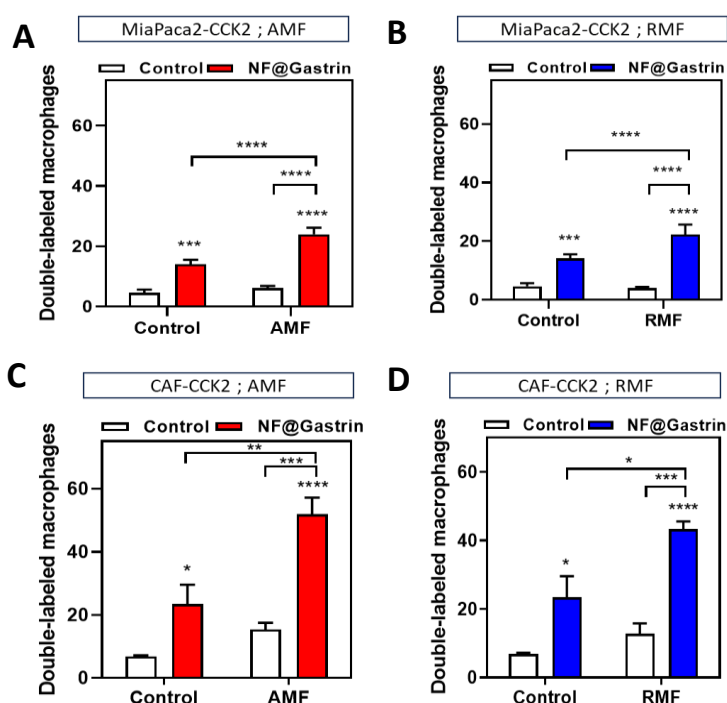


Figure 8: Increased phagocytosis of MiaPaCa-2-CCK2 and CAF-CCK2 by THP-1 macrophages treated by magnetic hyperthermia or mechanical ablation.

The MiaPaca2-CCK2 (A, B) or CAF-CCK2 (C, D) are incubated for 72h with $16 \mu\text{g } \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{ml}$ of NF@Gastrin, then expose or not to the AMF (250 kHz, 20 mT) (A, C) or RMF (1 Hz, 40 mT) (B, D) magnetic field, 3 times (1h30) with an interval of 24h between each exposure. After the last exposure the cells are labeled with CyToTell green and brought into contact for 2 hours with macrophages labeled with anti-Cd11b/APC, phagocytosis events are analyzed by flow cytometry.

DISCUSSION

Promising research about using magnetic nanoparticle in oncology lead to clinical trials on glioblastoma and prostate cancer which used iron oxide nanoparticle and high frequency magnetic field application in combination with radiotherapy to eradicate the tumors. Nevertheless, the results are quite disappointed, they do not increase life spend enough. The major problem is that these nanoparticles are not specific of tumoral tissues, and the intratumoral injection combined with AMF application induced a global increase of temperature that lead to side effects on adjacent healthy tissues.

Herein, we develop iron oxide nanoparticles decorated with gastrin molecule to allow a specific targeting of pancreatic cancer cells MiaPaca2-CCK2 and CAF-CCK2. First, we confirmed that this targeting is efficient to accumulate NF@Gastrin in the lysosomes of cells expressing the CCK2 receptor. Then, the application of the AMF field (250 kHz, 20 mT) or RMF (1 Hz, 40 mT) induced the death of cancer cells and CAF cells, reduced their cell survival without affecting cells devoid of nanoparticles as well as cells in absence of magnetic field application. Moreover, we showed that NF@gastrin induced cell death with higher efficacy when exposed to AMF than to RMF, indicating that nanoflowers magnetic properties wer more optimized to generate thermal then mechanical energy.

Moreover, we demonstrated that these two strategies, the magnetic hyperthermia and the magneto-mechanical destruction, enhanced the expression of DAMPs, CalR and HSP70, at the cell surface of pancreatic cancer cells but also pancreatic CAFs, and induced the phagocytosis of these cells by macrophages. HSP70 is an important endogenous molecule that maintains cellular integrity and physiological function under normal circumstances²⁹¹. HSP can bind with tumor antigens to form complexes, and these types of complexes could effectively activate APCs. CalR protein is normally located in cellular storage compartments, and is exposed on the outer side of the plasmatic membrane in the beginning of the ICD, before the translocation of the phosphatidyl serine typical of apoptosis²³³. When exposed on the cell membrane surface, CalR and HSP70 operate as potent pro-phagocytic or “eat me” signals upon binding to LDL receptor-related protein 1 (LRP1, also known as CD91) on the surface of immature antigen-presenting cells (APCs)²⁹². Moreover, externalized CalR has been shown to promote natural killer (NK) cell activation²⁹³. Afterward, the APCs migrate to the lymphatic organs, where the tumor antigens are presented to the T cells. Then, T cell-mediated immune responses are initiated to eradicate cancer cells²⁹⁴. By increasing the expression of DAMPs at the surface of the cancer cells and CAFs and the phagocytosis of these cells by macrophages, our results

strongly suggested that local magnetic hyperthermia as well as mechanical forces through AMF or RMF-induced IONPs actuation can trigger immunogenic cell death. These results are in agreement with a recent publication showing that IONP-induced MiaPaca2 spheroids and tumors heating up by AMF enhanced the CalR expression at the cell surface in association with an increase of MiaPaca2 cell death and a decrease in the tumor growth ¹⁴⁶. Similarly, mild magnetic hyperthermia (43°C) was shown to induce stress-associated signals, such as the increased expression of CalR and HS70 at the cancer cell surface, leading to enhanced phagocytosis and killing of glioblastoma cancer cells U87 by macrophages ¹⁴⁵. Other hyperthermia-based therapies including photothermal therapy (PTT) were also shown to induce ICD ²⁹⁴. Comparatively to these studies, we demonstrated here, for the first time, that local thermal or mechanical stresses through IONPs actuation upon AMF or RMF exposure can activate immunogenic cell death routes leading to trigger or restore antitumoral immune response, in absence of detectable temperature rise ^{24,120}. Stimulating the immune system with local release of thermal or mechanical energy by MNPs upon AMF or RMF exposure may present important advantages, combining the direct effect MNPs actuation on targeted cancer cells and CAFs with a antitumor immune response that could increase the therapeutic efficacy (i.e. decrease tumor progression or induce tumor regression) but also act on metastasis ²⁹⁵. Furthermore, activation of the immune response would also trigger an immune memory effect that could prevent patients from relapses ²⁹⁶.

DAMPs can be secreted by dying cells or expressed at their cell surface, bind to pattern recognition receptors on antigen-presenting cells such as dendritic cells and macrophages, leading to the activation of both innate and adaptive immune responses ²²⁹. To go further in this study, it would be interesting to analyze other DAMPs known to be involved in the activation of anti-tumoral immune response, such as ATP or HMGB1 that can be secreted by apoptotic cancer cells and serve as a “find me” signal for recruiting antigen presenting cells ^{297,298}. Moreover, the increased DAMPs expression by cancer cells and CAFs and their phagocytosis by macrophages, induced by AMF or RMF actuation of MNPs, should prime the cytotoxic T lymphocyte-dependent immune response against cancer cells. Interestingly, magnetic hyperthermia (global or local) was shown to act in synergy with chemotherapy ^{299,128}. In addition, few chemotherapeutic drugs, such as oxaliplatin ³⁰⁰, used in clinics to treat PDAC patients were shown to induce immunogenic cell death ^{228,227}. Thus, local magnetic hyperthermia or magneto-mechanical destruction in association or not with chemotherapy can offer new opportunities to restore antitumoral immune response in PDAC.

SUPPLEMENTARY DATA

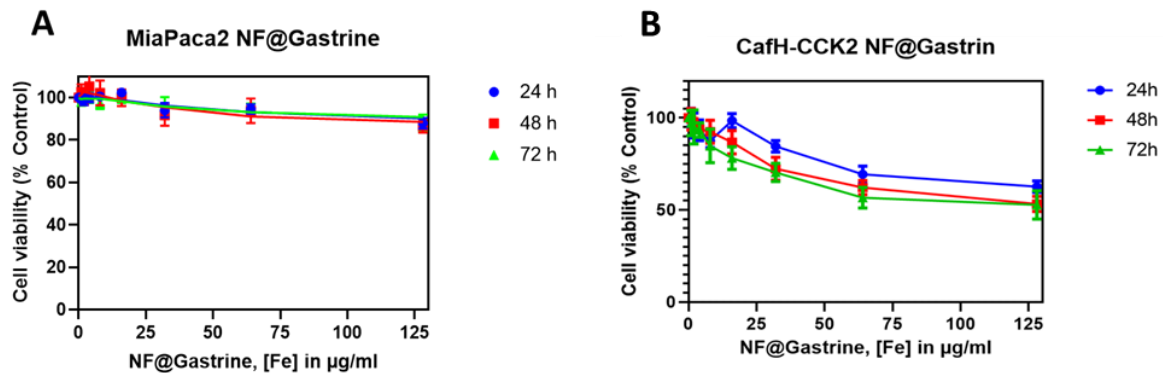


Figure S1: Analysis of NF@Gastrin cytotoxicity.

MiaPaca2 (A) or CAF (B) cells were incubated with increasing concentrations of NF@Gastrin (1 to 128 γ -Fe₂O₃µg/mL) for 24, 48 or 72 hours in complete medium. Cell viability was analyzed by MTT assay. Results are expressed as mean \pm SEM of at least three independent experiments.

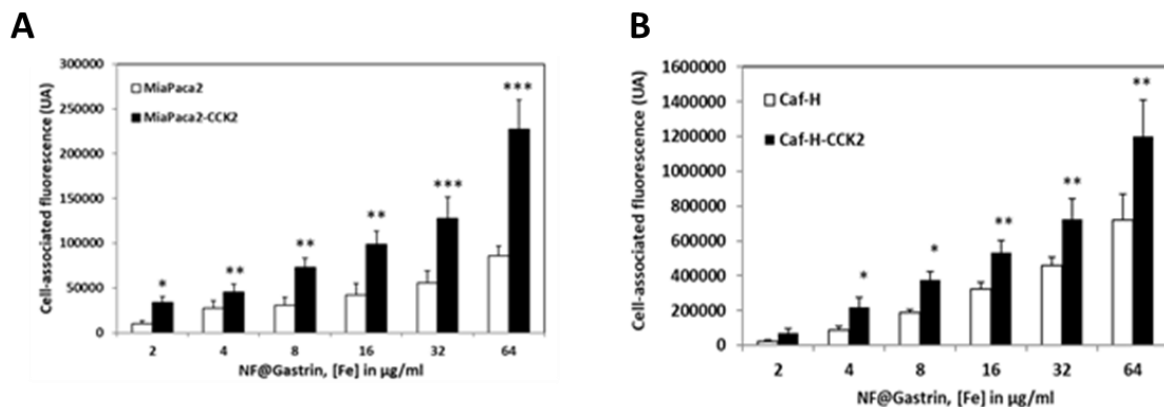


Figure S2: Specific binding of NF@Gastrin on cancer cells and CAF expressing CCK2 receptor.

Specificity of binding with increase doses of NF@Gastrin (2 to 64 γ -Fe₂O₃µg/mL) on MiaPaca2-CCK2 (in black) compare to MiaPaca2 (in white) (A) or CAF-CCK2 (in black) compare to CAF (in white) (B), incubated 24h with NF@Gastrin. Each value represents the mean \pm SEM.

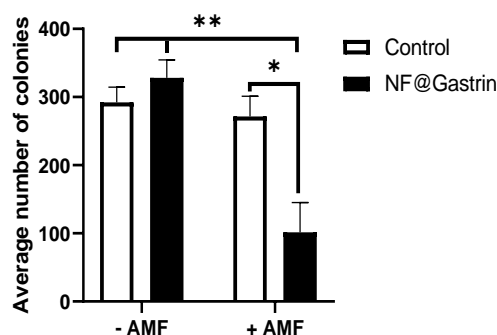


Figure S3: Analysis of AMF or RMF actuation of MNPs on colony formation.

MiaPaca2-CCK2 cells were incubated or not with 16 μ g γ -Fe₂O₃/mL of NF@Gastrin during 72h, then exposed or not to AMF (250 kHz, 20 mT) (A) or RMF (1 Hz, 40 mT) (B) 3 times (1h30) with 48 hours of interval. Colonies formed were counted one week after the last magnetic field exposure.

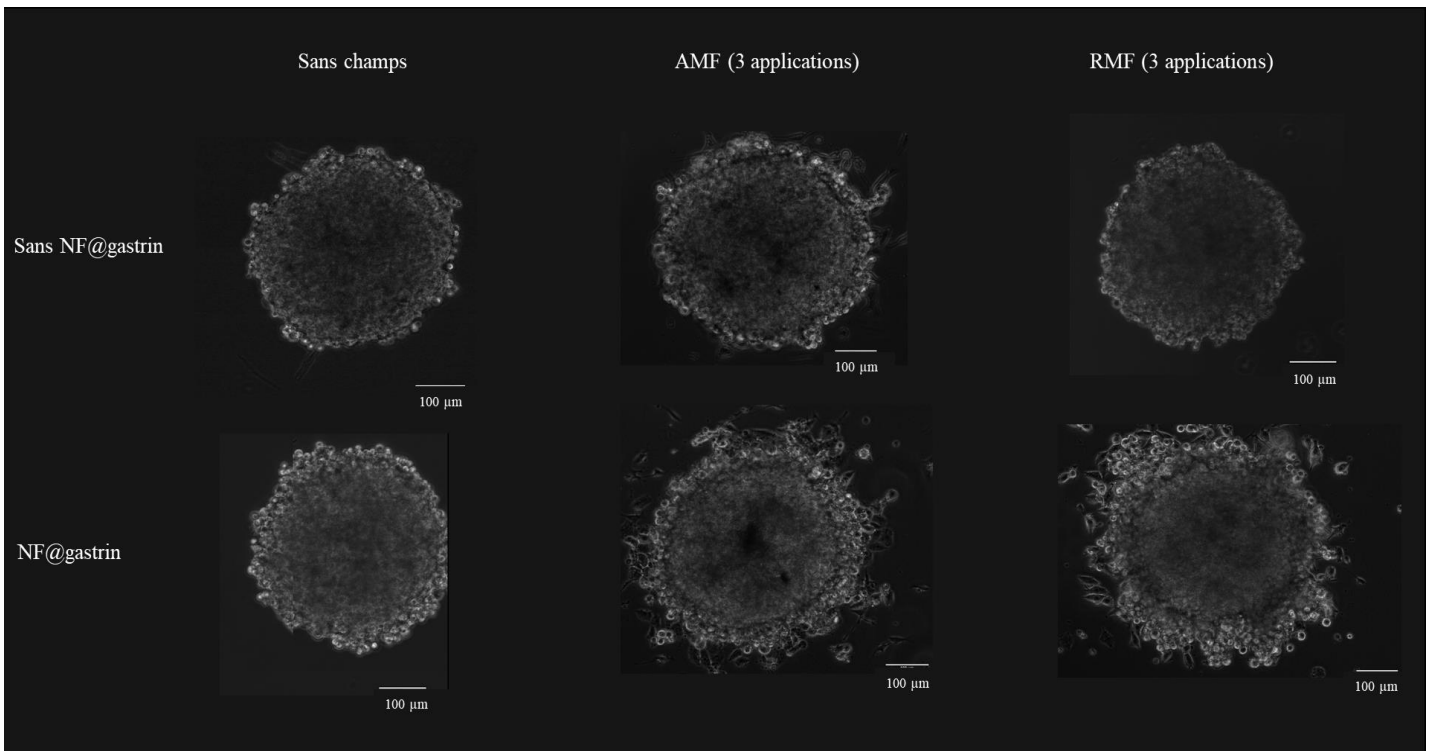
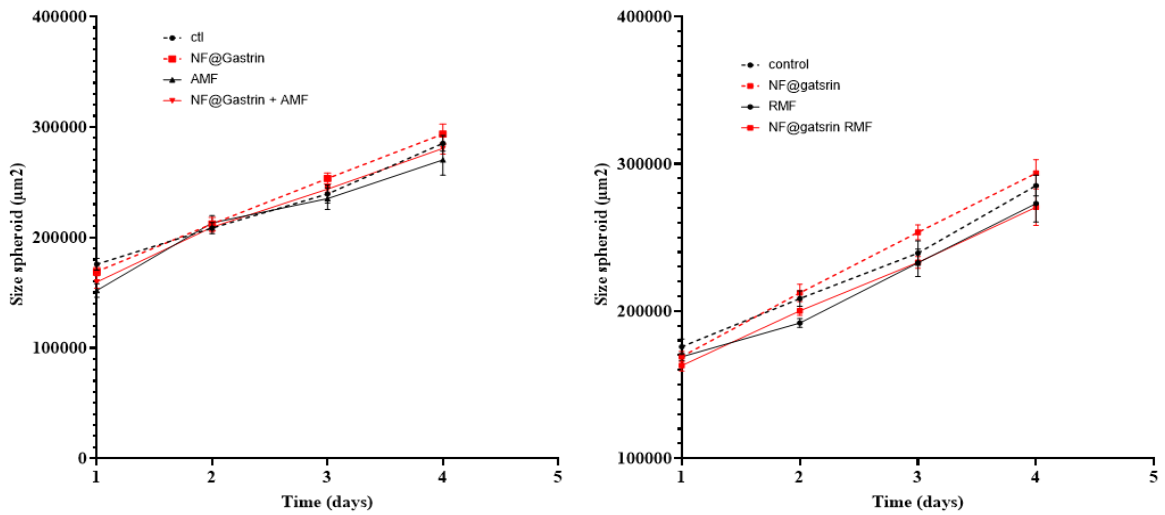


Figure S4: Size and morphology of spheroids submitted to magnetic hyperthermia or mechanical ablation treatment.

Spheroids are incubated 72h with $32\mu\text{g } \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{mL}$ of NF@gastrin and submitted or not to AMF (250 kHz, 20 mT) or RMF (1 Hz, 40 mT), 1h30, 3 times and scanned every day by videomicroscope.

Representative images of all spheroids at before field application (first column) and after 3 AMF (second column) or 3 RMF applications (third column).

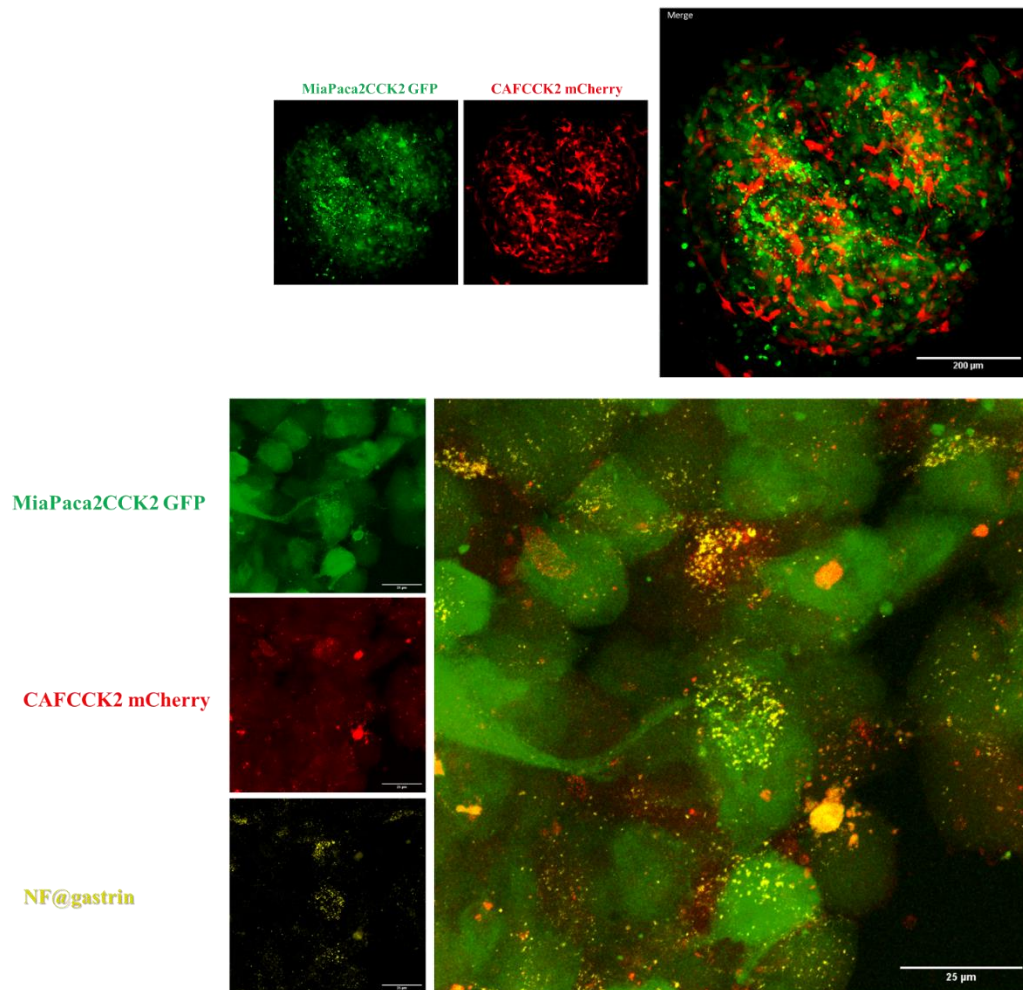


Figure S5: Cellular localization of NF@Gastrin on 3D-heterospheroid model MiaPaca2-CCK2 – CAFCCCK2. 3D-heterospheroid model MiaPaca2-CCK2 – CAFCCCK2 are incubated with 32 $\mu\text{g/mL}$ of $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ for 72h. Then, spheroids are transparitized and NF@Gastrin cellular repartition is analyzed by confocal microscopy.

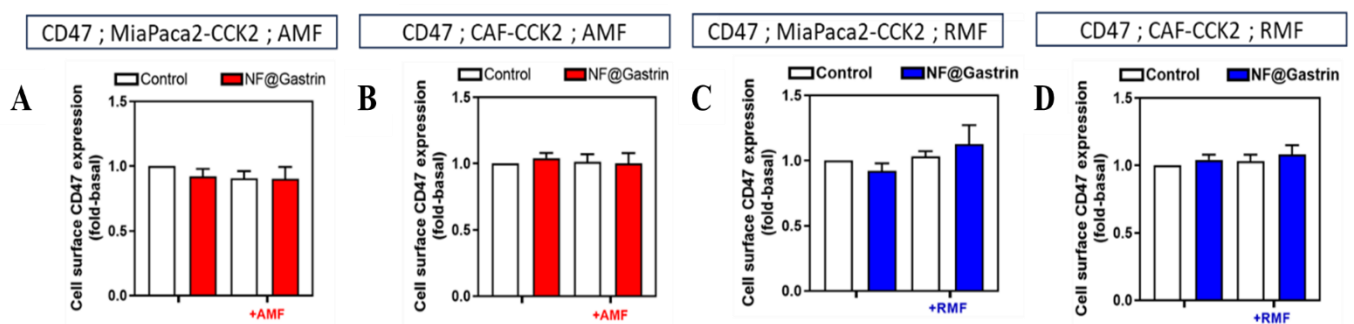


Figure S6: Analysis of the membrane expression of CD47 on the surface of MiaPaCa-2-CCK2 and CAF-CCK2 after magnetic hyperthermia or mechanical ablation. The MiaPaca2-CCK2 (A, C) or CAF-CCK2 (B, D) are incubated 72h with 16 μg $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{mL}$ of NF@Gastrin, then exposed or not to the magnetic field AMF (250 kHz, 20 mT) (A, B) or RMF (1 Hz, 40 mT) (C, D), 3 times (1h30) every 48h. The expression of CD47 at the surface of the cells is analyzed by flow cytometry, using the antibody anti-CD47 coupled with FITC.

PARTIE III :

IMPACT DE L'HYPERTHERMIE MAGNETIQUE ET DE L'ABLATION MAGNETO-MECANIQUE SUR LE PHENOTYPE DES CAF

Introduction

Le cancer du pancréas est un cancer de très mauvais pronostic puisque le taux de survie à 5 ans est inférieur à 10% ¹⁴⁸, plus de 220 000 décès chaque année dans le monde. Malgré les progrès de la recherche en oncologie, son incidence continue d'augmenter et il est prédit pour être la deuxième cause de décès par cancer d'ici quelques années. L'adénocarcinome pancréatique (PDAC) est particulièrement résistant aux thérapies conventionnelles et caractérisé par la présence d'un microenvironnement large, dense et peut représenter jusqu'à 80% de la masse tumorale. De plus, il est maintenant largement admis que le pronostic de survie d'un patient atteint de cancer dépend en grande partie du microenvironnement tumoral, des populations cellulaires qui le compose, des composants de la matrice extracellulaire, *etc.* En effet, le microenvironnement tumoral est impliqué dans les phénomènes de résistance aux traitements, les processus métastatiques et l'inhibition de réponse immunitaire anti-tumorale, tout ceci favorisant la progression tumorale ³⁰¹⁻³⁰³. Les fibroblastes associés au cancer (CAF), composant majoritaire du microenvironnement cancéreux, jouent un rôle clef. Ces cellules peuvent favoriser la prolifération et la progression tumorale, ²⁸², former une barrière physique ²⁸³ et donc limiter la pénétration de molécules thérapeutiques et l'infiltration de cellules immunitaires ²⁸⁴. De nombreux travaux de recherche ont donc eu pour objectif le ciblage des CAF afin d'améliorer les traitements antitumoraux et certains résultats plutôt prometteurs ont conduit à un essai clinique (toujours en cours) utilisant le minnélide™ (régulant négativement la voie du TGF- β des CAF). Néanmoins, d'autres études montrant une progression tumorale et une dissémination métastatique supérieure puis une espérance de vie inférieure, en cas de suppression des CAF ¹⁹⁰ ont conduit à devoir nuancer le fait de cibler les CAF (cf partie II.3.a - Les CAF – Ciblage thérapeutique des CAF).

Les CAF sont des cellules qui peuvent être divisées en différentes sous-populations avec chacune des caractéristiques et des rôles différents. Dans le PDAC, les myCAF (CAF myofibroblastiques) sont à proximité directe des cellules cancéreuses et ont une expression élevée de α -SMA, les iCAF (CAF inflammatoire) sont plus éloignées et sécrètent des facteurs pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, IL-11, LIF) et les apCAF (CAF présentatrice d'antigène) expriment le CMH-II ³⁰⁴. Cette catégorisation n'est pas figée et le phénotype des CAF peut évoluer en fonction des conditions et des signaux environnementaux.

A l'heure actuelle, les stratégies développées en recherche ont pour objectif de cibler certain(s) phénotype(s) de CAF ou d'induire un changement de phénotype (d'un phénotype pro-tumoral vers un phénotype antitumoral).

Ici, nous avons voulu évaluer deux stratégies innovantes : l'hyperthermie magnétique intra-lysosomale et l'ablation magnéto-mécanique intra-lysosomale, sur l'induction de changements de propriétés et de phénotypes des CAF. Ces deux stratégies reposent sur l'utilisation de nanoparticules d'oxyde de fer (IONP), capables de s'accumuler dans les lysosomes des cellules-cibles et de les traiter par hyperthermie magnétique ciblée *via* l'application d'un champ magnétique alternatif haute fréquence externe (AMF) ou par ablation mécanique ciblée *via* l'application d'un champ magnétique rotatif basse fréquence (RMF). Les CAF pancréatiques peuvent surexprimer le récepteur CCK2 (récepteur membranaire qui s'internalise après fixation de son agoniste spécifique : la gastrine). Nous avons développé des IONP à haut pouvoir thermique, appelées "NanoFleurs" (NF), décorées de molécules de fluorophore et de gastrine (NF@Gastrin) permettant respectivement leur détection et leur accumulation dans les lysosomes des CAF. Nous avons ensuite étudié l'impact de l'hyperthermie magnétique ou de l'ablation magnéto-mécanique sur le pouvoir migratoire des CAF et leur capacité de sécrétion de protéines de la matrice extracellulaire tel que le collagène.

Matériels et méthodes

Culture cellulaire

Des fibroblastes associés au cancer (CAF) ont été transfectés de manière permanente avec le récepteur CCK2 humain (CCK2R) en utilisant l'ADNc codant du récepteur CCK2 sous-cloné dans le vecteur pcDNA3 (BD Biosciences Clontech) et la Lipofectamine 2000 (Invitrogen), puis sélectionnés avec 400 µg/ml de généticine (Sigma-Aldrich) et sont appelés CAF-CCK2. Les CAF-CCK2 sont cultivées dans un milieu DMEM-F12 complet contenant 10 % de FBS, 100 UI/ml de pénicilline/streptomycine (pénicilline-streptomycine P4333 ; Sigma-Aldrich) dans une atmosphère humidifiée à 95 % d'air et 5 % de CO₂ à 37°C.

Analyse de la migration

50 000 cellules / compartiment sontensemencées 24h sur des boîtes Cellview à quatre compartiments (Greiner Bio-One), cultivées pendant la nuit et incubées avec NF@ Gastrin ($[\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3] = 16 \mu\text{g/mL}$) pendant 72h à 37°C dans un milieu DMEM-F12 complet pour permettre l'internalisation et l'accumulation des nanoparticules dans les lysosomes. Une blessure est réalisée à la main avec une pointe de P1000 dans chaque puits, puis est scannée au videomicroscope. Les cellules sont ensuite rincées avec du milieu complet, puis exposées ou non à l'AMF (250 kHz, 20 mT) ou au RMF (1 Hz, 40 mT) pendant 2h. La température du milieu d'incubation est strictement maintenue à 37 °C et contrôlée à l'aide d'une sonde thermique (Reflex, Neoptix, Québec, QC, Canada) placée dans le milieu d'incubation. À la fin des expériences, les cellules sont placées dans une atmosphère humidifiée à 5 % de CO₂ à 37 °C. Ensuite, un scan est effectué toutes les 6 heures pour suivre la fermeture de la blessure.

Analyse de la sécrétion de collagène I

100 000 cellules / compartiment sontensemencées dans des boîtes Cellview à quatre compartiments (Greiner Bio-One), incubées avec NF@ Gastrin ($[\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3] = 16 \mu\text{g/mL}$) pendant 72h pour permettre l'internalisation et l'accumulation de ces nanoparticules dans les lysosomes, (37°C dans un milieu DMEM-F12 et 10% de SVF). Puis les cellules sont rincées et exposées au champ AMF ou RMF, 1h30 toutes les 24h, 3 fois. Le lendemain du dernier champ, les cellules sont rincées au PBS, fixées avec de la paraformaldéhyde 4% pendant 10 minutes et perméabilisées avec du Triton-X100 à 0,05% pendant 10 minutes. Les cellules sont ensuite incubées avec du Protéine Block Serum Free Agilent Dako pendant 10 minutes, puis avec l'anticorps anti-collagène 1 (1/1500, INVITROGEN PA1-26204) à 4°C pendant 18h. Après plusieurs lavages au PBS, les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire couplé au Cy3 (111-165-144 Jackson ImmunoResearch, 1/100) pendant 3h à température ambiante. Après rinçages au PBS, les cellules sont recouvertes de Fluorescent Mounting Medium (Dako) et d'une lamelle. La fluorescence associée au collagène 1 est visualisée au microscopie confocal LSM780 (Zeiss), puis les images sont analysées et quantifiées grâce au logiciel ImageJ.

Résultats

Dans un premier temps, nous avons voulu étudier l'impact de l'hyperthermie magnétique ou de l'ablation mécanique sur la capacité des CAF à migrer. Pour cela, les CAF-CCK2 sont traités ou non avec 16 μg $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{mL}$ de NF@Gastrin pendant 72h. Une blessure est pratiquée avec une pointe de tip1000 et les cellules sont lavées avec du milieu complet. Ensuite, le champ AMF ou RMF est appliqué pendant 2h et la fermeture de la blessure est observée par vidéomicroscopie directement après le champ et toutes les 6 heures comparativement à l'image prise juste avant l'application du champ magnétique. Le pourcentage de fermeture augmente dans toutes les conditions, les CAF-CCK2 migrent donc pour combler la blessure. Nous pouvons observer que la fermeture, donc la migration, est ralentie pour les cellules incubées avec les nanoparticules NF@Gastrin et exposées au champ AMF : $31,2 \pm 28,8 \%$ contre $86,0 \pm 8,1 \%$ de fermeture dans pour les cellules sans nanoparticules et sans exposition au champ (Figure 9C). L'incubation avec les NF@Gastrin seule ($77,5 \pm 16,8 \%$) ainsi que l'exposition au champ AMF seul ($73,5 \pm 19,6 \%$) n'impactent pas la vitesse de fermeture. L'hyperthermie magnétique ralentit donc la migration des cellules CAF-CCK2. Le même résultat a été obtenu pour les CAF-CCK2 traités par ablation magnéto-mécanique. Dans la condition où les cellules sont incubées avec NF@Gastrin et exposées au champ RMF, la fermeture de la blessure est de $16,1 \pm 8,5 \%$ par rapport à $46,9 \pm 8,8 \%$ en condition témoin (sans NF@Gastrin et sans champ). Comme pour l'hyperthermie magnétique, les cellules avec NF@gastrine seule ($50,0 \pm 15,6 \%$) ou avec champ RMF seul ($34,6 \pm 5,5 \%$) n'ont aucune différence sur le pourcentage de migration cellulaire par rapport à la condition contrôle. Nous pouvons noter une différence entre le pourcentage de fermeture pour la condition contrôle et la condition avec NF@Gastrin, entre les figure 1A et 1B. Ces différences pourraient s'expliquer par le fait que les expériences n'ont pas été réalisées en même temps, ni avec le même lot de NF@Gastrin, ce qui pourrait affecter la capacité de migration des CAF-CCK2. Mais cela n'impacte pas l'interprétation de nos résultats, montrant que la libération d'énergie thermique ou de forces mécaniques par les nanoparticules exposées au champ AMF ou RMF respectivement inhibe la migration des CAF.

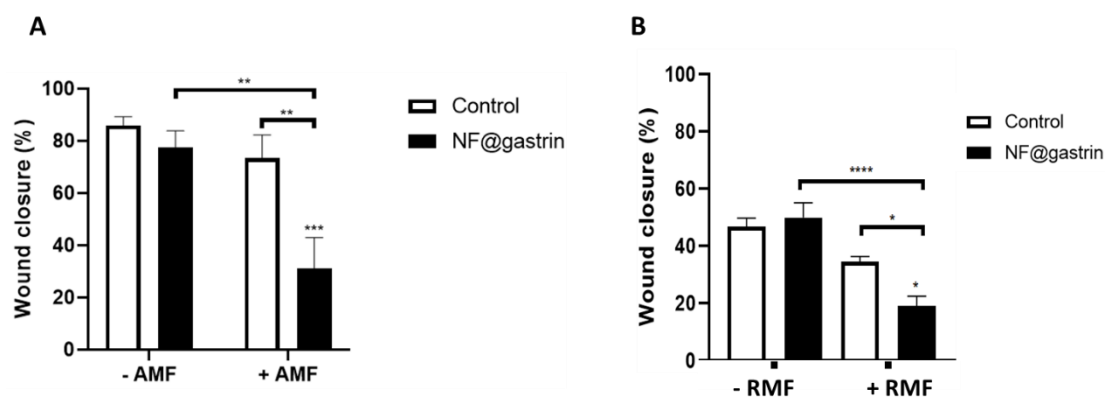


Figure 1 : Migration des CAF sous hyperthermie magnétique ou ablation mécanique.

La capacité de migration des CAF-CCK2 incubés ou non avec $16 \mu\text{g } \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{mL}$ de NF@Gastrin pendant 72h puis exposés ou non à l'AMF (A) ou au RMF (B), est évaluée par analyse de la vitesse de fermeture de la blessure, pendant 24h suivant la blessure. La fermeture de la blessure est suivie par vidéomicroscopie.

Les CAF participent et favorisent le développement tumoral. Ils sont les principaux acteurs de la synthèse et du remodelage de matrice extracellulaire et du stroma tumoral^{170,171} et notamment de la sécrétion de collagène. Nous avons donc étudié l'effet de nos stratégies sur la production de collagène 1 par les CAF. Pour cela, après incubation des cellules avec $16 \mu\text{g } \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{mL}$ de NF@Gastrin pendant 72h, l'AMF ou le RMF est appliqué 3 fois pendant 1h30 avec un intervalle de 24h (figure 2). Puis un protocole d'immunocytochimie est réalisé afin de révéler la quantité relative de collagène 1 sous microscope confocal grâce à la fluorescence associée. Nous observons alors une diminution de la quantité de collagène sécrétée par les CAF traitée par hyperthermie magnétique ou ablation magnéto-mécanique, respectivement, et correspondant à $0,35 \pm 0,10$ ou $0,42 \pm 0,06$ fois la quantité de collagène 1 observé dans la condition contrôle sans nanoparticule et sans exposition au champ. Le traitement avec NF@Gastrin uniquement ainsi que l'application de l'AMF ou du RMF seule n'ont pas d'effet sur la production de collagène 1, respectivement : $0,88 \pm 0,14$; $0,79 \pm 0,20$; $0,85 \pm 0,10$ fois la condition contrôle.

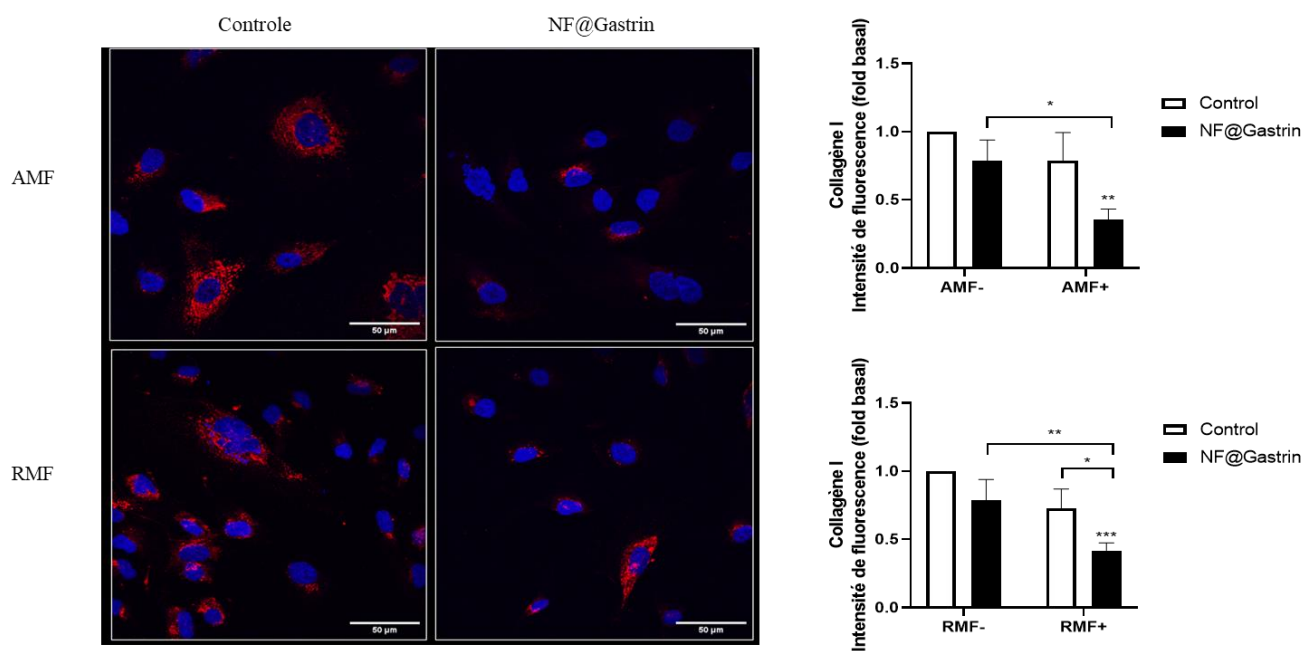


Figure 2 : Effet de l'hyperthermie magnétique ou de l'ablation mécanique sur la production de collagène 1 par les CAF.

La sécrétion de collagène 1 par les CAF-CCK2 incubés ou non avec $16 \mu\text{g } \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{mL}$ de NF@Gastrin pendant 72h puis exposés ou non à 3 fois l'AMF (A) ou au RMF (B) avec 24h d'intervalle, est évaluée par immunocytochimie avec un anticorps primaire anti-collagène 1 et un anticorps secondaire couplé au Cy3 (rouge), et un marquage du noyau au Hoescht 33342 (bleu). La visualisation est faite par microscopie confocale.

Discussion

L'objectif de cette étude était d'analyser les effets "indirects" de l'hyperthermie magnétique et de l'ablation mécanique intra-lysosomales et notamment leurs impacts sur le phénotype des CAF. En effet, il est maintenant admis que les CAF présentent des phénotypes différents avec des effets pro-tumoraux mais que leur déplétion totale favorise la progression tumorale (cf introduction générale, chapitre 2, II.3.a - Les CAF). Le but de la recherche est donc de développer des méthodes permettant la reprogrammation des CAF afin de favoriser les phénotypes anti-tumoraux au détriment des phénotypes pro-tumoraux.

Il a été montré que les CAF, par leur sécrétion de fibronectine, s'associent avec les cellules cancéreuses et leur servent de "guide" pour induire une migration directionnelle de ces cellules et donc une potentielle dissémination³⁰⁵. Leur migration à elle seule, favorise également le développement de métastases à distance de la tumeur primaire *in vivo*³⁰⁶. Inhiber cette propriété

migratoire des CAF permet de limiter la dissémination des cellules cancéreuses et la formation de métastases ³⁰⁶. Ici, nous avons donc mis en évidence deux stratégies ciblées permettant de ralentir la migration des CAF : l'hyperthermie magnétique et l'ablation magnéto-mécanique intra-lysosomales. Des études *in vivo* seront nécessaires pour confirmer que cette diminution de la capacité migratoire des CAF permet, *in fine*, une diminution de la dissémination métastatique.

D'autre part, les CAF sont connus comme étant les principales cellules productrices de matrice extra-cellulaire dans le PDAC et notamment de collagène 1. La délétion du collagène 1 dans les myCAF, implique une diminution de la "coque" rigide limitant la progression tumorale, a été montrée comme étant délétère et favorisant le développement tumoral ³⁰⁷. Néanmoins, malgré un rôle qui semble plutôt anti-tumoral lors de la tumorigénèse, des études ont mis en évidence son impact négatif (augmentation du processus métastatique, mauvais pronostic) lorsqu'il est retrouvé en grande quantité au niveau du site tumoral ^{308,309}. Réduire la production de collagène par les CAF semble donc une approche pertinente. Nous montrons dans cette étude une diminution de la production de collagène 1 par les CAF traitées par hyperthermie magnétique ou ablation magnéto-mécanique intra-lysosomale. Il serait maintenant intéressant d'étudier l'impact de cette diminution sur la progression tumorale *in vivo*.

Ici, nous avons exploré d'autres impacts des deux stratégies ciblées : l'hyperthermie magnétique et l'ablation magnéto-mécanique intra-lysosomales. Nous avons alors mis en évidence que les effets thérapeutiques de ces stratégies peuvent également s'évaluer de façon plus globale. En effet, en plus de l'augmentation de la mortalité cellulaire et de la stimulation de la mort immunogénique (cf résultats, partie II), nous montrons ici que le ciblage des CAF permet un changement phénotypique de ces cellules : diminution de leur capacité à migrer et de leur production de collagène 1. Par la suite, il sera intéressant d'étudier si ces changements peuvent potentialiser le pouvoir thérapeutique de l'hyperthermie magnétique et de l'ablation magnéto-mécanique intra-lysosomales pour limiter la progression et l'invasion tumorale.

*Conclusion
générale et
perspectives*

L'hyperthermie magnétique et l'ablation magnéto-mécanique se basent sur l'utilisation de nanoparticules d'oxyde de fer capables de reconnaître spécifiquement des cellules cibles et donc de traiter spécifiquement les tissus cancéreux par hyperthermie magnétique *via* l'application d'un champ magnétique alternatif à haute fréquence (AMF) ou par ablation magnéto-mécanique *via* l'application de champ magnétique rotatif à basse fréquence (RMF), tout en minimisant les dommages sur le tissu sain.

Nous avons choisi l'adénocarcinome pancréatique pour établir la preuve de concept de ces stratégies car il s'agit d'un cancer à très mauvais pronostic : diagnostic tardif, mise en place de résistances aux traitements de la part des cellules cancéreuses, stroma dense rendant l'infiltration des molécules thérapeutiques et des cellules immunitaires difficile, absence de thérapie ciblée, *etc.*

Pour cela, nous avons développé des nanoparticules d'oxyde de fer multicoeur, vectorisées par la gastrine, ligand spécifique du récepteur CCK2 pouvant être surexprimé par les cellules cancéreuses du pancréas et les fibroblastes associés au cancer (CAF) et ayant la propriété de s'internaliser dans ces cellules et de s'accumuler dans leurs lysosomes après fixation de l'agoniste, gastrine, au récepteur CCK2. L'impact de l'application de champ magnétique AMF (250 kHz, 20 mT) ou RMF (1 Hz, 40 mT) sur les cellules cancéreuses MiaPaca2-CCK2 ou les cellules CAF-CCK2 ayant accumulées des nanoparticules magnétiques ont ensuite été étudiés.

Les objectifs principaux de ma thèse étaient :

- comprendre l'origine du fer impliqué dans la production de ROS induisant la mort des cellules cancéreuses par hyperthermie magnétique intra-lysosomale,
- étudier la capacité de l'hyperthermie magnétique et de l'ablation mécanique intra-lysosomales à stimuler une réponse immunitaire anti-tumorale ou mort cellulaire immunogène.

Partie 1 : Comprendre le mécanisme à l'origine de la mort des cellules par hyperthermie magnétique intra-lysosomale.

L'hypothèse était que l'hyperthermie magnétique intra-lysosomale induirait un relargage de fer provenant des nanoparticules exposées au champ magnétique ; ce fer ainsi libéré catalyserait la production de ROS (espèces réactives de l'oxygène) dans les lysosomes qui, après peroxydation des protéines et lipides de la membrane lysosomale, induirait la perméabilisation des lysosomes, entraînant la mort des cellules par voie de mort lysosomale.

Nos résultats montrent que les nanoparticules induisent effectivement la perméabilisation des lysosomes après application du champ magnétique qui s'accompagne d'une augmentation de la production de ROS ainsi qu'une élévation de la température (43-44°C) à la surface des nanoparticules magnétiques. Nous avons alors voulu connaître l'origine du fer impliqué dans l'induction de mort des cellules soumises au champ magnétique. Pour cela, nous avons développé des nanoparticules identiques aux précédentes et recouvertes d'une coque de silice empêchant le relargage de fer par les nanoparticules d'oxyde de fer exposées au champ magnétique. Nous avons démontré que les nanoparticules avec la coque de silice donc ne relarguant pas d'ions fer après application du champ AMF, sont aussi efficaces que les nanoparticules non recouvertes de silice pour induire la production de ROS, la perméabilisation de la membrane lysosomale et la mort des cellules cancéreuses. Nous avons alors poursuivi notre étude en utilisant un inhibiteur de l'internalisation de fer par la cellule, la ferristatin-II. Nos résultats montrent que la ferristatin-II inhibe la production de ROS et empêche l'induction de mortalité cellulaire par l'hyperthermie magnétique. Nous mettons donc en évidence la nécessité de la présence de fer endogène à la cellule pour induire la production de ROS et la mortalité cellulaire par hyperthermie magnétique intra-lysosomale.

Le premier objectif de ma thèse était de comprendre l'origine du fer impliqué dans la mort par hyperthermie magnétique intra-lysosomale. Nous avons alors prouvé que les nanoparticules d'oxyde de fer soumises au champ magnétique alternatif de haute fréquence, en chauffant, agissent en tant que catalyseur de la réaction de Fenton qui produit alors des ROS en utilisant le pool de fer endogène de la cellule.

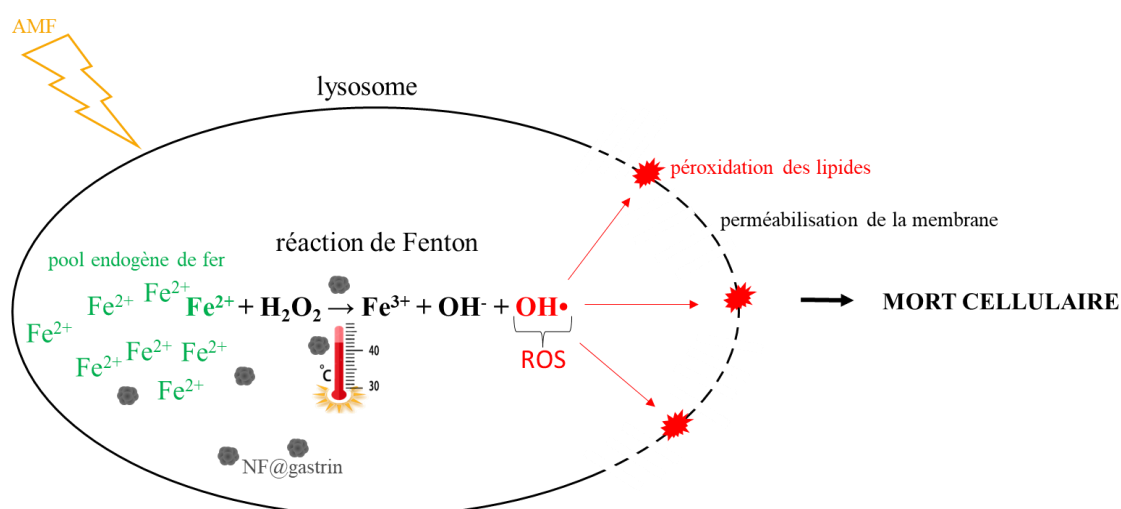


Figure 1 : Représentation schématique de la mort par hyperthermie magnétique intra-lysosomale.

Partie 2 : Etudier l'hyperthermie magnétique et l'ablation magnéto-mécanique intra-lysosomales ciblées, pour le traitement du cancer du pancréas

Après avoir confirmé que la vectorisation par la gastrine permet une internalisation et une accumulation spécifique dans les cellules cancéreuses du pancréas MiaPaca2-CCK2 et CAF-CCK2, nous avons étudié les effets de ces stratégies en tant que thérapies anti-cancéreuses. Nous avons alors constaté une augmentation de la mortalité et une inhibition de la prolifération des cellules incubées avec les nanoparticules et exposées au champ magnétique AMF ou RMF, sans affecter les cellules dépourvues en nanoparticules ou non soumises au champ. De plus, nous avons montré le potentiel de l'hyperthermie magnétique à stimuler une réponse immunitaire anti-tumorale par augmentation de l'expression de DAMP, ce qui est en accord avec les résultats de Beola et ses collaborateurs qui avait mis en évidence une augmentation de l'expression de la calréticuline *in vivo*, sur des modèles de souris avec xénogreffe de MiaPaca2, soumises à l'hyperthermie magnétique, corrélée à une régression tumorale supérieure ¹⁴⁶. L'augmentation de DAMP est corrélée à une stimulation de la phagocytose par les macrophages, déjà mise en évidence sur une lignée de glioblastome ¹⁴⁵ et donc potentiellement à la stimulation de la réponse immunitaire anti-tumorale par les cellules cancéreuses mourantes. De plus, à notre connaissance, il s'agit de la première fois que l'expression de DAMP et la stimulation de la phagocytose par les macrophages sont mises en évidence pour les CAF, ce qui ouvre la voie à l'amélioration de la stratégie thérapeutique en élargissant les populations cellulaires ciblées. D'autre part, pour la première fois, nous avons également mis en évidence que l'ablation magnéto-mécanique ciblée peut, elle aussi, augmenter l'expression de DAMP, comme la calréticuline et HSP70, également corrélées à l'augmentation de la phagocytose des cellules cancéreuses et des CAF par les macrophages. Des études complémentaires seront nécessaires afin de confirmer que ces effets vont ensuite conduire à l'activation d'une réponse immunitaire anti-tumorale, en analysant notamment l'activation des lymphocytes T et ainsi agir en synergie avec les effets directs de l'hyperthermie magnétique et l'ablation magnéto-mécanique sur la mortalité des cellules tumorales et des CAF.

Nous avons donc mis en évidence que les effets de l'hyperthermie magnétique et de l'ablation mécanique ciblée ne s'arrêtent pas seulement à l'induction de mortalité cellulaire. Grâce à l'exploration des acteurs immunitaires, nous avons pu démontrer que ces stratégies pourraient également permettre une stimulation de la mort cellulaire immunogène.

Nous pouvons alors nous demander si l'implication de l'immunité dans le traitement par hyperthermie magnétique et ablation mécanique pourrait permettre de sensibiliser de la tumeur à l'immunothérapie et ainsi obtenir des effets synergiques pour une éradication plus efficace des tumeurs.

Partie 3 : Impact de l'hyperthermie magnétique et de l'ablation mécanique sur le phénotype des CAF

Le microenvironnement du PDAC est un acteur majeur de la tumorigénèse et de la progression tumorale. Parmi les composants de ce microenvironnement, les CAF ont un rôle déterminant. Néanmoins, il a été montré qu'un ciblage et donc une déplétion complète des CAF n'avait pas que des effets bénéfiques. L'objectif n'est donc plus de réduire le nombre de CAF mais plutôt de favoriser les phénotypes anti-tumoraux de ces cellules : diminution de leurs sécrétions pro-tumorales, de leur phénotype pro-tumoraux, *etc.*

Nous avons notamment mis en évidence que l'hyperthermie magnétique et l'ablation mécanique ciblées permettent une diminution de la capacité migratoire des CAF et une diminution de leur sécrétion de collagène 1.

Par la suite, il serait intéressant d'étudier les phénotypes des CAF grâce à des marqueurs spécifiques des iCAF (α -SMA^{low}, IL-6^{high}), myCAF (α -SMA^{high}, IL-6^{low}) ou apCAF (CMHII^{high}), afin de comprendre ces changements observés.

L'intérêt de l'hyperthermie magnétique et de l'ablation mécanique ciblées ne s'arrête donc pas uniquement à l'induction de mort cellulaire ; ces stratégies permettent également de modifier le phénotype des CAF et ainsi d'avoir des effets indirects très intéressants pour inhiber la croissance tumorale.

Ces travaux de thèse ont permis, dans un premier temps, de comprendre le mécanisme impliqué dans la production de ROS et la mort par hyperthermie magnétique intra-lysosomale. Ainsi, le fer impliqué dans la réaction de Fenton à l'origine de la production de ROS par l'hyperthermie magnétique intra-lysosomale provient du pool endogène de la cellule et non de la libération de fer par les nanoparticules d'oxyde de fer soumises à l'AMF. De plus, nous avons démontré que l'hyperthermie magnétique et l'ablation mécanique intra-lysosomales

augmentent l'expression de DAMP à la surface des cellules MiaPaca2 et des CAF et stimulent leur phagocytose par des macrophages et pourraient donc être deux nouvelles stratégies capables d'induire une mort cellulaire immunogène et de rétablir une immunité anti-tumorale dans le PDAC. Enfin, ces deux stratégies ont également des conséquences sur le phénotype des CAF : inhibition de leur capacité à migrer et diminution de leur sécrétion de collagène 1.

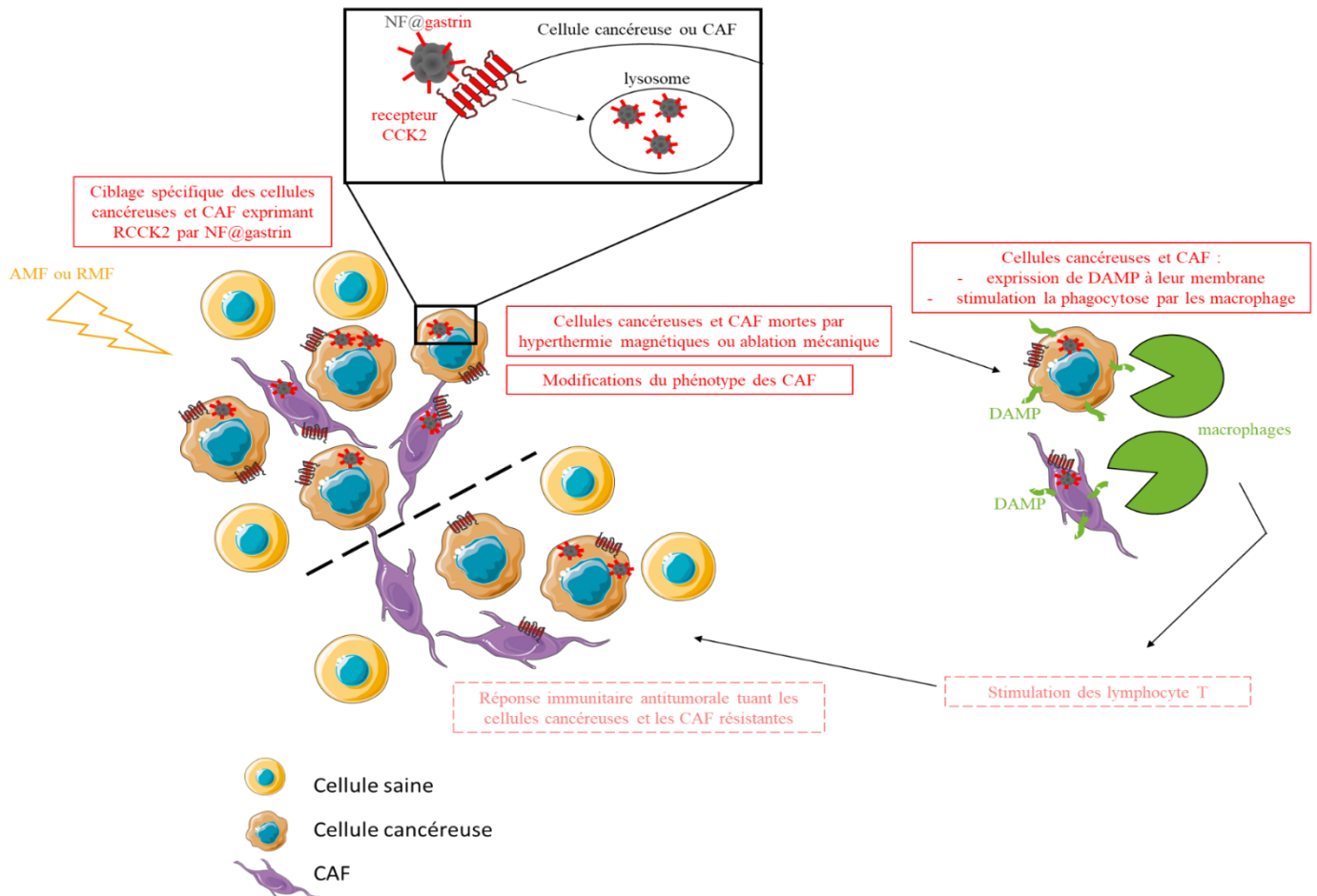


Figure 2 : Représentation schématique des effets anti tumoraux de l'ablation mécanique ciblée et de l'hyperthermie magnétique ciblée.

Références bibliographiques

1. Sun, T. *et al.* Engineered Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer Therapy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 12320–12364 (2014).
2. Ealia, S. A. M. & Saravanakumar, M. P. A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **263**, 032019 (2017).
3. Gessner, I. & Neundorff, I. Nanoparticles Modified with Cell-Penetrating Peptides: Conjugation Mechanisms, Physicochemical Properties, and Application in Cancer Diagnosis and Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 2536 (2020).
4. Gujrati, M. *et al.* Multifunctional Cationic Lipid-Based Nanoparticles Facilitate Endosomal Escape and Reduction-Triggered Cytosolic siRNA Release. *Mol. Pharm.* **11**, 2734–2744 (2014).
5. Blanco, E., Shen, H. & Ferrari, M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat. Biotechnol.* **33**, 941–951 (2015).
6. O'Brien, M. E. R. *et al.* Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYX™/Doxil®) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. *Ann. Oncol.* **15**, 440–449 (2004).
7. Large, D. E., Abdelmessih, R. G., Fink, E. A. & Auguste, D. T. Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **176**, 113851 (2021).
8. Sur, S., Fries, A. C., Kinzler, K. W., Zhou, S. & Vogelstein, B. Remote loading of preencapsulated drugs into stealth liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 2283–2288 (2014).
9. Li, M. *et al.* Composition design and medical application of liposomes. *Eur. J. Med. Chem.* **164**, 640–653 (2019).
10. Blume, G. & Cevc, G. Liposomes for the sustained drug release in vivo. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1029**, 91–97 (1990).
11. Wu, W. *et al.* The Targeted-liposome Delivery System of Antitumor Drugs. *Curr. Drug Metab.* **16**, 894–910 (2015).
12. Garg, A., Tisdale, A. W., Haidari, E. & Kokkoli, E. Targeting colon cancer cells using PEGylated liposomes modified with a fibronectin-mimetic peptide. *Int. J. Pharm.* **366**, 201–210 (2009).
13. Hanafy, N. A. N., El-Kemary, M. & Leporatti, S. Micelles Structure Development as a Strategy to Improve Smart Cancer Therapy. *Cancers* **10**, 238 (2018).
14. Soga, O. *et al.* Thermosensitive and biodegradable polymeric micelles for paclitaxel delivery. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **103**, 341–353 (2005).
15. Shi, Y. *et al.* Complete Regression of Xenograft Tumors upon Targeted Delivery of Paclitaxel via Π - Π Stacking Stabilized Polymeric Micelles. *ACS Nano* **9**, 3740–3752 (2015).
16. Lim, J. *et al.* Antitumor Activity and Molecular Dynamics Simulations of Paclitaxel-Laden Triazine Dendrimers. *Mol. Pharm.* **9**, 404–412 (2012).
17. Ma, Y., Mou, Q., Wang, D., Zhu, X. & Yan, D. Dendritic Polymers for Theranostics. *Theranostics* **6**, 930–947 (2016).
18. Zhou, X. *et al.* Novel manganese and polyester dendrimer-based theranostic nanoparticles for MRI and breast cancer therapy. *J. Mater. Chem. B* **11**, 648–656 (2023).
19. Ahmed, F. *et al.* Biodegradable polymersomes loaded with both paclitaxel and doxorubicin permeate and shrink tumors, inducing apoptosis in proportion to accumulated drug. *J. Controlled Release* **116**, 150–158 (2006).

20. Sanson, C. *et al.* Doxorubicin Loaded Magnetic Polymersomes: Theranostic Nanocarriers for MR Imaging and Magneto-Chemotherapy. *ACS Nano* **5**, 1122–1140 (2011).
21. Meng, F., Zhong, Z. & Feijen, J. Stimuli-Responsive Polymersomes for Programmed Drug Delivery. *Biomacromolecules* **10**, 197–209 (2009).
22. Amaldoss, M. J. N., Yang, J.-L., Koshy, P., Unnikrishnan, A. & Sorrell, C. C. Inorganic nanoparticle-based advanced cancer therapies: Promising combination strategies. *Drug Discov. Today* **27**, 103386 (2022).
23. Dadfar, S. M. *et al.* Iron Oxide Nanoparticles: Diagnostic, Therapeutic and Theranostic Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **138**, 302–325 (2019).
24. Clerc, P. *et al.* Targeted Magnetic Intra-Lysosomal Hyperthermia produces lysosomal reactive oxygen species and causes Caspase-1 dependent cell death. *J. Controlled Release* **270**, 120–134 (2018).
25. Ji, Y. & Wang, C. Magnetic iron oxide nanoparticle-loaded hydrogels for photothermal therapy of cancer cells. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **11**, 1130523 (2023).
26. Pérez-Hernández, M. *et al.* Dissecting the Molecular Mechanism of Apoptosis during Photothermal Therapy Using Gold Nanoprisms. *ACS Nano* **9**, 52–61 (2015).
27. Maltzahn, G. von *et al.* Computationally Guided Photothermal Tumor Therapy Using Long-Circulating Gold Nanorod Antennas. *Cancer Res.* **69**, 3892–3900 (2009).
28. Wang, Y. *et al.* BaTiO₃-core Au-shell Nanoparticles for Photothermal Therapy and Bimodal Imaging. *Acta Biomater.* **72**, 287–294 (2018).
29. Li, J. *et al.* A nanoscale photothermal agent based on a metal-organic coordination polymer as a drug-loading framework for effective combination therapy. *Acta Biomater.* **94**, 435–446 (2019).
30. Ajnai, G. *et al.* Trends of Gold Nanoparticle-based Drug Delivery System in Cancer Therapy. *J. Exp. Clin. Med.* **6**, 172–178 (2014).
31. Naidoo, C., Kruger, C. A. & Abrahamse, H. Targeted photodynamic therapy treatment of in vitro A375 metastatic melanoma cells. *Oncotarget* **10**, 6079–6095 (2019).
32. Singh, P. *et al.* Gold Nanoparticles in Diagnostics and Therapeutics for Human Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1979 (2018).
33. Xiao, Y. *et al.* Anti-HER2 IgY antibody-functionalized single-walled carbon nanotubes for detection and selective destruction of breast cancer cells. *BMC Cancer* **9**, 351 (2009).
34. Lerner, M. B. *et al.* Hybrids of a Genetically Engineered Antibody and a Carbon Nanotube Transistor for Detection of Prostate Cancer Biomarkers. *ACS Nano* **6**, 5143–5149 (2012).
35. Rhim, W.-K., Kim, J.-S. & Nam, J.-M. Lipid–Gold-Nanoparticle Hybrid-Based Gene Delivery. *Small* **4**, 1651–1655 (2008).
36. Oliveira, H. *et al.* Magnetic field triggered drug release from polymersomes for cancer therapeutics. *J. Controlled Release* **169**, 165–170 (2013).
37. Zhao, H.-X. *et al.* Theranostic metal–organic framework core–shell composites for magnetic resonance imaging and drug delivery †Electronic supplementary information (ESI) available: Materials, experimental details and characterization. See DOI: 10.1039/c6sc01359g. *Chem. Sci.* **7**, 5294–5301 (2016).
38. Arami, H., Khandhar, A., Liggitt, D. & Krishnan, K. M. In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 8576–8607 (2015).
39. Yang, L. *et al.* Size dependent biodistribution and toxicokinetics of iron oxide magnetic nanoparticles in mice. *Nanoscale* **7**, 625–636 (2015).
40. Hoshyar, N., Gray, S., Han, H. & Bao, G. The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction. *Nanomed.* **11**, 673–692 (2016).
41. Haroon, H. B., Hunter, A. C., Farhangrazi, Z. S. & Moghimi, S. M. A brief history of long circulating nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **188**, 114396 (2022).

42. Shah, S., Liu, Y., Hu, W. & Gao, J. Modeling Particle Shape-Dependent Dynamics in Nanomedicine. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **11**, 919–928 (2011).
43. Toy, R., Peiris, P. M., Ghaghada, K. B. & Karathanasis, E. Shaping cancer nanomedicine: The effect of particle shape on the in vivo journey of nanoparticles. *Nanomed.* **9**, 121–134 (2014).
44. Barua, S. *et al.* Particle shape enhances specificity of antibody-displaying nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 3270–3275 (2013).
45. Chiang, C.-S., Shen, Y.-S., Liu, J.-J., Shyu, W.-C. & Chen, S.-Y. Synergistic Combination of Multistage Magnetic Guidance and Optimized Ligand Density in Targeting a NanoplatforM for Enhanced Cancer Therapy. *Adv. Healthc. Mater.* **5**, 2131–2141 (2016).
46. Zhang, Y.-N., Poon, W., Tavares, A. J., McGilvray, I. D. & Chan, W. C. W. Nanoparticle–liver interactions: Cellular uptake and hepatobiliary elimination. *J. Controlled Release* **240**, 332–348 (2016).
47. Abuchowski, A., McCoy, J. R., Palczuk, N. C., van Es, T. & Davis, F. F. Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. *J. Biol. Chem.* **252**, 3582–3586 (1977).
48. Weissig, V., Pettinger, T. K. & Murdock, N. Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market. *Int. J. Nanomedicine* **9**, 4357–4373 (2014).
49. Jokerst, J. V., Lobovkina, T., Zare, R. N. & Gambhir, S. S. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomed.* **6**, 715–728 (2011).
50. Wilhelm, S. *et al.* Analysis of nanoparticle delivery to tumours. *Nat. Rev. Mater.* **1**, 1–12 (2016).
51. Deshpande, P. P., Biswas, S. & Torchilin, V. P. Current trends in the use of liposomes for tumor targeting. *Nanomed.* **8**, 10.2217/nnm.13.118 (2013).
52. Haley, B. & Frenkel, E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. *Urol. Oncol.* **26**, 57–64 (2008).
53. Matsumura, Y. & Maeda, H. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumoritropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs.
54. Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D. & Keshet, E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* **359**, 843–845 (1992).
55. Subhan, M. A., Yalamarty, S. S. K., Filipczak, N., Parveen, F. & Torchilin, V. P. Recent Advances in Tumor Targeting via EPR Effect for Cancer Treatment. *J. Pers. Med.* **11**, 571 (2021).
56. Alasvand, N. *et al.* Chapter 13 - Therapeutic Nanoparticles for Targeted Delivery of Anticancer Drugs. in *Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics* (ed. Grumezescu, A. M.) 245–259 (Elsevier, 2017). doi:10.1016/B978-0-323-52725-5.00013-7.
57. Gabizon, A. *et al.* Prolonged Circulation Time and Enhanced Accumulation in Malignant Exudates of Doxorubicin Encapsulated in Polyethylene-glycol Coated Liposomes.
58. Barenholz, Y. (Chezy). Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *J. Controlled Release* **160**, 117–134 (2012).
59. Ojha, T. *et al.* Pharmacological and physical vessel modulation strategies to improve EPR-mediated drug targeting to tumors. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **119**, 44–60 (2017).
60. Liu, Z. *et al.* Destruction of tumor vasculature by vascular disrupting agents in overcoming the limitation of EPR effect. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **183**, 114138 (2022).
61. Grandis, J. R. & Sok, J. C. Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy. *Pharmacol. Ther.* **102**, 37–46 (2004).
62. Wang, X.-B. & Zhou, H.-Y. Molecularly targeted gemcitabine-loaded nanoparticulate system towards the treatment of EGFR overexpressing lung cancer. *Biomed. Pharmacother.* **70**, 123–128 (2015).

63. Bharti, R. *et al.* Somatostatin receptor targeted liposomes with Diacerein inhibit IL-6 for breast cancer therapy. *Cancer Lett.* **388**, 292–302 (2017).
64. Liao, Z., Tan, Z. W., Zhu, P. & Tan, N. S. Cancer-associated fibroblasts in tumor microenvironment – Accomplices in tumor malignancy. *Cell. Immunol.* **343**, 103729 (2019).
65. Chen, B. *et al.* A tenascin C targeted nanoliposome with navitoclax for specifically eradicating of cancer-associated fibroblasts. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **12**, 131–141 (2016).
66. Chen, B. *et al.* Comprehensively priming the tumor microenvironment by cancer-associated fibroblast-targeted liposomes for combined therapy with cancer cell-targeted chemotherapeutic drug delivery system. *J. Controlled Release* **241**, 68–80 (2016).
67. Zhang, Y. *et al.* Versatile metal-phenolic network nanoparticles for multitargeted combination therapy and magnetic resonance tracing in glioblastoma. *Biomaterials* **278**, 121163 (2021).
68. Xu, W. *et al.* Multi-target tyrosine kinase inhibitor nanoparticle delivery systems for cancer therapy. *Mater. Today Bio* **16**, 100358 (2022).
69. Liu, Y.-L., Chen, D., Shang, P. & Yin, D.-C. A review of magnet systems for targeted drug delivery. *J. Controlled Release* **302**, 90–104 (2019).
70. Goren, K. *et al.* Targeting tumor cells using magnetic nanoparticles – a feasibility study in animal models. *Minim. Invasive Ther. Allied Technol.* **31**, 1086–1095 (2022).
71. Fazlollahi, F. *et al.* Nanoparticle translocation across mouse alveolar epithelial cell monolayers: species-specific mechanisms. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **9**, 786–794 (2013).
72. Luk, B. T. & Zhang, L. Cell membrane-camouflaged nanoparticles for drug delivery. *J. Controlled Release* **220**, 600–607 (2015).
73. Kim, B. *et al.* Immunogene therapy with fusogenic nanoparticles modulates macrophage response to *Staphylococcus aureus*. *Nat. Commun.* **9**, 1969 (2018).
74. Sabourian, P. *et al.* Effect of Physico-Chemical Properties of Nanoparticles on Their Intracellular Uptake. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 8019 (2020).
75. Choi, H. S. *et al.* Renal Clearance of Nanoparticles. *Nat. Biotechnol.* **25**, 1165–1170 (2007).
76. Poon, W. *et al.* Elimination Pathways of Nanoparticles. *ACS Nano* **13**, 5785–5798 (2019).
77. Martinkova, P., Brtnicky, M., Kynicky, J. & Pohanka, M. Iron Oxide Nanoparticles: Innovative Tool in Cancer Diagnosis and Therapy. *Adv. Healthc. Mater.* **7**, 1700932 (2018).
78. Alifu, N. *et al.* Single-Molecular Near-Infrared-II Theranostic Systems: Ultrastable Aggregation-Induced Emission Nanoparticles for Long-Term Tracing and Efficient Photothermal Therapy. *ACS Nano* **12**, 11282–11293 (2018).
79. Sun, W., Tang, F., Cui, J.-X. & Lu, Z.-L. Fluorescent Nanoparticles for Targeted Tumor Imaging and DNA Tracking Gene Delivery In Vitro/In Vivo. *ACS Omega* **5**, 31700–31705 (2020).
80. Viswambari Devi, R., Doble, M. & Verma, R. S. Nanomaterials for early detection of cancer biomarker with special emphasis on gold nanoparticles in immunoassays/sensors. *Biosens. Bioelectron.* **68**, 688–698 (2015).
81. Li, K. *et al.* Gold nanoparticle amplified optical microfiber evanescent wave absorption biosensor for cancer biomarker detection in serum. *Talanta* **120**, 419–424 (2014).
82. Wang, J., Wu, L., Ren, J. & Qu, X. Visualizing human telomerase activity with primer-modified Au nanoparticles. *Small Weinh. Bergstr. Ger.* **8**, 259–264 (2012).
83. Adhipandito, C. F., Cheung, S.-H., Lin, Y.-H. & Wu, S.-H. Atypical Renal Clearance of Nanoparticles Larger Than the Kidney Filtration Threshold. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 11182 (2021).
84. Rodríguez, F. *et al.* Nano-Based Approved Pharmaceuticals for Cancer Treatment: Present and Future Challenges. *Biomolecules* **12**, 784 (2022).
85. Zhang, P. *et al.* A PEG-Fmoc conjugate as a nanocarrier for paclitaxel. *Biomaterials* **35**, 7146–7156 (2014).

86. Drummond, D. C. *et al.* Development of a highly stable and targetable nanoliposomal formulation of topotecan. *J. Controlled Release* **141**, 13–21 (2010).
87. Jackson, C. B., Farzan, M., Chen, B. & Choe, H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **23**, 3–20 (2022).
88. Wen, R., Umeano, A. C., Kou, Y., Xu, J. & Farooqi, A. A. Nanoparticle systems for cancer vaccine. *Nanomed.* **14**, 627–648 (2019).
89. Bardania, H., Tarvirdipour, S. & Dorkoosh, F. Liposome-targeted delivery for highly potent drugs. *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.* **45**, 1478–1489 (2017).
90. Chang, D.-K., Li, P.-C., Lu, R.-M., Jane, W.-N. & Wu, H.-C. Peptide-Mediated Liposomal Doxorubicin Enhances Drug Delivery Efficiency and Therapeutic Efficacy in Animal Models. *PLoS ONE* **8**, e83239 (2013).
91. Bulbake, U., Doppalapudi, S., Kommineni, N. & Khan, W. Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review. *Pharmaceutics* **9**, 12 (2017).
92. Cheng, K. *et al.* pH-responsive and CD44-targeting polymer micelles based on CD44p-conjugated amphiphilic block copolymer PEG-b-HES-b-PLA for delivery of emodin to breast cancer cells. *Nanotechnology* **33**, 275604 (2022).
93. Werner, M. E. *et al.* Preclinical Evaluation of Genexol-PM, a Nanoparticle Formulation of Paclitaxel, as a Novel Radiosensitizer for the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **86**, 463–468 (2013).
94. Kim, J. Y. *et al.* Multicenter Phase II Clinical Trial of Genexol-PM® with Gemcitabine in Advanced Biliary Tract Cancer. *Anticancer Res.* **37**, 1467–1473 (2017).
95. Farzanegan, Z. & Tahmasbi, M. Evaluating the applications and effectiveness of magnetic nanoparticle-based hyperthermia for cancer treatment: A systematic review. *Appl. Radiat. Isot.* **198**, 110873 (2023).
96. Kumar, C. S. S. R. & Mohammad, F. Magnetic Nanomaterials for Hyperthermia-based Therapy and Controlled Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**, 789–808 (2011).
97. Golovin, Y. I. *et al.* Towards nanomedicines of the future: Remote magneto-mechanical actuation of nanomedicines by alternating magnetic fields. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **219**, 43–60 (2015).
98. Shabatina, T. I., Vernaya, O. I., Shimanovskiy, N. L. & Melnikov, M. Ya. Metal and Metal Oxides Nanoparticles and Nanosystems in Anticancer and Antiviral Theragnostic Agents. *Pharmaceutics* **15**, 1181 (2023).
99. Lammers, T., Kiessling, F., Hennink, W. E. & Storm, G. Nanotheranostics and Image-Guided Drug Delivery: Current Concepts and Future Directions. *Mol. Pharm.* **7**, 1899–1912 (2010).
100. Marshall, S. K. *et al.* Biomimetic Targeted Theranostic Nanoparticles for Breast Cancer Treatment. *Molecules* **27**, 6473 (2022).
101. Roca, A. G. *et al.* Design strategies for shape-controlled magnetic iron oxide nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **138**, 68–104 (2019).
102. Nowak-Jary, J. & Machnicka, B. Pharmacokinetics of magnetic iron oxide nanoparticles for medical applications. *J. Nanobiotechnology* **20**, 305 (2022).
103. Farzin, A., Etesami, S. A., Quint, J., Memic, A. & Tamayol, A. Magnetic Nanoparticles in Cancer Therapy and Diagnosis. *Adv. Healthc. Mater.* **9**, 1901058 (2020).
104. Chen, C. *et al.* Ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles: A next generation contrast agent for magnetic resonance imaging. *WIREs Nanomedicine Nanobiotechnology* **14**, e1740 (2022).
105. Hsu, J. C. *et al.* An all-in-one nanoparticle (AION) contrast agent for breast cancer screening with DEM-CT-MRI-NIRF imaging. *Nanoscale* **10**, 17236–17248 (2018).

106. Issadore, D. *et al.* Ultrasensitive clinical enumeration of rare cells ex vivo using a μ -Hall detector. *Sci. Transl. Med.* **4**, 141ra92 (2012).
107. Stauffer, P. R. Evolving technology for thermal therapy of cancer. *Int. J. Hyperthermia* **21**, 731–744 (2005).
108. Kim, Y., Lee, T. H. & O'Neill, B. E. Non-lethal heat treatment of cells results in reduction of tumor initiation and metastatic potential. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **464**, 51–56 (2015).
109. Fiorentini, G. *et al.* A Narrative Review of Regional Hyperthermia: Updates From 2010 to 2019. *Integr. Cancer Ther.* **19**, 1534735420932648 (2020).
110. Hildebrandt, B. *et al.* The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **43**, 33–56 (2002).
111. Sánchez-Hidalgo, J. M. *et al.* Colorectal peritoneal metastases: Optimal management review. *World J. Gastroenterol.* **25**, 3484–3502 (2019).
112. Maier-Hauff, K. *et al.* 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 (2007).
113. Maier-Hauff, K. *et al.* 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 (2011).
114. Johannsen, M. *et al.* Morbidity and quality of life during thermotherapy using magnetic nanoparticles in locally recurrent prostate cancer: results of a prospective phase I trial. *Int. J. Hyperth. Off. J. Eur. Soc. Hyperthermic Oncol. North Am. Hyperth. Group* **23**, 315–323 (2007).
115. Ivkov, R. *et al.* Application of High Amplitude Alternating Magnetic Fields for Heat Induction of Nanoparticles Localized in Cancer. *Clin. Cancer Res.* **11**, 7093s–7103s (2005).
116. Creixell, M., Bohórquez, A. C., Torres-Lugo, M. & Rinaldi, C. EGFR-Targeted Magnetic Nanoparticle Heaters Kill Cancer Cells without a Perceptible Temperature Rise. *ACS Publications* <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/nn201822b> (2011) doi:10.1021/nn201822b.
117. Domenech, M., Marrero-Berrios, I., Torres-Lugo, M. & Rinaldi, C. Lysosomal Membrane Permeabilization by Targeted Magnetic Nanoparticles in Alternating Magnetic Fields. *ACS Nano* **7**, 5091–5101 (2013).
118. Sanchez, C. *et al.* Targeting a G-protein-coupled receptor overexpressed in endocrine tumors by magnetic nanoparticles to induce cell death. *ACS Nano* **8**, 1350–1363 (2014).
119. Huang, H., Delikanli, S., Zeng, H., Ferkey, D. M. & Pralle, A. Remote control of ion channels and neurons through magnetic-field heating of nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* **5**, 602–606 (2010).
120. Lopez, S. *et al.* Magneto-mechanical destruction of cancer-associated fibroblasts using ultra-small iron oxide nanoparticles and low frequency rotating magnetic fields. *Nanoscale Adv.* **4**, 421–436.
121. Yan, S. Y. *et al.* Therapeutic mechanism of treating SMMC-7721 liver cancer cells with magnetic fluid hyperthermia using Fe₂O₃ nanoparticles. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **47**, 947–959 (2014).
122. Oh, Y., Lee, N., Kang, H. W. & Oh, J. In vitro study on apoptotic cell death by effective magnetic hyperthermia with chitosan-coated MnFe₂O₄. *Nanotechnology* **27**, 115101 (2016).
123. Mou, Y. *et al.* Ferroptosis, a new form of cell death: opportunities and challenges in cancer. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* **12**, 34 (2019).
124. Xie, S. *et al.* Metabolic Control by Heat Stress Determining Cell Fate to Ferroptosis for Effective Cancer Therapy. *ACS Nano* **15**, 7179–7194 (2021).
125. Shetake, N. G. *et al.* Magnetic nanoparticle-mediated hyperthermia therapy induces tumour growth inhibition by apoptosis and Hsp90/AKT modulation. *Int. J. Hyperthermia* **31**, 909–919 (2015).

126. Nica, V. *et al.* Cell-Membrane-Coated and Cell-Penetrating Peptide-Conjugated Trimagnetic Nanoparticles for Targeted Magnetic Hyperthermia of Prostate Cancer Cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **15**, 30008–30028 (2023).
127. Bertheloot, D., Latz, E. & Franklin, B. S. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cell. Mol. Immunol.* **18**, 1106–1121 (2021).
128. El Hajj Diab, D., Clerc, P., Serhan, N., Fourmy, D. & Gigoux, V. Combined Treatments of Magnetic Intra-Lysosomal Hyperthermia with Doxorubicin Promotes Synergistic Anti-Tumoral Activity. *Nanomaterials* **8**, 468 (2018).
129. Wang, F., Gómez-Sintes, R. & Boya, P. Lysosomal membrane permeabilization and cell death. *Traffic* **19**, 918–931 (2018).
130. Roet, M. *et al.* Progress in neuromodulation of the brain: A role for magnetic nanoparticles? *Prog. Neurobiol.* **177**, 1–14 (2019).
131. Chopra, R. *et al.* Employing high-frequency alternating magnetic fields for the non-invasive treatment of prosthetic joint infections. *Sci. Rep.* **7**, 7520 (2017).
132. Kim, D.-H. *et al.* Biofunctionalized magnetic-vortex microdiscs for targeted cancer-cell destruction. *Nat. Mater.* **9**, 165–171 (2010).
133. Zhang, E. *et al.* Dynamic Magnetic Fields Remote-Control Apoptosis via Nanoparticle Rotation. *ACS Nano* **8**, 3192 (2014).
134. Shen, Y. *et al.* Elongated Nanoparticle Aggregates in Cancer Cells for Mechanical Destruction with Low Frequency Rotating Magnetic Field. *Theranostics* **7**, 1735–1748 (2017).
135. Hillion, A. *et al.* Real-Time Observation and Analysis of Magnetomechanical Actuation of Magnetic Nanoparticles in Cells. *Nano Lett.* **22**, 1986–1991 (2022).
136. Lunov, O. *et al.* Remote Actuation of Apoptosis in Liver Cancer Cells via Magneto-Mechanical Modulation of Iron Oxide Nanoparticles. *Cancers* **11**, 1873 (2019).
137. Master, A. M. *et al.* *Sci. Rep.* **6**, 33560 (2016).
138. Hughes, S., McBain, S., Dobson, J. & El Haj, A. J. Selective activation of mechanosensitive ion channels using magnetic particles. *J. R. Soc. Interface* **5**, 855–863 (2008).
139. Hoffmann, C. *et al.* Spatiotemporal control of microtubule nucleation and assembly using magnetic nanoparticles. *Nat. Nanotechnol.* **8**, 199–205 (2013).
140. Majouga, A. *et al.* Enzyme-functionalized gold-coated magnetite nanoparticles as novel hybrid nanomaterials: Synthesis, purification and control of enzyme function by low-frequency magnetic field. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **125**, 104–109 (2015).
141. Hu, B., El Haj, A. J. & Dobson, J. Receptor-Targeted, Magneto-Mechanical Stimulation of Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 19276–19293 (2013).
142. Unterweger, H. *et al.* Development and characterization of magnetic iron oxide nanoparticles with a cisplatin-bearing polymer coating for targeted drug delivery. *Int. J. Nanomedicine* **9**, 3659–3676 (2014).
143. Clares, B. *et al.* Nano-engineering of 5-fluorouracil-loaded magnetoliposomes for combined hyperthermia and chemotherapy against colon cancer. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV* **85**, 329–338 (2013).
144. Nitica, S. *et al.* Doxorubicin Loaded Thermosensitive Magneto-Liposomes Obtained by a Gel Hydration Technique: Characterization and In Vitro Magneto-Chemotherapeutic Effect Assessment. *Pharmaceutics* **14**, 2501 (2022).
145. Persano, S. *et al.* Elucidating the Innate Immunological Effects of Mild Magnetic Hyperthermia on U87 Human Glioblastoma Cells: An In Vitro Study. *Pharmaceutics* **13**, 1668 (2021).

146. Beola, L. *et al.* Critical Parameters to Improve Pancreatic Cancer Treatment Using Magnetic Hyperthermia: Field Conditions, Immune Response, and Particle Biodistribution. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **13**, 12982–12996 (2021).
147. Carter, T. J. *et al.* Potential of Magnetic Hyperthermia to Stimulate Localized Immune Activation. *Small* **17**, 2005241 (2021).
148. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2020. *CA. Cancer J. Clin.* **70**, 7–30 (2020).
149. Iodice, S., Gandini, S., Maisonneuve, P. & Lowenfels, A. B. Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. *Langenbecks Arch. Surg.* **393**, 535–545 (2008).
150. Jayasekara, H. *et al.* Lifetime alcohol intake and pancreatic cancer incidence and survival: findings from the Melbourne Collaborative Cohort Study. *Cancer Causes Control* **30**, 323–331 (2019).
151. Téoule, P. *et al.* Obesity and Pancreatic Cancer: A Matched-Pair Survival Analysis. *J. Clin. Med.* **9**, 3526 (2020).
152. Stevens, R. J., Roddam, A. W. & Beral, V. Pancreatic cancer in type 1 and young-onset diabetes: systematic review and meta-analysis. *Br. J. Cancer* **96**, 507–509 (2007).
153. Raimondi, S., Lowenfels, A. B., Morselli-Labate, A. M., Maisonneuve, P. & Pezzilli, R. Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **24**, 349–358 (2010).
154. Chen, F. *et al.* Analysis of heritability and genetic architecture of Pancreatic Cancer: A PanC4 Study. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* **28**, 1238–1245 (2019).
155. Hruban, R. H. *et al.* Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am. J. Surg. Pathol.* **25**, 579–586 (2001).
156. Peters, M. L. B. *et al.* Progression to pancreatic ductal adenocarcinoma from pancreatic intraepithelial neoplasia: Results of a simulation model. *Pancreatol. Off. J. Int. Assoc. Pancreatol. IAPAI* **18**, 928–934 (2018).
157. Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R. H. & Goggins, M. Pancreatic cancer. *Lancet Lond. Engl.* **378**, 607–620 (2011).
158. Qian, Z. R. *et al.* Association of Alterations in Main Driver Genes With Outcomes of Patients With Resected Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *JAMA Oncol.* **4**, e173420 (2018).
159. Brummelkamp, T. R., Bernards, R. & Agami, R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell* **2**, 243–247 (2002).
160. Wu, C., Yang, P., Liu, B. & Tang, Y. Is there a CDKN2A-centric network in pancreatic ductal adenocarcinoma? *OncoTargets Ther.* **13**, 2551–2562 (2020).
161. Liu, X. *et al.* Multi-omics analysis of intra-tumoural and inter-tumoural heterogeneity in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin. Transl. Med.* **12**, e670 (2022).
162. Philip, P. A. *et al.* Molecular characterization of KRAS wild type tumors in patients with pancreatic adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **28**, 2704–2714 (2022).
163. von Ahrens, D., Bhagat, T. D., Nagrath, D., Maitra, A. & Verma, A. The role of stromal cancer-associated fibroblasts in pancreatic cancer. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* **10**, 76 (2017).
164. Sherman, M. H. & Beatty, G. L. Tumor Microenvironment in Pancreatic Cancer Pathogenesis and Therapeutic Resistance. *Annu. Rev. Pathol.* **18**, 123–148 (2023).
165. Piersma, B., Hayward, M. K. & Weaver, V. M. Fibrosis and cancer: A strained relationship. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **1873**, 188356 (2020).
166. Manoukian, P., Bijlsma, M. & van Laarhoven, H. The Cellular Origins of Cancer-Associated Fibroblasts and Their Opposing Contributions to Pancreatic Cancer Growth. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, 743907 (2021).

167. Nagathihalli, N. S. *et al.* Pancreatic stellate cell secreted IL-6 stimulates STAT3 dependent invasiveness of pancreatic intraepithelial neoplasia and cancer cells. *Oncotarget* **7**, 65982–65992 (2016).
168. Krstic, J. *et al.* Regulation of Mesenchymal Stem Cell Differentiation by Transforming Growth Factor Beta Superfamily. *Curr. Protein Pept. Sci.* **19**, 1138–1154 (2018).
169. Vaish, U., Jain, T., Are, A. C. & Dudeja, V. Cancer-Associated Fibroblasts in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: An Update on Heterogeneity and Therapeutic Targeting. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 13408 (2021).
170. Gilkes, D. M., Bajpai, S., Chaturvedi, P., Wirtz, D. & Semenza, G. L. Hypoxia-inducible Factor 1 (HIF-1) Promotes Extracellular Matrix Remodeling under Hypoxic Conditions by Inducing P4HA1, P4HA2, and PLOD2 Expression in Fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **288**, 10819–10829 (2013).
171. Liu, Q., Liao, Q. & Zhao, Y. Chemotherapy and tumor microenvironment of pancreatic cancer. *Cancer Cell Int.* **17**, 68 (2017).
172. Hwang, R. F. *et al.* Cancer-Associated Stromal Fibroblasts Promote Pancreatic Tumor Progression. *Cancer Res.* **68**, 918–926 (2008).
173. Leca, J. *et al.* Cancer-associated fibroblast-derived annexin A6+ extracellular vesicles support pancreatic cancer aggressiveness. *J. Clin. Invest.* **126**, 4140–4156.
174. Goehrig, D. *et al.* Stromal protein β ig-h3 reprogrammes tumour microenvironment in pancreatic cancer. *Gut* **68**, 693–707 (2019).
175. Hessmann, E. *et al.* Fibroblast drug scavenging increases intratumoural gemcitabine accumulation in murine pancreas cancer. *Gut* **67**, 497–507 (2018).
176. Olumi, A. F. *et al.* Carcinoma-associated Fibroblasts Direct Tumor Progression of Initiated Human Prostatic Epithelium1. *Cancer Res.* **59**, 5002–5011 (1999).
177. Li, Y. *et al.* Cancer-associated fibroblasts contribute to oral cancer cells proliferation and metastasis via exosome-mediated paracrine miR-34a-5p. *EBioMedicine* **36**, 209–220 (2018).
178. Subramaniam, K. S. *et al.* Cancer-Associated Fibroblasts Promote Proliferation of Endometrial Cancer Cells. *PLoS ONE* **8**, e68923 (2013).
179. Labernadie, A. *et al.* A mechanically active heterotypic E-cadherin/N-cadherin adhesion enables fibroblasts to drive cancer cell invasion. *Nat. Cell Biol.* **19**, 224–237 (2017).
180. Weniger, M., Honselmann, K. C. & Liss, A. S. The Extracellular Matrix and Pancreatic Cancer: A Complex Relationship. *Cancers* **10**, 316 (2018).
181. Fullár, A. *et al.* Remodeling of extracellular matrix by normal and tumor-associated fibroblasts promotes cervical cancer progression. *BMC Cancer* **15**, 256 (2015).
182. Eble, J. A. & Niland, S. The extracellular matrix in tumor progression and metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* **36**, 171–198 (2019).
183. Ene-Obong, A. *et al.* Activated Pancreatic Stellate Cells Sequester CD8+ T-Cells to Reduce Their Infiltration of the Juxtatumoral Compartment of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Gastroenterology* **145**, 1121–1132 (2013).
184. Chiarugi, P. Cancer-associated fibroblasts and macrophages. *Oncoimmunology* **2**, e25563 (2013).
185. An, Y., Liu, F., Chen, Y. & Yang, Q. Crosstalk between cancer-associated fibroblasts and immune cells in cancer. *J. Cell. Mol. Med.* **24**, 13–24 (2020).
186. Elyada, E. *et al.* Cross-species single-cell analysis of pancreatic ductal adenocarcinoma reveals antigen-presenting cancer-associated fibroblasts. *Cancer Discov.* **9**, 1102–1123 (2019).
187. Öhlund, D. *et al.* Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *J. Exp. Med.* **214**, 579–596 (2017).
188. Whatcott, C. J. *et al.* Desmoplasia in primary tumors and metastatic lesions of pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **21**, 3561–3568 (2015).

189. Provenzano, P. P. *et al.* Enzymatic targeting of the stroma ablates physical barriers to treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* **21**, 418–429 (2012).
190. Özdemir, B. C. *et al.* Depletion of Carcinoma-Associated Fibroblasts and Fibrosis Induces Immunosuppression and Accelerates Pancreas Cancer with Reduced Survival. *Cancer Cell* **25**, 719–734 (2014).
191. Bhattacharjee, S. *et al.* Tumor restriction by type I collagen opposes tumor-promoting effects of cancer-associated fibroblasts. *J. Clin. Invest.* **131**, e146987.
192. Biffi, G. *et al.* IL-1-induced JAK/STAT signaling is antagonized by TGF- β to shape CAF heterogeneity in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Discov.* **9**, 282–301 (2019).
193. Dauer, P. *et al.* Inactivation of cancer-associated-fibroblasts (CAF) disrupts oncogenic signaling in pancreatic cancer cells and promotes its regression. *Cancer Res.* **78**, 1321–1333 (2018).
194. Li, Z., Sun, C. & Qin, Z. Metabolic reprogramming of cancer-associated fibroblasts and its effect on cancer cell reprogramming. *Theranostics* **11**, 8322–8336 (2021).
195. Fang, J. *et al.* A Potent Immunotoxin Targeting Fibroblast Activation Protein for Treatment of Breast Cancer in Mice. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **138**, 1013–1023 (2016).
196. Goumas, F. A. *et al.* Inhibition of IL-6 signaling significantly reduces primary tumor growth and recurrences in orthotopic xenograft models of pancreatic cancer. *Int. J. Cancer* **137**, 1035–1046 (2015).
197. Hu, H. *et al.* The M2 phenotype of tumor-associated macrophages in the stroma confers a poor prognosis in pancreatic cancer. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* **37**, 8657–8664 (2016).
198. Liou, G.-Y. *et al.* Mutant Kras-induced expression of ICAM-1 in pancreatic acinar cells causes attraction of macrophages to expedite the formation of precancerous lesions. *Cancer Discov.* **5**, 52–63 (2015).
199. Sanford, D. E. *et al.* Inflammatory monocyte mobilization decreases patient survival in pancreatic cancer: a role for targeting the CCL2/CCR2 axis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **19**, 3404–3415 (2013).
200. Qian, B.-Z. *et al.* CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast tumor metastasis. *Nature* **475**, 222–225 (2011).
201. Pinton, L. *et al.* Activated T cells sustain myeloid-derived suppressor cell-mediated immune suppression. *Oncotarget* **7**, 1168–1184 (2015).
202. Huang, B. *et al.* Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res.* **66**, 1123–1131 (2006).
203. Yang, X. *et al.* Lactate-Modulated Immunosuppression of Myeloid-Derived Suppressor Cells Contributes to the Radioresistance of Pancreatic Cancer. *Cancer Immunol. Res.* **8**, 1440–1451 (2020).
204. Wu, S.-Y., Fu, T., Jiang, Y.-Z. & Shao, Z.-M. Natural killer cells in cancer biology and therapy. *Mol. Cancer* **19**, 120 (2020).
205. Fitzgerald, A. A. *et al.* DPP inhibition alters the CXCR3 axis and enhances NK and CD8+ T cell infiltration to improve anti-PD1 efficacy in murine models of pancreatic ductal adenocarcinoma. *J. Immunother. Cancer* **9**, e002837 (2021).
206. Hoshikawa, M. *et al.* NK cell and IFN signatures are positive prognostic biomarkers for resectable pancreatic cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **495**, 2058–2065 (2018).
207. Jun, E. *et al.* Progressive Impairment of NK Cell Cytotoxic Degranulation Is Associated With TGF- β 1 Deregulation and Disease Progression in Pancreatic Cancer. *Front. Immunol.* **10**, 1354 (2019).

208. Shojaei, F., Singh, M., Thompson, J. D. & Ferrara, N. Role of Bv8 in neutrophil-dependent angiogenesis in a transgenic model of cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 2640–2645 (2008).
209. Pekarek, L. A., Starr, B. A., Toledano, A. Y. & Schreiber, H. Inhibition of tumor growth by elimination of granulocytes. *J. Exp. Med.* **181**, 435–440 (1995).
210. Ardi, V. C., Kupriyanova, T. A., Deryugina, E. I. & Quigley, J. P. Human neutrophils uniquely release TIMP-free MMP-9 to provide a potent catalytic stimulator of angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 20262–20267 (2007).
211. Fukunaga, A. *et al.* CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* **28**, e26-31 (2004).
212. Carstens, J. L. *et al.* Spatial computation of intratumoral T cells correlates with survival of patients with pancreatic cancer. *Nat. Commun.* **8**, 15095 (2017).
213. Feig, C. *et al.* Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 20212–20217 (2013).
214. Jang, J.-E. *et al.* Crosstalk between Regulatory T Cells and Tumor-Associated Dendritic Cells Negates Anti-tumor Immunity in Pancreatic Cancer. *Cell Rep.* **20**, 558–571 (2017).
215. Leao, I. C., Ganesan, P., Armstrong, T. D. & Jaffee, E. M. Effective Depletion of Regulatory T Cells Allows the Recruitment of Mesothelin-Specific CD8+ T Cells to the Antitumor Immune Response Against a Mesothelin-Expressing Mouse Pancreatic Adenocarcinoma. *Clin. Transl. Sci.* **1**, 228–239 (2008).
216. Pereira, S. P. *et al.* Early detection of pancreatic cancer. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **5**, 698–710 (2020).
217. Van Daele, D. *et al.* Evolution dans la prise en charge de l'adénocarcinome du pancréas localisé estimé résecable. *Rev Med Suisse* **483**, 1543–1548 (2015).
218. Torphy, R. J., Fujiwara, Y. & Schulick, R. D. Pancreatic Cancer Treatment: Better, but a long way to go. *Surg. Today* **50**, 1117–1125 (2020).
219. Cid-Arregui, A. & Juarez, V. Perspectives in the treatment of pancreatic adenocarcinoma. *World J. Gastroenterol. WJG* **21**, 9297–9316 (2015).
220. Barcellos-Hoff, M. H., Park, C. & Wright, E. G. Radiation and the microenvironment – tumorigenesis and therapy. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 867–875 (2005).
221. Burris, H. A. *et al.* Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **15**, 2403–2413 (1997).
222. Conroy, T. *et al.* FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. *N. Engl. J. Med.* **364**, 1817–1825 (2011).
223. Von Hoff, D. D. *et al.* Increased Survival in Pancreatic Cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine. *N. Engl. J. Med.* **369**, 1691–1703 (2013).
224. Springfield, C. *et al.* Chemotherapy for pancreatic cancer. *Presse Médicale* **48**, e159–e174 (2019).
225. Hargadon, K. M., Johnson, C. E. & Williams, C. J. Immune checkpoint blockade therapy for cancer: An overview of FDA-approved immune checkpoint inhibitors. *Int. Immunopharmacol.* **62**, 29–39 (2018).
226. Koikawa, K. *et al.* Targeting Pin1 renders pancreatic cancer eradicable by synergizing with immunochemotherapy. *Cell* **184**, 4753-4771.e27 (2021).
227. Jiang, M. *et al.* Chemotherapeutic drug-induced immunogenic cell death for nanomedicine-based cancer chemo-immunotherapy. *Nanoscale* **13**, 17218–17235 (2021).

228. Pol, J. *et al.* Trial Watch: Immunogenic cell death inducers for anticancer chemotherapy. *Oncoimmunology* **4**, e1008866 (2015).
229. Galluzzi, L., Buqué, A., Kepp, O., Zitvogel, L. & Kroemer, G. Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 97–111 (2017).
230. Chiaravalli, M. *et al.* Immunogenic Cell Death: An Emerging Target in Gastrointestinal Cancers. *Cells* **11**, 3033 (2022).
231. Ye, J. *et al.* Assessing the magnitude of immunogenic cell death following chemotherapy and irradiation reveals a new strategy to treat pancreatic cancer. *Cancer Immunol. Res.* **8**, 94–107 (2020).
232. Fucikova, J., Spisek, R., Kroemer, G. & Galluzzi, L. Calreticulin and cancer. *Cell Res.* **31**, 5–16 (2021).
233. Obeid, M. *et al.* Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat. Med.* **13**, 54–61 (2007).
234. Wemeau, M. *et al.* Calreticulin exposure on malignant blasts predicts a cellular anticancer immune response in patients with acute myeloid leukemia. *Cell Death Dis.* **1**, e104–e104 (2010).
235. Albakova, Z., Armeev, G. A., Kanevskiy, L. M., Kovalenko, E. I. & Sapozhnikov, A. M. HSP70 Multi-Functionality in Cancer. *Cells* **9**, 587 (2020).
236. Spisek, R. *et al.* Bortezomib enhances dendritic cell (DC)–mediated induction of immunity to human myeloma via exposure of cell surface heat shock protein 90 on dying tumor cells: therapeutic implications. *Blood* **109**, 4839–4845 (2007).
237. Michaud, M. *et al.* Autophagy-Dependent Anticancer Immune Responses Induced by Chemotherapeutic Agents in Mice. *Science* **334**, 1573–1577 (2011).
238. Michaud, M. *et al.* Subversion of the chemotherapy-induced anticancer immune response by the ecto-ATPase CD39. *OncolImmunology* **1**, 393–395 (2012).
239. Sims, G. P., Rowe, D. C., Rietdijk, S. T., Herbst, R. & Coyle, A. J. HMGB1 and RAGE in Inflammation and Cancer. in *Annual Review of Immunology, Vol 28* (eds. Paul, W. E., Littman, D. R. & Yokoyama, W. M.) vol. 28 367–388 (Annual Reviews, 2010).
240. Apetoh, L. *et al.* Toll-like receptor 4–dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat. Med.* **13**, 1050–1059 (2007).
241. Giordano, G. *et al.* Nano albumin bound-paclitaxel in pancreatic cancer: Current evidences and future directions. *World J. Gastroenterol.* **23**, 5875–5886 (2017).
242. Zhao, X. *et al.* Co-delivery of HIF1 α siRNA and gemcitabine via biocompatible lipid-polymer hybrid nanoparticles for effective treatment of pancreatic cancer. *Biomaterials* **46**, 13–25 (2015).
243. Baize, N. *et al.* Gemcitabine combined with oxaliplatin is safe and effective in patients with previously untreated advanced pancreatic adenocarcinoma. *Gastroentérologie Clin. Biol.* **29**, 1006–1009 (2005).
244. Poon, C., He, C., Liu, D., Lu, K. & Lin, W. Self-assembled nanoscale coordination polymers carrying oxaliplatin and gemcitabine for synergistic combination therapy of pancreatic cancer. *J. Controlled Release* **201**, 90–99 (2015).
245. Zhao, J. *et al.* Simultaneous Inhibition of Hedgehog Signaling and Tumor Proliferation Remodels Stroma and Enhances Pancreatic Cancer Therapy. *Biomaterials* **159**, 215–228 (2018).
246. Liu, J. *et al.* Pancreatic tumor eradication via selective Pin1 inhibition in cancer-associated fibroblasts and T lymphocytes engagement. *Nat. Commun.* **13**, 4308 (2022).
247. Ludwig, R., Teran, F. J., Teichgraber, U. & Hilger, I. Nanoparticle-based hyperthermia distinctly impacts production of ROS, expression of Ki-67, TOP2A, and TPX2, and induction of apoptosis in pancreatic cancer. *Int. J. Nanomedicine* **12**, 1009–1018 (2017).
248. Yang, C.-T. *et al.* ROS-induced HepG2 cell death from hyperthermia using magnetic hydroxyapatite nanoparticles. *Nanotechnology* **29**, 375101 (2018).

249. Cervantes, O. *et al.* A Ferrofluid with Surface Modified Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia and High ROS Production. *Molecules* **27**, 544 (2022).
250. Qian, X., Zhang, J., Gu, Z. & Chen, Y. Nanocatalysts-augmented Fenton chemical reaction for nanocatalytic tumor therapy. *Biomaterials* **211**, 1–13 (2019).
251. Berna, M. J. *et al.* CCK1 and CCK2 Receptors Are Expressed on Pancreatic Stellate Cells and Induce Collagen Production. *J. Biol. Chem.* **285**, 38905–38914 (2010).
252. Smith, J. P., Wang, S., Nadella, S., Jablonski, S. A. & Weiner, L. M. Cholecystokinin receptor antagonist alters pancreatic cancer microenvironment and increases efficacy of immune checkpoint antibody therapy in mice. *Cancer Immunol. Immunother.* **67**, 195–207 (2018).
253. Kidane, T. Z., Sauble, E. & Linder, M. C. Release of iron from ferritin requires lysosomal activity. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **291**, C445–455 (2006).
254. Hilger, I. & Kaiser, W. A. Iron oxide-based nanostructures for MRI and magnetic hyperthermia. *Nanomedicine Lond* **7**, 1443–1459 (2012).
255. Perigo, E. A. *et al.* Fundamentals and advances in magnetic hyperthermia. *Appl. Phys. Rev.* **2**, (2015).
256. Mertz, D., Sandre, O. & Bégin-Colin, S. Drug releasing nanoplatfoms activated by alternating magnetic fields. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **1861**, 1617–1641 (2017).
257. Carregal-Romero, S. *et al.* Magnetically triggered release of molecular cargo from iron oxide nanoparticle loaded microcapsules. *Nanoscale* **7**, 570–576 (2015).
258. Kolosnjaj-Tabi, J. *et al.* Heat-Generating Iron Oxide Nanocubes: Subtle ‘Destructurators’ of the Tumoral Microenvironment. *ACS Nano* **8**, 4268–4283 (2014).
259. Maier-Hauff, K. *et al.* 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 (2011).
260. Mahmoudi, K., Bouras, A., Bozec, D., Ivkov, R. & Hadjipanayis, C. Magnetic hyperthermia therapy for the treatment of glioblastoma: a review of the therapy’s history, efficacy and application in humans. *Int. J. Hyperth. Off. J. Eur. Soc. Hyperthermic Oncol. North Am. Hyperth. Group* **34**, 1316–1328 (2018).
261. Del Sol-Fernández, S. *et al.* Flower-like Mn-Doped Magnetic Nanoparticles Functionalized with $\alpha(v)\beta(3)$ -Integrin-Ligand to Efficiently Induce Intracellular Heat after Alternating Magnetic Field Exposition, Triggering Glioma Cell Death. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **11**, 26648–26663 (2019).
262. Liochev, S. I. The mechanism of ‘Fenton-like’ reactions and their importance for biological systems. A biologist’s view. *Met. Ions Biol. Syst.* **36**, 1–39 (1999).
263. Kehrer, J. P. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* **149**, 43–50 (2000).
264. Giwa, A.-R. A., Bello, I. A., Olabintan, A. B., Bello, O. S. & Saleh, T. A. Kinetic and thermodynamic studies of fenton oxidative decolorization of methylene blue. *Heliyon* **6**, e04454 (2020).
265. Wydra, R. J., Oliver, C. E., Anderson, K. W., Dziubla, T. D. & Hilt, J. Z. Accelerated generation of free radicals by iron oxide nanoparticles in the presence of an alternating magnetic field. *RSC Adv* **5**, 18888–18893 (2015).
266. Arbab, A. S. *et al.* A model of lysosomal metabolism of dextran coated superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles: implications for cellular magnetic resonance imaging. *NMR Biomed.* **18**, 383–389 (2005).
267. Javed, Y. *et al.* Biodegradation mechanisms of iron oxide monocrystalline nanoflowers and tunable shield effect of gold coating. *Small Weinh. Bergstr. Ger.* **10**, 3325–3337 (2014).
268. Lartigue, L. *et al.* Biodegradation of iron oxide nanocubes: high-resolution in situ monitoring. *ACS Nano* **7**, 3939–3952 (2013).

269. Kolosnjaj-Tabi, J. *et al.* The One Year Fate of Iron Oxide Coated Gold Nanoparticles in Mice. *ACS Nano* **9**, 7925–7939 (2015).
270. Rizzollo, F., More, S., Vangheluwe, P. & Agostinis, P. The lysosome as a master regulator of iron metabolism. *Trends Biochem. Sci.* **46**, 960–975 (2021).
271. Byrne, S. L. *et al.* Ferristatin II promotes degradation of transferrin receptor-1 in vitro and in vivo. *PloS One* **8**, e70199 (2013).
272. Hemery, G. *et al.* Monocore vs. multicore magnetic iron oxide nanoparticles: uptake by glioblastoma cells and efficiency for magnetic hyperthermia. *Mol. Syst. Des. Eng.* **2**, 629–639 (2017).
273. Gao, S. *et al.* Nanocatalytic Tumor Therapy by Biomimetic Dual Inorganic Nanozyme-Catalyzed Cascade Reaction. *Adv. Sci. Weinh. Baden-Wurtt. Ger.* **6**, 1801733 (2019).
274. Li, M. *et al.* A visual peroxidase mimicking aptasensor based on Pt nanoparticles-loaded on iron metal organic gel for fumonisin B(1) analysis in corn meal. *Biosens. Bioelectron.* **209**, 114241 (2022).
275. Kurz, T., Gustafsson, B. & Brunk, U. T. Intralysosomal iron chelation protects against oxidative stress-induced cellular damage. *FEBS J* **273**, 3106–3117 (2006).
276. Ghosh, P., Kumar, C., Samanta, A. N. & Ray, S. Comparison of a new immobilized Fe³⁺ catalyst with homogeneous Fe³⁺-H₂O₂ system for degradation of 2,4-dinitrophenol. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **87**, 914–923 (2012).
277. Yanatori, I., Yasui, Y., Noguchi, Y. & Kishi, F. Inhibition of iron uptake by ferristatin II is exerted through internalization of DMT1 at the plasma membrane. *Cell Biol. Int.* **39**, 427–434 (2015).
278. Cheng, Y. *et al.* Ferristatin II, an Iron Uptake Inhibitor, Exerts Neuroprotection against Traumatic Brain Injury via Suppressing Ferroptosis. *ACS Chem. Neurosci.* **13**, 664–675 (2022).
279. Boutry, S. *et al.* How to quantify iron in an aqueous or biological matrix: a technical note. *Contrast Media Mol. Imaging* **4**, 299–304 (2009).
280. Henoumont, C., Laurent, S. & Vander Elst, L. How to perform accurate and reliable measurements of longitudinal and transverse relaxation times of MRI contrast media in aqueous solutions. *Contrast Media Mol. Imaging* **4**, 312–321 (2009).
281. Wydra, R. J., Oliver, C. E., Anderson, K. W., Dziubla, T. D. & Hilt, J. Z. Accelerated generation of free radicals by iron oxide nanoparticles in the presence of an alternating magnetic field. *RSC Adv.* **5**, 18888–18893 (2015).
282. Sun, Q. *et al.* The impact of cancer-associated fibroblasts on major hallmarks of pancreatic cancer. *Theranostics* **8**, 5072–5087 (2018).
283. Nagathihalli, N. S. *et al.* STAT3 Mediated Remodeling of the Tumor Microenvironment Results in Enhanced Tumor Drug Delivery in a Mouse Model of Pancreatic Cancer. *Gastroenterology* **149**, 1932-1943.e9 (2015).
284. Scott, E. N., Gocher, A. M., Workman, C. J. & Vignali, D. A. A. Regulatory T Cells: Barriers of Immune Infiltration Into the Tumor Microenvironment. *Front. Immunol.* **12**, 702726 (2021).
285. Ullman, N. A., Burchard, P. R., Dunne, R. F. & Linehan, D. C. Immunologic Strategies in Pancreatic Cancer: Making Cold Tumors Hot. *J. Clin. Oncol.* **40**, 2789–2805 (2022).
286. van der Zee, J. *et al.* Comparison of radiotherapy alone with radiotherapy plus hyperthermia in locally advanced pelvic tumours: a prospective, randomised, multicentre trial. Dutch Deep Hyperthermia Group. *Lancet Lond. Engl.* **355**, 1119–1125 (2000).
287. Colombo, R. *et al.* Combination of intravesical chemotherapy and hyperthermia for the treatment of superficial bladder cancer: preliminary clinical experience. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **47**, 127–139 (2003).

288. Harima, Y. *et al.* A multicentre randomised clinical trial of chemoradiotherapy plus hyperthermia versus chemoradiotherapy alone in patients with locally advanced cervical cancer. *Int. J. Hyperthermia* **32**, 801–808 (2016).
289. Issels, R. D. *et al.* Neo-adjuvant chemotherapy alone or with regional hyperthermia for localised high-risk soft-tissue sarcoma: a randomised phase 3 multicentre study. *Lancet Oncol.* **11**, 561–570 (2010).
290. Raouf, I. *et al.* A Review on Numerical Modeling for Magnetic Nanoparticle Hyperthermia: Progress and Challenges. *J. Therm. Biol.* **91**, 102644 (2020).
291. Jäättelä, M. Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Ann. Med.* **31**, 261–271 (1999).
292. Gardai, S. J. *et al.* Cell-Surface Calreticulin Initiates Clearance of Viable or Apoptotic Cells through trans-Activation of LRP on the Phagocyte. *Cell* **123**, 321–334 (2005).
293. Santara, S. S. *et al.* The NK cell receptor NKp46 recognizes ecto-calreticulin on ER-stressed cells. *Nature* **616**, 348–356 (2023).
294. Chang, M., Hou, Z., Wang, M., Li, C. & Lin, J. Recent Advances in Hyperthermia Therapy-Based Synergistic Immunotherapy. *Adv. Mater.* **33**, 2004788 (2021).
295. Liu, X. *et al.* Ferrimagnetic Vortex Nanoring-Mediated Mild Magnetic Hyperthermia Imparts Potent Immunological Effect for Treating Cancer Metastasis. *ACS Nano* **13**, 8811–8825 (2019).
296. Chao, Y. *et al.* Iron Nanoparticles for Low-Power Local Magnetic Hyperthermia in Combination with Immune Checkpoint Blockade for Systemic Antitumor Therapy. *Nano Lett.* **19**, 4287–4296 (2019).
297. Thinnies, F. P. Opening up of plasmalemma type-1 VDAC to form apoptotic ‘find me signal’ pathways is essential in early apoptosis - evidence from the pathogenesis of cystic fibrosis resulting from failure of apoptotic cell clearance followed by sterile inflammation. *Mol. Genet. Metab.* **111**, 439–444 (2014).
298. Kugelberg, E. Cell death: Find me and eat me. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 131 (2016).
299. Ishikawa, T. *et al.* Phase II trial of combined regional hyperthermia and gemcitabine for locally advanced or metastatic pancreatic cancer. *Int. J. Hyperthermia* **28**, 597–604 (2012).
300. Zhu, H. *et al.* Oxaliplatin induces immunogenic cell death in hepatocellular carcinoma cells and synergizes with immune checkpoint blockade therapy. *Cell. Oncol. Dordr.* **43**, 1203–1214 (2020).
301. Quail, D. & Joyce, J. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* **19**, 1423–1437 (2013).
302. Chen, F. *et al.* New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. *BMC Med.* **13**, 45 (2015).
303. Schulz, M., Salamero-Boix, A., Niesel, K., Alekseeva, T. & Sevenich, L. Microenvironmental Regulation of Tumor Progression and Therapeutic Response in Brain Metastasis. *Front. Immunol.* **10**, 1713 (2019).
304. Geng, X. *et al.* Cancer-Associated Fibroblast (CAF) Heterogeneity and Targeting Therapy of CAFs in Pancreatic Cancer. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, 655152 (2021).
305. Erdogan, B. *et al.* Cancer-associated fibroblasts promote directional cancer cell migration by aligning fibronectin. *J. Cell Biol.* **216**, 3799–3816 (2017).
306. Yang, Y. *et al.* HIF-1 α promotes the migration and invasion of cancer-associated fibroblasts by miR-210. *Aging Dis.* **12**, 1794–1807 (2021).
307. Chen, Y. *et al.* Type I collagen deletion in α SMA+ myofibroblasts enhances immune suppression and accelerates progression of pancreatic cancer. *Cancer Cell* **39**, 548-565.e6 (2021).
308. Armstrong, T. *et al.* Type I Collagen Promotes the Malignant Phenotype of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* **10**, 7427–7437 (2004).

309. Shintani, Y., Hollingsworth, M. A., Wheelock, M. J. & Johnson, K. R. Collagen I Promotes Metastasis in Pancreatic Cancer by Activating c-Jun NH2-Terminal Kinase 1 and Up-regulating N-Cadherin Expression. *Cancer Res.* **66**, 11745–11753 (2006).

Titre : Ciblage thérapeutique de l'adénocarcinome pancréatique par hyperthermie magnétique ou ablation magnéto-mécanique.

Mots clés : cancer, hyperthermie magnétique, ablation mécanique, nanothérapie ciblée

Résumé : Grâce à leurs propriétés physico-chimiques et leur biocompatibilité les nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer (SPION) offrent de nombreux avantages. Elles répondent à l'application de champs magnétiques en libérant de l'énergie thermique en réponse à l'application d'un champ magnétique alternatif à haute fréquence (AMF), ou générant des forces mécaniques exposées à des champs magnétiques rotatifs à basse fréquence (RMF). Des essais cliniques utilisant le principe de l'hyperthermie magnétique ont été menés sur le glioblastome et le cancer de la prostate en association avec de la radiothérapie. Néanmoins, le bénéfice était négligeable en raison d'effets indésirables sur les tissus sains adjacents. Or, notre équipe a précédemment montré qu'il était possible d'induire spécifiquement la mort de cellules grâce à de faibles concentrations de SPION vectorisées qui s'accumulent spécifiquement dans les lysosomes de cellules ciblées. L'application d'AMF va induire la mort des cellules-cibles par hyperthermie magnétique intra-lysosomale ciblée MILH via la production de ROS dans le lysosome selon la réaction de Fenton qui nécessite des ions Fe et peut être catalysée par un pH acide et une augmentation de la température. Cependant, l'origine des ions Fe impliqués dans la réaction de Fenton n'a pas été élucidée. Une autre stratégie a également été établie dans l'équipe ; elle repose sur l'application de champs RMF qui vont générer des forces mécaniques à partir des SPION et induire la mort des cellules par ablation mécanique intra-lysosomale ciblée. Nous avons choisi comme modèle, l'adénocarcinome pancréatique particulièrement résistant aux thérapies conventionnelles et caractérisé par la présence d'un microenvironnement important et dense. Dans ce microenvironnement, les CAF (Cancer Associated Fibroblast) jouent un rôle clef, notamment par la sécrétion de matrice extracellulaire et de molécules solubles, limitant la pénétration et l'efficacité des traitements et contribuant à l'acquisition de résistance. Les cellules cancéreuses et les CAF peuvent surexprimer le récepteur de type 2 de la cholécystokinine (RCCK2). Ce récepteur membranaire présente la propriété de s'internaliser après fixation de son agoniste spécifique : la gastrine. Afin de cibler spécifiquement ces cellules, l'équipe a développé, des SPION, fonctionnalisées, à haut pouvoir chauffant et vectorisées avec de la gastrine (NF@Gastrine). Ces nanoparticules reconnaissent spécifiquement les cellules pancréatiques humaines MiaPaca2 et de CAF exprimant le récepteur CCK2 et s'accumulent dans leurs lysosomes. L'application d'AMF (275 kHz, 30mT) ou de RMF (1 Hz, 40 mT) induit spécifiquement la mort de ces cellules par MILH ou ablation mécanique intra-lysosomale ciblée. Nous avons comparé les effets de l'hyperthermie magnétique intra-lysosomale induits par des NF@Gastrine à ceux induits par les mêmes nanoparticules recouvertes d'une coque de silice hermétique (NF@SiO2@Gastrine), empêchant la libération de fer sous l'AMF, en présence ou non de Ferristatin-II, un inhibiteur de la capture de fer par la cellule. Cette étude a permis de mettre en évidence que le fer impliqué dans la réaction de Fenton à l'origine de la production de ROS par MILH provenait du pool endogène de la cellule et non de la libération de fer par les SPION soumises à l'AMF. Nous avons ensuite mis en évidence que l'hyperthermie magnétique et l'ablation mécanique intra-lysosomales augmentent l'expression de motifs moléculaires associés aux dégâts (DAMPs) à la surface des cellules MiaPaca2 et des CAF ayant internalisées les NF@Gastrine et stimulent leur phagocytose par des macrophages. Ces deux approches, pourraient donc être deux nouvelles stratégies capables de rétablir une immunité anti tumorale dans l'adénocarcinome pancréatique. Enfin, ces deux stratégies peuvent également modifier le phénotype pro-tumoral des CAF, en inhibant leur migration, diminuant leur sécrétion de collagène.

Title: Therapeutic targeting of pancreatic adenocarcinoma by magnetic hyperthermia or magneto-mechanical ablation.

Key words: cancer, magnetic hyperthermia, mechanical ablation, targeted nanotherapy

Abstract: Due to their physico-chemical properties, magnetic iron oxide nanoparticles (SPION) offer many advantages. They are biocompatible and functionalizable and therefore have already been used as a contrast agent for MRI diagnosis. They can respond to the application of magnetic fields: release thermal energy in response to the application of a high frequency alternating magnetic field (AMF), or generate mechanical forces when they are exposed to low frequency rotating magnetic fields (RMF). Clinical trials using magnetic hyperthermia mediated by SPION and AMF fields have been carried out on glioblastoma and prostate cancer in association with radiotherapy. Nevertheless, the benefit on life expectancy was negligible and adverse effects were noted on adjacent healthy tissues. But our team has previously shown that it is possible to specifically induce tumor cells and microenvironment cells death through the use of low concentrations of targeted magnetic nanoparticle that specifically accumulate in the lysosomes of the targeted cells. Then AMF fields specifically induce the death of target cells by targeted intra-lysosomal magnetic hyperthermia MILH. The mechanisms leading to the death of these cells have been characterized and show that it is initiated in the lysosomes by the generation of ROS according to the Fenton reaction which requires Fe ions and can be catalyzed by an acid pH and an increase of temperature (optimal at 40°C). However, the origin of the Fe ions involved in the Fenton reaction has not been elucidated. Another strategy was also established in the team; it is based on the application of RMF fields which will generate mechanical forces from the SPIONs and induce cell death by targeted intra-lysosomal mechanical ablation. We have chosen as a model, the pancreatic adenocarcinoma particularly resistant to conventional therapies and characterized by the presence of a large and dense microenvironment. In this microenvironment, CAFs (Cancer Associated Fibroblasts) play a key role, in particular through the secretion of extracellular matrix and soluble molecules, limiting the penetration and effectiveness of treatments and contributing to the acquisition of resistance. Cancer cells as well as CAF can overexpress the cholecystokinin receptor type 2 (RCCK2). This membrane receptor has the property of internalizing after binding of its specific agonist: the gastrin. The team has developed functionalized nanoparticles with high heating power vectorized with gastrin peptides (NF@Gastrin). These nanoparticles specifically recognize human pancreatic MiaPaca2 cells and CAFs expressing the CCK2 receptor and accumulate in their lysosomes. The application of AMF (275 kHz, 30 mT) or RMF (1 Hz, 40 mT) fields specifically induces the death of these cells by MILH or targeted intra-lysosomal mechanical ablation. First, we compared the effects of MILH induced by NF@Gastrin to those induced by the same nanoparticles covered with a hermetic silica shell (NF@SiO2@Gastrin), preventing the release of iron under the application of AMF field, in the presence or absence of Ferristatin-II, an inhibitor of iron uptake by the cell. This study demonstrate that the iron involved in the Fenton reaction at the origin of ROS production by MILH came from the endogenous pool of the cell and not from the release of iron by the iron oxide nanoparticles submitted to AMF. Then, we demonstrate that MILH and mechanical ablation increase the expression of damage-associated molecular patterns (DAMPs) on the surface of MiaPaca2 cells and CAFs having specifically internalized NF@Gastrin and stimulate their phagocytosis by macrophages. These two approaches, magnetic hyperthermia and mechanical ablation, could therefore be two new strategies to restore anti-tumor immunity in pancreatic adenocarcinoma. Finally, these two strategies can also modify the pro-tumoral phenotype of CAFs, by inhibiting their migration, decreasing their collagen secretion.