

Sommaire

INTRODUCTION.....	1
I-Cancer et microenvironnement tumoral	4
I.1-Le cancer.....	4
I.1.1-Caractéristiques essentielles du cancer	4
I.1.2. Le cancer du pancréas	6
I.2-Les microenvironnements non pathogène et tumoral	11
I.2.1. Le microenvironnement non pathogène.....	11
I.2.2. Le microenvironnement tumoral dans la carcinogénèse	12
I.2.3. Les CAFs, architectes du remodelage du microenvironnement tumoral	20
I.3. Résistances aux traitements médiées par les CAFs	33
I.3.1. Barrière physique	34
I.3.2. Actions de Contacts	35
I.3.3. Sécrétome.....	36
I.4.Traitement visant le microenvironnement	38
I.4.1. Reprogrammation et normalisation du microenvironnement	38
I.4.2. Modulation directe des sécrétomes et des signalisations paracrines	41
I.4.3. Destruction du microenvironnement.....	42
I.4.4. Combinaison de plusieurs stratégies	44
II- Nanoparticules et champs magnétiques pour de nouvelles thérapies anticancéreuses	47
II.1. Les nanoparticules et leurs utilisations biomédicales.....	47
II-1.1-Nanoparticules	47
II.1.2. Nanoparticules développés pour les applications biomédicales.....	48
II.1.3. Devenir in vivo des nanoparticules	52
II.2.-Champs magnétiques et leurs effets sur la matière	57
II.2.1-Définition du magnétisme et des champs magnétiques	57
II.2.2- Sources de champ magnétique	58
II.2.3-Comportement des matériaux magnétiques	59
II.2.4- Propriétés et applications des états magnétiques des nanoparticules magnétiques.....	63

II.3.-Mort cellulaire provoquée par des champs magnétiques à effet mécanique.....	67
II.3.1- Forces mécaniques dans le vivant	67
II.3.2- Caractéristiques clés des nanoparticules magnétiques	68
II.3.3- Influence des paramètres des CMEM sur la mort cellulaire	71
II.3.4- Mécanismes de mort et perturbations cellulaires engendrés	81
II.3.4- Etudes in vivo.....	88
Conclusion de la bibliographie.....	92
III-RESULTATS	93
III.1. Première partie des résultats : Mort cellulaire des CAFs provoquée par l'application de forces mécaniques exercées par des NPM soumises à un CMEM rotatif.....	93
III.2. Deuxième partie des résultats : Observation en temps réel des phénomènes engendrés les forces mécaniques exercées par des NPM en présence de CMEM	131
IV-CONCLUSION ET PERSPECTIVES	147
ANNEXES	I
BIBLIOGRAPHIE	I

INTRODUCTION

Le cancer est cause de décès pour des millions de nouvelles personnes chaque année à travers le monde. En 2018, l'incidence du cancer du pancréas dans sa globalité était de 456 000 pour environ 430 000 décès.

L'efficacité des traitements anticancéreux actuels est limitée par la faible concentration des traitements parvenant jusqu'au site de la tumeur, ainsi que par le développement de résistances acquises des cellules cancéreuses à ces traitements.

Pendant longtemps, la communauté scientifique a estimé que ces résistances et l'agressivité de chaque cancer étaient dues aux génotypes des cellules cancéreuses. Néanmoins ces dernières années le microenvironnement tumoral a été davantage étudié. Son rôle prépondérant dans la faible pénétration des agents chimiothérapeutiques et dans le développement de résistance des cellules cancéreuses, ainsi que sa participation dans la tumorigenèse, ont été mis en évidence.

Le microenvironnement tumoral est l'environnement au sein duquel se développent les cellules cancéreuses. Les adénocarcinomes pancréatiques présentent généralement un microenvironnement dense, donc hypoxique, représentant jusqu'à 90% de volume de la tumeur, et caractérisé par une forte immunosuppression.

Les fibroblastes associés au cancer (CAFs) sont des composants du microenvironnement tumoral impliqués dans diverses voies d'actions protumorales. Tout d'abord, les CAFs produisent des facteurs (hormones, facteurs de croissance, chimiokines ...) favorisant la croissance tumorale et participent à l'acquisition de résistances des cellules cancéreuses aux traitements anticancéreux. Ensuite, ils participent à la rétention physique des agents chimiothérapeutiques dans le microenvironnement tumoral via leur action sur la rigidification de la matrice extracellulaire, leur production de molécules de cette même matrice et leur internalisation d'agents de chimiothérapie. Dans ce contexte, l'éradication des CAFs constitue une stratégie intéressante pour inhiber la progression du cancer, diminuer la résistance au cancer et augmenter l'efficacité des thérapies conventionnelles.

Afin d'augmenter l'efficacité des traitements actuels, il est également essentiel d'explorer de nouvelles voies thérapeutiques, notamment grâce au ciblage des traitements anticancéreux. Depuis une vingtaine d'années, les nanothérapies sont en plein essor et leurs

diverses applications biomédicales sont en cours d'étude. Dans le cas des cancers, de nombreuses stratégies sont envisagées, en monothérapie ou combinaison, et parmi celles-ci les nanoparticules superparamagnétiques constituent une piste intéressante.

En effet, leur utilisation couplée à l'application de champs magnétiques permet d'imaginer un grand nombre de solutions thérapeutiques. Les champs magnétiques hautes fréquences peuvent induire l'échauffement de nanoparticules magnétiques et donc provoquer une élévation de température. L'application des champs magnétiques hautes fréquences pour des thérapies anticancéreuses a été étudiée et testée au stade clinique. Cependant cette approche thérapeutique pose quelques problèmes comme le risque potentiel que représente l'exposition des patients à des champs haute fréquence ou encore la difficulté technologique de développer des générateurs de champs magnétiques à des fins thérapeutiques à l'échelle humaine. Une autre stratégie exploitant les propriétés des nanoparticules magnétiques permettrait de s'affranchir de ces deux limites. En effet, les champs magnétiques basses fréquences, eux, entraînent le mouvement des particules ou nanoparticules magnétiques, qui peuvent ainsi exercer des forces mécaniques sur leur environnement et induire la mort par stress mécanique des cellules avec lesquelles elles sont en contact.

Les nanoparticules magnétiques peuvent être vectorisées avec des molécules à leur surface, afin de cibler spécifiquement un tissu, un type cellulaire, un récepteur. Elles peuvent cibler la membrane des cellules, ou bien être internalisée dans les lysosomes.

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) constituent la plus grande famille de récepteurs membranaires et régulent, directement ou indirectement, tous les processus physiologiques de l'organisme. Ils sont également impliqués dans de nombreuses pathologies, incluant les cancers. C'est pourquoi ils constituent aujourd'hui la cible d'environ 30% des médicaments.

Des récepteurs de cette famille, les récepteurs à la cholécystokinine 1 et 2, surexprimés dans le cancer du pancréas, ont récemment été identifiés dans des CAFs et un lien a été fait entre leur expression et la production de matrice extracellulaire. Ainsi, ces récepteurs semblent indiqués pour cibler les CAFs à l'aide de ligands qui leurs sont spécifiques.

Nous avons donc cherché à développer une approche thérapeutique ciblée innovante permettant d'induire la mort des CAFs à l'aide de nanoparticules magnétiques et de champs magnétiques basses fréquences.

Nous avons dans un premier temps cherché à établir la preuve de concept de l'induction de la mort cellulaire de CAFs via l'application de forces mécaniques exercées par des

nanoparticules magnétiques. Pour cela nous avons utilisé des nanoparticules vectorisées avec un agoniste spécifique du récepteur à la cholécystokinine 2 afin que les nanoparticules se lient à ce récepteur et soient internalisées dans les lysosomes des CAFs. Nous avons également cherché à optimiser les effets délétères provoqués sur les CAFs. Ces travaux ont conduit à la mise en lumière de paramètres de champs magnétiques plus à même que d'autres d'induire la mort des CAFs par application de forces mécaniques

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à disséquer les mécanismes de la mort cellulaire engendrée par les forces mécaniques exercées dans les lysosomes des CAFs. Nos travaux ont d'abord porté sur l'identification des événements et acteurs impliqués dans la voie de signalisation de mort cellulaire.

Nous avons ensuite initié une étude cinétique du mécanisme afin d'identifier les implications précoces et les phénomènes déclencheurs. Nous avons pu observer en temps réel l'effet du traitement sur les CAFs pendant l'application du champ magnétique.

Ce manuscrit s'articulera en trois parties. La première partie sera consacrée à une étude bibliographique visant à définir le contexte scientifique de nos travaux. Le chapitre I portera sur le cancer, le rôle du microenvironnement tumoral et plus particulièrement des CAFs. Le chapitre II portera sur l'utilisation de nanoparticules et de champs magnétiques pour des traitements anticancéreux et plus particulièrement sur les travaux étudiant la combinaison de nanoparticules magnétiques (NPM) et de champs magnétiques basse fréquence, ou champ magnétiques à effets mécaniques (CMEM). La seconde partie du manuscrit présentera les résultats des travaux de thèse. Enfin, la troisième partie traitera des conclusions et des perspectives du projet.

I-Cancer et microenvironnement tumoral

I.1-Le cancer

I.1.1-Caractéristiques essentielles du cancer

Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération cellulaire anarchique au sein d'un tissu, jusqu'à apparition d'une tumeur.

Les cellules tumorales dérivent d'une même cellule initiatrice et possèdent des particularités liées à l'accumulation d'altérations de leur génome. Ces altérations se font au niveau de proto-oncogènes ou bien d'anti-oncogènes (appelés également gènes suppresseurs de tumeurs).

Les proto-oncogènes sont définis comme étant des gènes susceptibles de devenir transformants, c'est-à-dire capables de conférer expérimentalement le phénotype cancéreux à une cellule normale eucaryote, lorsque leurs altérations sur-activent leur fonction d'origine. Ils deviennent alors des oncogènes. Les proto-oncogènes codent en général : des facteurs de croissance (ex : Fibroblast Growth Factor, FGF), des récepteurs transmembranaires de facteurs de croissance (ex : récepteur à l'EGF, Epidermal Growth Factor), des protéines G ou protéines membranaires liant le GTP, des tyrosines protéine-kinases membranaires, des protéine-kinases cytosoliques, des protéines à activité nucléaire (*fos*, *jun*, *c-myc*, *erbA*).

Les anti-oncogènes/gènes suppresseurs de tumeurs sont quant à eux des gènes qui, dans les conditions normales, contrairement aux proto-oncogènes, ne favorisent pas la prolifération cellulaire mais la régulent négativement. Leurs fonctions initiales sont d'inhiber le cycle cellulaire à une étape précise (ex: p53), ou de favoriser l'apoptose (ex: Bim). Ainsi les mutations diminuant ou éliminant leurs fonctions sont transformantes, menant à l'apparition de cancers.

Les cellules cancéreuses peuvent perdre, conserver, ou acquérir des caractéristiques aux cours des divisions cellulaires, ce qui confère aux cellules d'une même tumeur une assez grande diversité génétique.

Les propriétés suivantes sont inhérentes aux cellules cancéreuses [1] :

- **la perte d'homéostasie** : contrairement aux cellules normales elles n'ont plus besoin de stimulus pour entrer en division cellulaire et sont donc indépendantes vis-à-vis des signaux qui stimulent la prolifération.
- **l'immortalité** : elles sont insensibles aux signaux et mécanismes antiprolifératifs.
- **une capacité proliférative illimitée** : une cellule saine peut se diviser 50 à 60 fois maximum tandis qu'une cellule cancéreuse peut se diviser à l'infini.
- **une capacité à provoquer l'angiogenèse** : les cellules cancéreuses peuvent stimuler la formation de vaisseaux sanguins dans la masse tumorale à partir de vaisseaux préexistants au voisinage de la tumeur. Les vaisseaux formés permettent l'apport d'oxygène et de nutriments nécessaires au développement de la tumeur [2].
- **l'acquisition d'un pouvoir invasif** : Les cellules tumorales possèdent la capacité d'envahir les tissus environnants. Ceci passe en partie par la perturbation des mécanismes d'adhésion cellulaire [3], par exemple par la désactivation ou la diminution de l'expression de molécules d'adhésion [4]. Puis, en migrant et en circulant à l'intérieur des vaisseaux sanguins elles peuvent se disséminer dans l'organisme et former d'autres tumeurs, appelées des métastases.

Lorsque seules les trois premières caractéristiques précédemment citées ont été exploitées par les cellules cancéreuses, et qu'elles prolifèrent au sein d'un tissu, le cancer est une masse de cellules qui survit dans l'organisme. Après le début de l'angiogenèse, la tumeur grossit jusqu'à atteindre la lame basale. Si la croissance tumorale continue et que la membrane basale se rompt, le cancer devient invasif. Les cellules cancéreuses se détachent, migrent et forment des métastases.

*Les différentes caractéristiques listées ci-dessus sont depuis un certain temps utilisées pour décrire le cancer. Néanmoins, d'autres tentatives de caractérisation ont depuis été proposées, en ajoutant les connaissances acquises par la communauté scientifique. Ainsi, une publication de Yousef Ahmed Fouad et Carmen Aanei liste le cancer comme étant caractérisé par : une croissance sélective et un avantage prolifératif, une réponse au stress altérée favorisant la survie globale, la vascularisation, l'invasion et les métastases, une modulation métabolique, une modulation immunitaire, et pour finir un **microenvironnement adjuvant** [5].*

I.1.2. Le cancer du pancréas

I.1.2.a- Epidémiologie et traitements

La majorité des tumeurs malignes du pancréas sont des adénocarcinomes. Ils représentent à eux seuls 90% des tumeurs pancréatiques non endocrines. L'adénocarcinome canalaire pose un problème de santé majeur, avec environ 367 000 nouveaux cas diagnostiqués dans le monde en 2015 et 359 000 décès la même année. En 2018, l'incidence du cancer du pancréas dans sa globalité était de 456 000 pour environ 430 000 décès [6]. C'est l'une des tumeurs solides les plus agressives et les plus meurtrières. Les statistiques de survie n'ont pas changé depuis une décennie : la plupart des patients survivent peu à la première année suivant le diagnostic et le taux de survie sur 5 ans avoisine les 7%.

Le cancer du pancréas est associé à un très mauvais pronostic pour plusieurs raisons :

- il est généralement diagnostiqué à un stade avancé, ce qui est souvent dû à des symptômes non spécifiques voire à une maladie asymptomatique (plus de 80% des patients se voient diagnostiqués tardivement).
- aucun marqueur tumoral sensible et spécifique n'est identifié et il est difficile de détecter par imagerie les tumeurs à un stade précoce.
- il est agressif et présente des métastases précoces qui empêchent la résection chirurgicale curative chez la plupart des patients.
- il se caractérise par une forte résistance à la plupart des options de traitement conventionnelles, notamment la chimiothérapie et la radiothérapie
- il présente de multiples altérations génétiques et épigénétiques et des microenvironnements tumoraux complexes et denses.

Actuellement pour traiter le cancer du pancréas, la chirurgie est proposée seulement lorsque le diagnostic est posé suffisamment tôt, et en l'absence de métastases. La localisation, la taille de la tumeur, et l'état général du patient sont également pris en compte avant de réaliser l'acte. Seuls 10 à 20% des cancers du pancréas exocrine correspondent à ces critères. Dans le cas contraire, la chimiothérapie est préconisée, soit seule soit combinée à de la radiothérapie. Les différentes molécules généralement utilisées pour la chimiothérapie, seules ou associées, sont la gemcitabine, le 5-FU (5-Fluorouracile), l'irinotécan, l'oxaliplatine et le nab-paclitaxel. Parfois, une radiothérapie est proposée en cas de tumeur non opérable mais sans métastases à distance [7].

Les effets secondaires des traitements anticancéreux sont en partie dus à leur manque de spécificité, car ils endommagent également des cellules saines. Une augmentation de la spécificité des traitements permettrait à la fois de diminuer les effets secondaires, mais également d'augmenter l'efficacité de ces traitements. Par conséquent de nombreux travaux ont été menés afin de mettre en lumière des cibles potentielles permettant cette augmentation de la spécificité. Dans le cas du cancer du pancréas, un certain nombre de chercheurs ont travaillé entre autre sur les récepteurs à la cholécystokinine.

I.1.2.b- Expression des récepteurs à la cholécystokinine

Un grand nombre de preuves indiquent que la cholécystokinine et la gastrine, deux agonistes des récepteurs à la cholécystokinine (RCCKs) agissent en tant que facteurs de croissance et d'invasion via l'activation de leurs récepteurs, favorisant ainsi le développement et la progression des cancers.

Plusieurs études visant à la détermination des niveaux d'expression des RCCKs dans les tumeurs humaines ont été rapportées, et la surexpression de ces récepteurs dans le cancer du pancréas a notamment été mise en évidence (*cf. partie I.1.2.b-B ci-dessous*)

- **A) Généralités sur les RCCKs et leur fonctionnement**

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) sont une grande famille de récepteurs qui détectent des molécules à l'extérieur de la cellule et activent des voies de signalisation menant à des réponses cellulaires. Les récepteurs à la cholécystokinine appartiennent à la sous-famille A (selon la classification de Kolakowski) de cette famille de récepteurs, autrement appelée la famille des récepteurs "rhodopsins-like".

Deux profils pharmacologiques différents ont été identifiés chez les RCCKs. En se basant sur leur localisation dans l'organisme, le premier fut nommé RCCK-A pour Alimentary, et le second RCCK-B pour Brain. Néanmoins, même si on les trouve encore parfois sous ces dénominations, le comité de l'Union Internationale de Pharmacologie (IUPHAR) recommande les appellations suivantes : le RCCK-A a été renommé RCCK1, et le RCCK-B, RCCK2 [8]. Un troisième récepteur est parfois décrit, mais il s'agit d'un variant d'épissage du RCCK2. Le RCCK1 et le RCCK2 sont homologues à environ 48%.

Les RCCKs diffèrent par leurs distributions tissulaires dans les tissus sains. En effet, le RCCK1 est majoritairement localisé en périphérie tandis que le RCCK2 est préférentiellement exprimé au niveau du cerveau [9].

Comme ces deux récepteurs appartiennent à la famille des RCPG, ils présentent sept segments hydrophobes, correspondant à sept domaines transmembranaires. Leur extrémité N-terminale est extracellulaire et leur extrémité C-terminale, intracellulaire (**Fig.1**). Le site de liaison des récepteurs de la sous famille A se présente sous la forme d'une cavité créée par les domaines transmembranaires où vient se loger le ligand.

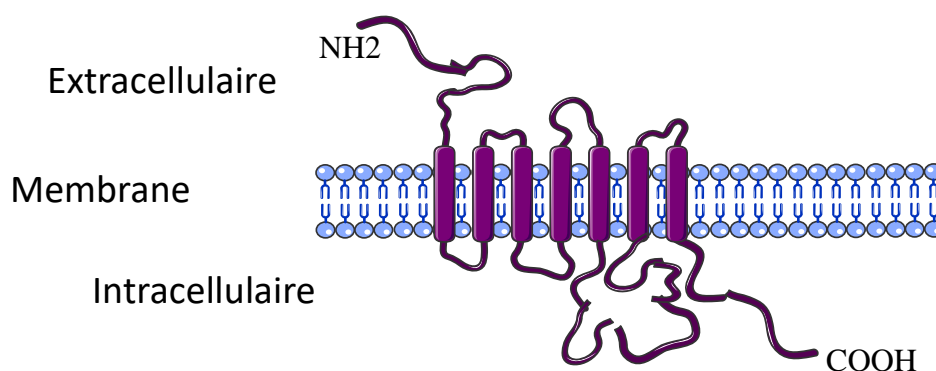


Figure 1- Représentation schématique d'un RCCK et de ses domaines transmembranaires

Le RCCK1 et le RCCK2 sont internalisés dans la cellule quelques minutes après leur stimulation par un agoniste [10], [11]. L'endocytose de ces récepteurs est dite dépendante de la clathrine (**Fig.2**). Cette internalisation passe par une invagination de la membrane formant des structures spécialisées appelées les puits recouverts de clathrines. Ces mêmes clathrines qui servent à l'invagination de la membrane recrutent des molécules de dynamine-GTP qui en se polymérisant forment un anneau permettant d'étrangler la membrane plasmique et ainsi de finir de former la vésicule. L'hydrolyse du GTP conduit au changement conformationnel de l'anneau provoquant la déconstruction du manteau de clathrine, de l'anneau, et le relargage de la vésicule dans le cytoplasme.

Les différentes vésicules d'endocytose fusionnent ensuite pour former un compartiment de forme irrégulière nommé endosome précoce, où s'effectue le tri entre les récepteurs destinés au recyclage et ceux destinés à la dégradation [12]. Cet adressage se fait en fonction de la nature du récepteur mais également en fonction de celle du ligand. Ceux destinés au recyclage sont ré-adressés à la membrane via des endosomes de recyclage, reconnaissables par leur forme de tubules interconnectés. L'endosome précoce contenant les récepteurs destinés à la dégradation

se transforme tout d'abord en endosome tardif, un compartiment de pH 6.5 caractérisé par de nombreuses invaginations et des vésicules internes. Cet endosome se transforme ensuite en lysosome (ou lysosome secondaire) dans lequel il sera dégradé. Ces transformations progressives se font *via* la fusion avec des lysosomes dits primaires (vésicules remplies d'hydrolases) issus du réseau trans-golgien. Au cours de ces transformations le compartiment vésiculaire s'acidifie (jusqu'à un PH=4/5) sous l'action d'une pompe H^+ -ATPase type V. En ce qui concerne les ligands, lors du passage dans les endosomes de tri, ils sont la plupart du temps séparés du récepteur (s'ils ne le sont pas le récepteur est détruit) et sont adressés à certains compartiments cellulaires selon leur nature.

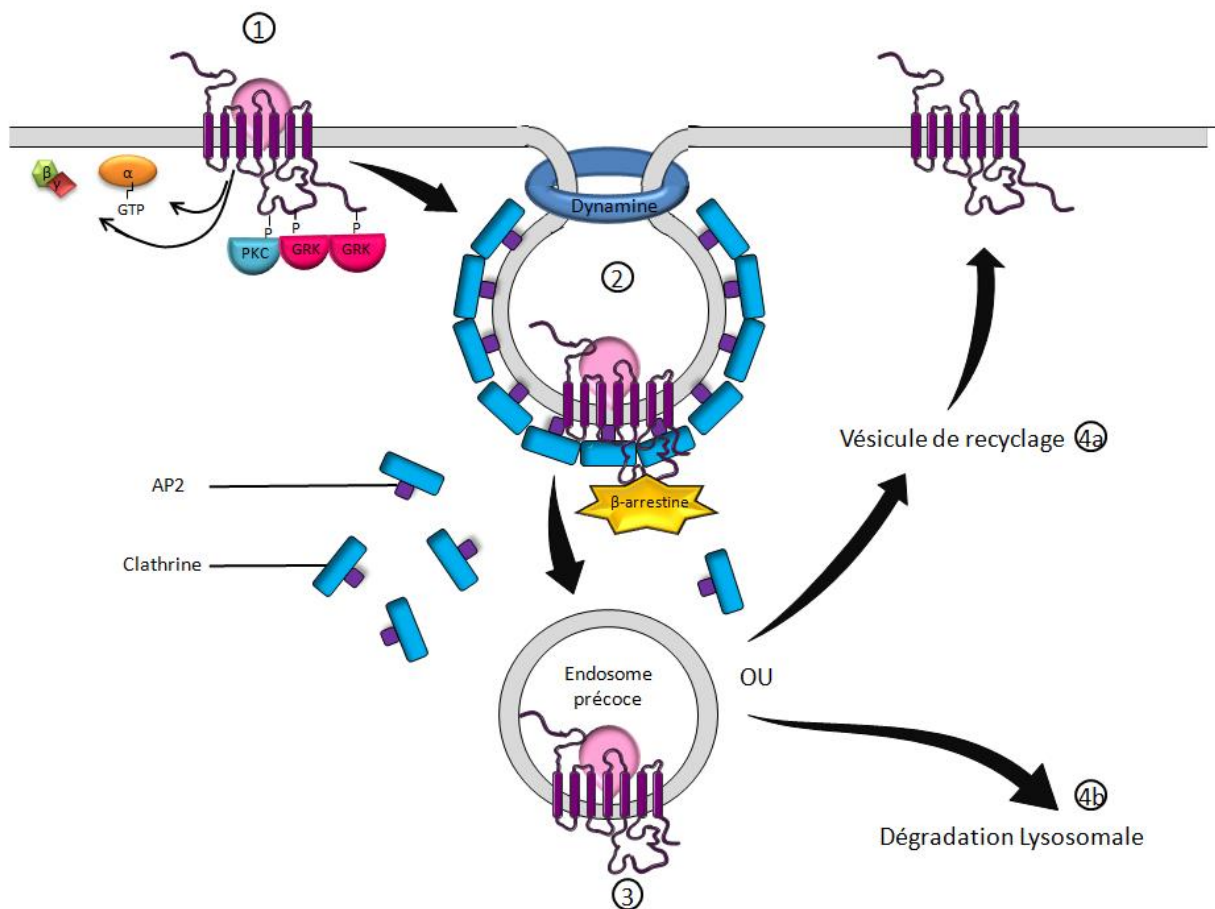


Figure 2- Représentation schématique de l'internalisation d'un RCKK. 1) Désensibilisation du récepteur via sa phosphorylation par des kinases 2) Endocytose dépendante de la clathrine, formation d'un puits et étranglement de la vésicule par un anneau de dynamine 3) Formation d'un endosome précoce 4a) Recyclage du récepteur 4b) Dégradation dans les lysosomes

L'utilisation d'un agoniste, comme la cholécystokinine ou la gastrine, pour le ciblage des RCKKs entraîne donc son internalisation dans les cellules. Il est également possible d'utiliser un antagoniste ne stimulant pas l'internalisation ou encore de mettre au point un anticorps ciblant le récepteur.

- **B) Présence et implications des récepteurs dans le cancer du pancréas**

En plus de leur mode de fonctionnement, les recherches sur les RCCKs ont permis de mettre en lumière leur surexpression dans le cancer du pancréas et leur implication dans son développement. En effet, un certain nombre d'études ont montré que le RCCK1 mais aussi le RCCK2 sont surexprimés dans le cancer du pancréas humain [13]–[16]. Dans les tissus sains du pancréas en revanche, le récepteur CCK2 est présent mais en faible densité comparativement aux tissus cancéreux [17]. Le RCCK2 est surexprimé dans les vipomes tandis que le RCCK1 y est rare [18].

Les RCCKs ont un rôle dans la progression des lésions PanIN car, lorsque ces récepteurs sont bloqués par un antagoniste (proglumide), la fréquence de ces lésions est moins élevée dans le modèle murin [19]. La gastrine, un agoniste des RCCKs, est exprimée durant la carcinogénèse pancréatique dans les lésions pré-néoplasiques et néoplasiques [20], [21] et est surexprimée chez l'homme dont elle régule la croissance du cancer pancréatique par un mécanisme autocrine [22]–[24]. Quand l'expression de la gastrine est inhibée par un ARN interférent, la croissance du cancer du pancréas est diminuée ainsi que le nombre de métastases [25]–[27]. De la même manière, si l'expression RCCK2 est inhibée [28] ou si tous les RCCKs sont bloqués avec un antagoniste [15], la croissance du cancer pancréatique est ralentie. La gastrine et la CCK stimulent la croissance du cancer pancréatique via des récepteurs CCK [15], [29].

Cependant il semble que seul le RCCK2 et son variant sont responsables de la croissance des adénocarcinomes pancréatiques [17]. De plus il semble que l'expression de ce récepteur puisse mener à l'apparition de cancers [21].

Malgré toutes les études menées à ce sujet, les rôles exacts joués par les RCCK1 et RCCK2 dans la carcinogénèse pancréatique humaine sont encore flous et nécessitent d'autres études pour être déterminés plus précisément. Néanmoins, ces récepteurs pourraient constituer de bonnes cibles pour des traitements anticancéreux visant les cellules tumorales pancréatiques.

Comme nous l'avons évoqué dans la partie 1.1, le cancer n'est pas seulement caractérisé par ses cellules dites cancéreuses, mais également par le microenvironnement adjuvant qui les entoure. Il semble donc primordial de comprendre les interactions entre le microenvironnement tumoral et les cellules cancéreuses, mais aussi de trouver des cibles en son sein permettant de réduire son influence dans le développement de la tumeur.

I.2-Les microenvironnements non pathogène et tumoral

I.2.1. Le microenvironnement non pathogène

Le microenvironnement est l'environnement immédiat qui entoure une cellule, un groupe de cellules, ou un tissu, et qui participe à son développement mais également à son maintien architectural et fonctionnel. Le microenvironnement est complexe, pluriel et dynamique. Il est principalement composé de vaisseaux sanguins, de cellules du système immunitaire, de fibroblastes, de facteurs solubles sécrétés par les cellules (chimiokines, facteurs de croissance, hormones, enzymes...), d'adipocytes et de matrice extracellulaire (MEC).

La MEC est composée de différents éléments formant un maillage tridimensionnel : des macromolécules formant un gel hydraté (acide hyaluronique, protéoglycanes), des protéines fibrillaires (collagènes, élastines) et des protéines structurales (laminines, fibronectines).

Les propriétés physiques de la MEC (sa rigidité, sa porosité, son agencement spatial et son orientation ou topographie) sont déterminantes pour son rôle de maintien structurel et fonctionnel des tissus. Ces propriétés contrôlent également des voies de prolifération, de différenciation et de signalisation des cellules. Les propriétés biochimiques de la MEC permettent des interactions entre les cellules et leur environnement. En régulant la biodisponibilité et la distribution des facteurs de croissance, la MEC crée des gradients internes au sein d'un tissu, établit des surfaces d'adhésion et forme des barrières de diffusion entre les couches cellulaires [30]. Grâce à sa résistance à la traction, à sa capacité de compression et à son élasticité, la MEC assure la protection des cellules qu'elle entoure en jouant le rôle de tampon, maintenant l'homéostasie extracellulaire et la rétention d'eau. Les différents types cellulaires présents interagissent avec la MEC pour garder une localisation précise dans le microenvironnement ou à l'inverse pour se déplacer dans celui-ci. La composition et la structure de la MEC sont adaptées précisément aux besoins des cellules environnantes grâce à la libération de facteurs solubles tels que les facteurs de croissance et les chimiokines [31].

Les facteurs solubles ont eux aussi un rôle essentiel dans la modulation du microenvironnement. Ils peuvent activer des voies de signalisation modifiant l'expression de protéines contrôlant par exemple le cycle cellulaire, la morphologie de la cellule, ou bien son ancrage à la MEC. Ils peuvent également recruter des cellules du système immunitaire ou encore initier et réguler l'angiogenèse.

Les fibroblastes (également appelés cellules de soutien) sont des cellules fusiformes ou étoilées avec de longs prolongements cytoplasmiques, très aplaties et allongées. Elles sont présentes au niveau des tissus conjonctifs et ont pour fonction principale de maintenir l'intégrité structurale de ces tissus en sécrétant des macromolécules de la MEC. Les fibroblastes jouent également un rôle important dans les processus de cicatrisation et sont parmi les premiers acteurs initiant les mécanismes d'inflammation. Ils synthétisent des macromolécules de la MEC et produisent d'autres molécules telles que les cytokines et les facteurs de croissance [32].

I.2.2. Le microenvironnement tumoral dans la carcinogénèse

Le microenvironnement tumoral est donc l'environnement cellulaire au sein duquel évoluent les cellules cancéreuses, et qui interagit avec elles (**Fig.3**).

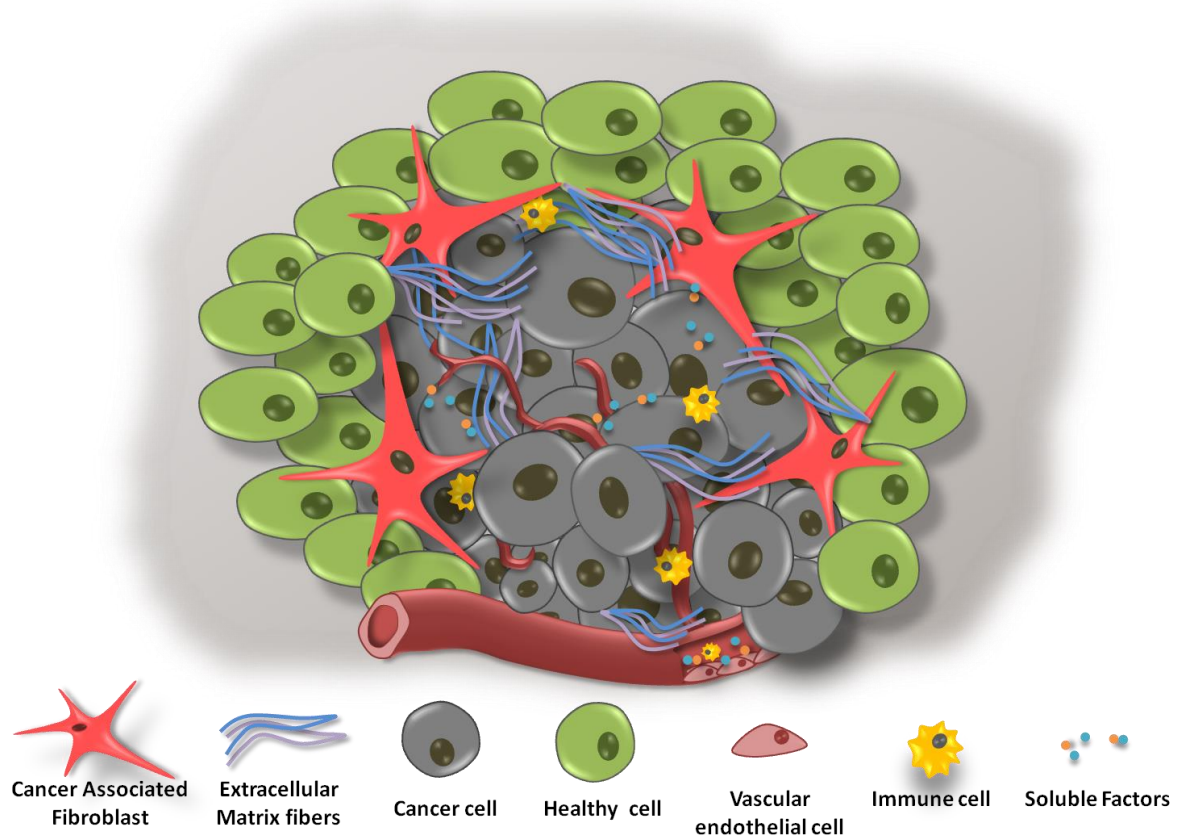


Figure 3- Représentation schématique d'une tumeur et de son microenvironnement

En 1889, le chirurgien Stephen Paget suggère une théorie, la théorie du "seed and soil", afin d'expliquer la distribution des métastases dans les organes. En effet, il observe que celle-ci ne se fait pas aléatoirement : après migration les cellules cancéreuses (représentées par le concept de graine, « seed ») s'implantent et croissent préférentiellement dans des localisations spécifiques (représentées par le concept de sol, « soil »). C'est la première fois que le concept

de microenvironnement tumoral est évoqué, et que son rôle est décrit comme essentiel au développement de la pathologie. Depuis, il a été démontré que le microenvironnement tumoral joue en effet un rôle capital dans le développement d'un cancer [33].

Le caractère invasif d'une tumeur a longtemps été considéré comme étant le fait des génotypes des cellules tumorales qui la composent. Les cancers étaient d'ailleurs seulement considérés comme des maladies hétérogènes issues de mutation diverses menant à des cellules cancéreuses. Désormais, il est également établi que le microenvironnement tumoral joue un rôle important dans le développement d'un cancer : il participe à la croissance des vaisseaux sanguins (angiogenèse), à la progression de la tumeur, et à sa propagation [34]. Il est également évident que la diversité des tumeurs est liée de surcroît à la diversité de la composition de leurs microenvironnements ; c'est-à-dire aux différentes proportions des différents types cellulaires qui le composent, aux états d'activation des cellules, etc...[1]

Ainsi les composants principaux du microenvironnement tumoral sont modifiés par rapport à ceux d'un microenvironnement dit sain. Leurs propriétés sont altérées et exploitées par les cellules cancéreuses qui s'en servent et les détournent pour assurer leur propre survie.

I.2.2.a- Rôles et particularités des composants du microenvironnement tumoral

- **A) Les vaisseaux**

Les cellules vasculaires sont des cellules endothéliales qui forment les capillaires sanguins ou lymphatiques, ainsi que les veines et les artères. Ces cellules se multiplient à partir d'un réseau vasculaire préexistant, s'infiltrant dans le microenvironnement tumoral et forment un nouveau réseau vasculaire. Cette angiogenèse initiée par la tumeur est très mal régulée comparativement à une angiogenèse physiologique : les nouveaux vaisseaux formés sont désorganisés et présentent une structure anormale. Ils sont dilatés, tortueux, hémorragiques et les connections entre vaisseaux sont anarchiques [35]. L'angiogenèse est essentielle au développement de la tumeur. Pour qu'une tumeur se développe et grossisse de manière significative, elle doit disposer d'un apport sanguin suffisant ; si la tumeur est incapable de se procurer l'apport sanguin dont elle a besoin, les cellules cancéreuses meurent, la croissance tumorale est arrêtée [36].

Les cellules endothéliales composant ces vaisseaux possèdent néanmoins des caractéristiques différentes des cellules vasculaires des tissus sains : leur prolifération, leur

migration et leurs interactions cellules-cellules ou cellules-MEC sont altérées [36]. En effet, elles surexpriment certaines protéines membranaires comme le récepteur du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) [37] mais également le VEGF lui-même, ce qui leur permet de proliférer abondamment. Les cellules endothéliales ont également une morphologie anormale et des jonctions intercellulaires lâches, ce qui augmente la taille des fenestrations [38]. Les péricytes qui assurent normalement l'intégrité des capillaires sont instables, voir absents. La membrane basale est également irrégulière, anormalement épaisse voir absente sur certaines portions de vaisseaux. L'hétérogénéité des facteurs pro-angiogéniques induits par la tumeur déstabilise l'équilibre qui contrôle normalement l'angiogenèse, induisant toutes ces aberrations.

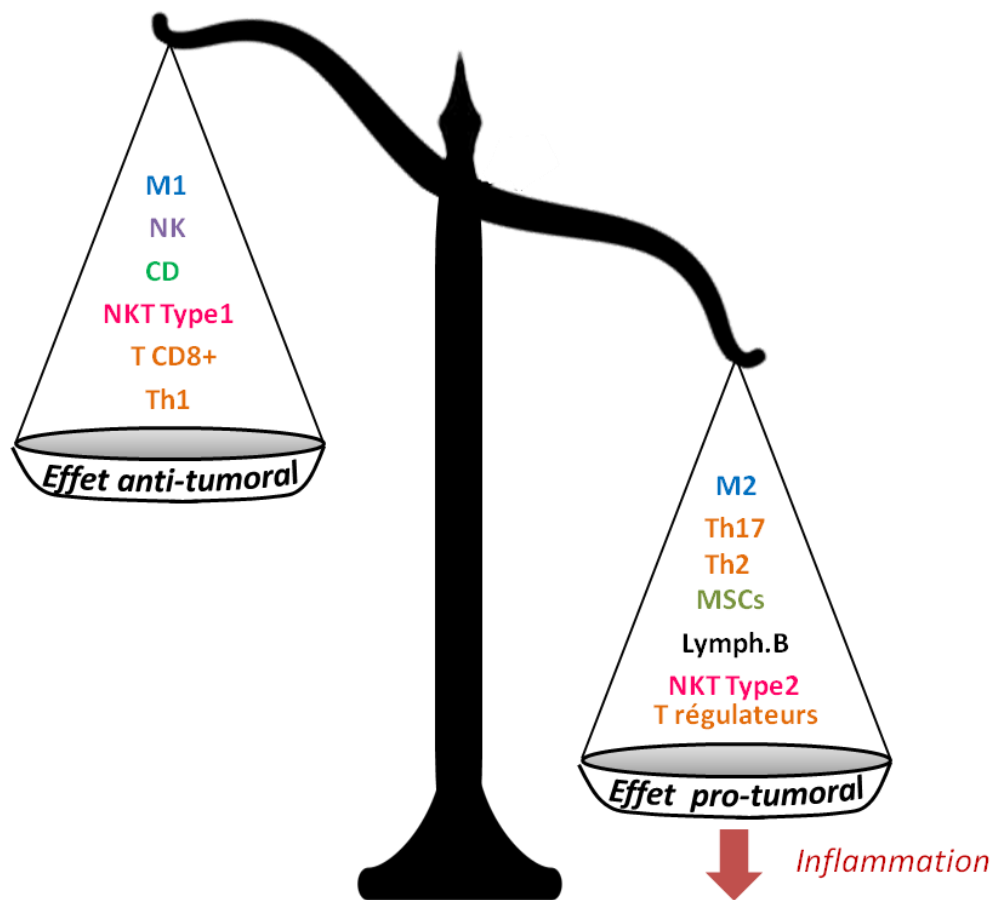
- **B) Les cellules immunitaires**

Un grand nombre d'études ont pu démontrer que la présence de cellules immunitaires dans le microenvironnement tumoral, ainsi qu'un contact direct entre ces cellules et les cellules cancéreuses, permettent la destruction des cellules cancéreuses, la réduction de la tumeur et un meilleur pronostic. En effet, les cellules précancéreuses et cancéreuses peuvent être reconnues par le système immunitaire : ce phénomène s'appelle l'immuno-surveillance. Elles sont ensuite détruites (phase d'élimination) ou bien leur prolifération est contrôlée (phase d'équilibre).

Néanmoins, l'efficacité du système immunitaire n'est pas complète, et les cellules cancéreuses qui ont acquis la capacité d'échapper au système immunitaire évoluent par la suite en tumeurs (phase d'échappement) [39]. En effet, les cellules tumorales peuvent perdre les molécules nécessaires à leur reconnaissance par le système immunitaire (mécanismes d'immuno-sélection) ; elles peuvent également modifier la réponse immunitaire (mécanismes d'immunosuppression active). Ces phénomènes d'immunosubversion se font en grande partie *via* l'interaction entre les cellules cancéreuses et leur microenvironnement.

De plus, un nombre important d'études a montré que l'augmentation du nombre de cellules immunitaires qui infiltrent la tumeur est favorable à la progression et l'invasion tumorale [40].

Ces constatations contradictoires, montrant à la fois la présence de cellules immunitaires comme bénéfique ou néfaste au développement des tumeurs, n'ont pas encore trouvé d'explication complète [41]. Néanmoins il semble que les acteurs du système immunitaire, selon leur nature, peuvent endosser des rôles pro ou antitumoraux. La suite de cette partie ne prendra en compte que quelques exemples, ceux qui sont le plus décrits dans la littérature, et ne reflètera pas la complexité et la diversité des mécanismes mis en œuvre par le système immunitaire.



Macrophages : M1 et M2 ; Lymphocytes T ; Lymphocytes B ; Cellules Myéloïdes Suppressives ; Lymphocytes NK ; Lymphocytes NKT Type 1 et 2 ; Cellules dendritiques.

Figure 4 – Balance entre les effets pro et antitumoraux des différents effecteurs du système immunitaire

Certaines cellules immunitaires, réduisent les activités antitumorales du reste du système immunitaire, favorisant l'apparition et le développement d'une tumeur. Par exemple, Les cellules dendritiques (CD) voient leurs capacités à induire une réponse immunitaire antitumorale inhibées par des facteurs dérivés des cellules tumorales. Les cellules dendritiques sont la plus importante population de cellules présentant l'antigène et jouent un rôle essentiel dans l'activation de l'immunité antitumorale médiée par les lymphocytes T, ce qui fait que leur inhibition contribue grandement à la progression tumorale [42].

D'autres types cellulaires, en complément de leur aide à la diminution de la réponse immunitaire antitumorale, modifient d'autres éléments du microenvironnement pour le rendre propice à l'installation des cellules cancéreuses. En effet, les cellules myéloïdes suppressives (MSCs), en plus de supprimer des mécanismes d'immunosurveillance tels que la présentation

d'antigène des cellules dendritiques ou l'activation des lymphocytes T, favorisent grandement la vascularisation tumorale [43] [40].

Enfin les effets parfois protumoraux et parfois antitumoraux du système immunitaire sur la carcinogénèse sont parfaitement illustrés par les macrophages. L'action des macrophages associés aux tumeurs (TAM) a été largement décrite dans la littérature, et une hypothèse a été avancée pour expliquer leurs effets antagonistes sur la croissance tumorale. En effet les macrophages sont classiquement considérés comme des cellules effectrices indispensables de la défense immunitaire. Néanmoins le fonctionnement des macrophages est modifié par des molécules secrétées par les cellules tumorales comme certaines interleukines ou le facteur de nécrose tumorale [44]. Sous leurs influences, les macrophages libèrent des facteurs chimiotactiques qui augmentent l'invasivité des cellules tumorales et leur capacité métastatique [45]. Ils produisent également des facteurs de croissance permettant la prolifération des cellules tumorales, tels que le facteur de croissance épidermique (Epidermal Growth Factor, EGF), ou encore des facteurs permettant l'angiogenèse comme le facteur de croissance endothéliale (Vascular endothelial growth factor, VEGF), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) [46]. Les TAMs contribuent également au remodelage de la matrice extracellulaire en produisant des enzymes hydrolytiques mais également en régulant la fibrillogenèse du collagène [47]. Les TAMs exercent également des fonctions immunosuppressives et peuvent inhiber l'immunité antitumorale par la production de TGF- β , de l'interleukine IL-10. Les macrophages limitent ainsi la réponse immunitaire antitumorale [48].

L'hypothèse permettant d'expliquer les rôles antagonistes des macrophages au cours de l'homéostasie tissulaire normale et de la tumorigenèse réside dans leur phénotype. Les macrophages sont fonctionnellement plastiques et leur état de polarisation est adapté à différentes conditions physiologiques : ils sont polarisés en un des deux phénotypes distincts, les macrophages activés de manière classique (M1) et les macrophages activés de manière alternative (M2). Ainsi les macrophages M1 activés de manière classique détruiraient les organismes étrangers et les cellules tumorales, tandis que les macrophages M2 activés (considérés comme importants pour le nettoyage des débris, la cicatrisation des plaies et l'angiogenèse) auraient des effets protumoraux [43]. Toutefois, il convient de noter que cette classification est simplifiée, car elle ne représente pas pleinement la complexité de l'activation des macrophages, et leurs réponses dépendantes des différents microenvironnements tissulaires [40].

A l'instar des macrophages, les lymphocytes T (Th1 et Th2), et les lymphocytes NKT ont aussi des rôles pro ou antitumoraux selon leurs phénotypes (**Fig.4**).

Pour finir, une hypothèse permettant d'expliquer le basculement d'un microenvironnement immunitaire antitumoral vers un microenvironnement davantage pro-tumoral a été formulée. Étant donné que plusieurs mécanismes immunitaires pro-tumoraux sont régulés positivement par l'inflammation, certains auteurs ont émis l'hypothèse que l'inflammation favorise la cancérogenèse et la croissance tumorale en modifiant l'équilibre entre immunité antitumorale et pro-tumorale en faveur de l'immunité pro-tumorale [40]. Ainsi, l'inflammation chronique, qui a longtemps été associée à un risque accru de tumeur, serait impliquée dans la polarisation de l'immunité vers les effecteurs favorisant la croissance de la tumeur. (Fig.4)

- **C) La matrice extracellulaire (MEC)**

La matrice extracellulaire (MEC) est dérégulée et désorganisée dans le microenvironnement tumoral comparativement à un microenvironnement sain. Les propriétés biochimiques et physiques de la MEC du microenvironnement tumoral sont altérées, de par la quantité de molécules présentes mais aussi de par la composition de la MEC et son organisation structurale. Le remodelage de la MEC implique de nombreuses enzymes, notamment les héparanases, l'urokinase, les métalloprotéinases matricielles (MMP), la lysyl oxydase (LOX), les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases et des cathepsines [49]. L'expression de ces enzymes est dérégulée dans le cancer : par exemple les héparanases, l'urokinase et beaucoup de MMPs sont souvent surexprimées [50], [51], permettant une modification intense de la MEC.

En ce qui concerne l'augmentation de la quantité de molécules, certains types de collagène comme le collagène de type I [52] ou le collagène de type IV non fibrillaire [53] sont retrouvés en des quantités anormalement élevées dans les tumeurs. D'autres travaux ont montré que le dépôt des collagènes de type I, II, III, V et IX est augmenté durant la formation de la tumeur [31]. Par ailleurs, un dépôt plus important de collagène et la rigidification du tissu augmentent la survie cellulaire et la prolifération des cellules cancéreuses [54]. Enfin, un dépôt plus important de collagène augmente également la progression et l'invasivité d'une tumeur [55], [56]. En effet, des études ont démontré que le nombre de métastases est augmenté par la rigidification de la MEC *via* l'action de LOX et l'augmentation du dépôt de collagène et de fibronectine.[57], [58].

Le passage d'un microenvironnement sain en microenvironnement tumoral passe également par la modification de l'architecture et de l'organisation des molécules de la MEC. En plus de l'augmentation de l'alignement des fibres de collagène, il a été observé que la densité, la largeur, la longueur et la rectitude sont augmentées dans le microenvironnement tumoral de cancer de l'estomac [59]. Également, le collagène est davantage réticulé dans un microenvironnement tumoral. La réticulation du collagène participe en partie à la progression tumorale [60] et son association avec la rigidification du tissu facilite l'invasion tumorale [61]. De plus, l'étude de tumeurs primaires du sein en culture 3D a montré que le réalignement des fibres de collagène permet ainsi à des cellules de migrer le long de fibres alignées [62]. Ceci favorise la migration des cellules cancéreuses, leur accès aux vaisseaux sanguins et aux tissus environnants, et donc à la formation de métastases.

Comme expliqué précédemment, la MEC ayant une influence sur les cellules environnante, ces altérations modifient le comportement de ces dernières (*cf. partie I.2.1*). C'est pourquoi les modifications décrites dans les paragraphes précédents jouent un rôle prépondérant dans la progression du développement de la tumeur.

Les anomalies décrites de la MEC associée au cancer sont propices à la progression tumorale : elles favorisent la formation de métastases et la transformation des cellules, modifient le comportement des cellules du microenvironnement, facilitent l'angiogenèse et l'inflammation initiées par la tumeur, régulent la disponibilité des molécules de signalisation solubles... Elles permettent ainsi la transfiguration du microenvironnement dit sain en microenvironnement tumorigène [31].

La MEC a néanmoins été associée dans la littérature à des effets à la fois pro et antitumoraux, ceci étant rendu possible par sa plasticité. Cependant il est parfois difficile d'attribuer des rôles à des constituants précis de la MEC, celle-ci étant extrêmement complexe.

- **D) Les fibroblastes associés au cancer (CAFs)**

Une sous-population de fibroblastes, présentant un phénotype ressemblant à celui des myofibroblastes et retrouvée dans les lésions cancéreuses, est désignée par l'appellation fibroblastes associés au cancer (CAFs). En proportion, ils représentent la majeure partie des cellules du microenvironnement dans de nombreuses tumeurs humaines.

Les CAFs sont davantage une population obtenue après des altérations structurelles et fonctionnelles qu'un type cellulaire en soi [63]. En effet, les CAFs sont issus de différents types cellulaires, transformés en CAFs durant la progression tumorale. Parmi ces cellules

progénitrices on trouve : des fibroblastes, des cellules immunitaires, cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse, des cellules épithéliales, des cellules endothéliales. Dans les cas des cancer du foie et du pancréas, ils peuvent être issus des cellules stellaires hépatiques, et des cellules stellaires pancréatiques [63]. Les CAFs sont en majorité composés de fibroblastes activés mais également d'une petite part de fibroblastes non activés [64], [65].

Contrairement à l'activation temporaire des fibroblastes pendant le processus de cicatrisation, l'activation des CAFs dans le microenvironnement tumoral est permanente, comme dans le cas de la fibrose. L'activation peut être induite par différents facteurs : les facteurs de croissances (facteur de croissance transformant- β [TGF- β], facteur de croissance épidermique [EGF], facteur de croissance dérivé des plaquettes [PDGF], facteur de croissance des fibroblastes 2 [FGF2]) ; les molécules d'adhésion en contact avec les leucocytes (intercellular-adhesion molecule 1 (ICAM1) or vascular-cell adhesion molecule 1 (VCAM1)), les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), une composition de la matrice extracellulaire altérée et bien d'autres facteurs [66],[63]. Cette activation permanente est entretenue par des boucles de rétrocontrôle Parmi les mécanismes observés, le TGF- β sécrété par les cellules tumorales active les fibroblastes, qui se mettent à produire du TGF- β à leur tour et s'activent donc ensuite par voie paracrine ou autocrine afin de maintenir leur activation. Le même mécanisme initié cette fois par les CAFs avec le SDF-1 (stromal cell derived factor 1) maintient l'activation des CAFs par le biais d'une boucle autocrine [67]. Un autre type de rétroaction permet au CAFs de garder leur phénotype activé et met en jeu les tensions générées dans le microenvironnement. Les cellules réagissent aux tensions externes mais sont également capables de créer une tension interne pour agir sur leur environnement. En effet, les cellules, et les fibroblastes en particulier, ont la capacité de capter les stimuli mécaniques du microenvironnement *via* des mécanorécepteurs et de remodeler la MEC environnante en conséquence [68]. Les CAFs en particulier ont une activité contractile élevée qui leur permet d'exercer des forces sur la MEC. Il a notamment été montré que des cellules cultivées sur des matrices de collagène rigides augmentent la contraction de leurs fibres d'actine et de myosine pour contrebalancer les forces de tension externes avec des forces de tension internes (phénomène de mécano-réciprocité) [69], [70]. Dans le cas des CAFs, ces forces de tensions externes induisent leur phénotype activé, et la contraction de leur cytosquelette exerce des forces sur la MEC, ce qui augmente la rigidité de celle-ci et donc la rigidité de l'environnement des CAFs [71]. Ainsi, par le biais de cette boucle de rétroaction, les CAFs peuvent conserver leur phénotype activé.

Les fibroblastes activés des CAFs sont considérés comme identifiables grâce à la l'expression de marqueurs tel que l'actine alpha des muscles lisses (α -SMA), des marqueurs des cellules mésenchymateuses (vimentine, fibronectine, protéine FSP1 (fibroblast specific protein)), la desmine, la protéine FAP (fibroblast activation proteine), le récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFR), l'ostéonectine, la chondroïtine sulfate, la prolyse hydroxylase, la prestine, l'intégrine α 11, et la tenascine [63]. Ces marqueurs sont exprimés à des niveaux très variables d'une cellule à l'autre, ce qui semble indiquer que les CAFs sont formés de sous-populations pouvant exercer des effets distincts. Parmi ces marqueurs, l' α – SMA a longtemps été considéré comme un marqueur fiable pour identifier les CAFs, ce qui au vu de l'hétérogénéité de cette population est une considération erronée. A l'heure actuelle aucun marqueur ou combinaison de marqueurs satisfaisants n'ont été trouvés pour identifier avec précision les CAFs [72].

Les caractéristiques phénotypiques des CAFs sont différents des fibroblastes : ils se multiplient plus rapidement, présentent une motilité accrue et produisent souvent des quantités plus importantes de collagène, de macromolécules, de facteurs de croissances, d'enzymes hydrolytiques, de modulateur de l'ECM, de cytokines et de chimiokines [63].

Les CAFs sont des acteurs particuliers de la tumorigenèse car ils sont architectes du microenvironnement. En effet bien que les cellules cancéreuses agissent de façon directe sur le microenvironnement pour le modifier et le rendre favorable à leur développement, elles utilisent aussi largement les CAFs comme intermédiaires pour modifier les autres composants de ce même microenvironnement.

I.2.3. Les CAFs, architectes du remodelage du microenvironnement tumoral

Le rôle des CAFs dans la progression tumorale est actuellement sujet à débat. Il a été montré qu'en supprimant les CAFs du microenvironnement dans le cancer du pancréas, ou en inhibant la formation d'un microenvironnement riche en fibroblastes, la croissance tumorale était amplifiée [73], [74]. Pourtant la plupart des études démontrent que l'enrichissement du microenvironnement en CAFs stimule cette même croissance. Les CAFs semblent donc avoir des effets à la fois pro et antitumoraux.

I.2.3.a- Effets protumoraux des CAFs

Généralement, une densité et un nombre de CAFs élevés dans une tumeur est signe d'un mauvais pronostic pour un patient. Des études ont démontré que les CAFs pouvaient initier et favoriser la croissance tumorale [75]. En effet, ils permettent le développement de la tumeur et rendent le microenvironnement favorable à celle-ci en induisant l'angiogenèse, en favorisant la prolifération des cellules cancéreuses, l'échappement immunitaire, en accélérant la formation de métastases, en remodelant la MEC, en recrutant des cellules de l'inflammation et en modulant le métabolisme des cellules cancéreuses (**Fig.6**).

- **A) Modification de la Matrice Extracellulaire (MEC)**

Les CAFs et les cellules cancéreuses peuvent entre autre communiquer *via* la MEC qui les entoure. Les fibroblastes étant les cellules qui génèrent et organisent la MEC dans les tissus sains, les CAFs sont naturellement le type cellulaire du microenvironnement tumoral qui gère majoritairement ces fonctions. Les CAFs modulent l'organisation de la MEC, mais aussi sa synthèse, sa rigidification et sa dégradation [76]. Ces différentes actions des CAFs sur la MEC peuvent avoir un effet pro-tumoral.

Synthèse

Un microenvironnement riche en MEC a été identifié comme étant un marqueur de mauvais pronostic pour un patient. Les CAFs de toutes origines ont une importante fonction sécrétoire. Les CAFs synthétisent de nombreux composants de la matrice extracellulaire, notamment du collagène (type I, III, IV et V), des fibronectines, des laminines et de la tenascine [76]. L'un des principaux composants de la MEC sécrétée par les CAF est l'hyaluronane.

De nombreuses analyses cliniques ont montré que la progression tumorale et les résultats médiocres dans divers cancers sont associés à une accumulation plus élevée de hyaluronane dans le stroma ou dans le parenchyme tumoral [63]. Des études ont montré que l'accumulation de hyaluronane conduit à l'induction de métastases [63].

Dégradation

Les CAFs permettent l'invasion par les cellules cancéreuses *via* la protéolyse de la MEC. Les protéines principalement impliquées dans la dégradation sont les metalloprotéases matricielles (MMPs) : elles clivent notamment les fibres de collagènes et facilitent la migration cellulaire à travers la MEC [77]. La présence de ces enzymes dans les tumeurs semble corrélée avec l'agressivité du cancer et un mauvais pronostic pour le patient [78], [79]. En effet, les

MMP sont des acteurs majeurs de l'invasion cellulaire, puisqu'elles sont responsables de la protéolyse et du détachement des cellules tumorales de la MEC, entraînant la formation de cellules souches cancéreuses et de métastases [80]. FAP est une autre protéine impliquée dans la dégradation de la MEC ; c'est une protéase-sérine qui dégrade la gélatine et le collagène [81]. Les MMPs proviennent principalement des sécrétomes des CAF dans divers types de tumeurs.

Ainsi, les CAFs peuvent dégrader la MEC grâce aux MMP [82] et à la protéine FAP qu'ils sécrètent [83]. Cette dégradation facilite la migration des cellules cancéreuses et la création de métastases.

Rigidification

La rigidification de la MEC est notamment due à la réticulation du collagène. Ces réticulations compactent les molécules de collagène et génèrent des fibrilles fortes. Les CAFs ont la capacité de réticuler le collagène en exprimant une enzyme, la lysyl-hydrolase 2 (LH2). Les fibroblastes sains n'ont quant à eux pas cette faculté [84]. La réticulation du collagène est aussi mise en œuvre par la lysyl oxydase (LOX), une enzyme également sécrétée par les CAFs. Cependant, LH2 et LOX étant également exprimées par les cellules cancéreuses [85], le débat est encore ouvert concernant l'attribution du rôle initiateur de la réticulation de la matrice entre ces deux types cellulaires. La sécrétion de LOXL2 (Lysyl oxidase like 2) par les CAFs peut induire une contraction du collagène via l'activation de l'axe FAK-intégrine [86], [87]. Une matrice rigide est l'un des marqueurs des tumeurs agressives [57].

Orientation de la matrice

Le réalignement des fibres de fibronectine par les CAFs permet à des cellules de migrer le long de fibres alignées [88]. Ceci favorise la migration des cellules cancéreuses, leur accès aux vaisseaux sanguins et aux tissus environnants et donc la formation de métastases, à la manière des fibres de collagènes.

En effet l'alignement du collagène augmente la persistance directionnelle des cellules cancéreuses qui migrent, c'est-à-dire qu'il limite la survenue de décrochage des cellules pendant leur avancée le long des fibres. Ceci permet aux cellules cancéreuses de parcourir une plus grande distance [89]. L'alignement des fibres de la MEC est guidé par la contractilité du cytosquelette des fibroblastes et accéléré par la propagation de la tension *via* les adhérences intercellulaires des fibroblastes. Ainsi les fibroblastes alignent leur matrice environnante en tirant collectivement pour y exercer une contrainte physique [90].

Pour conclure, les effets pro-tumoraux de la MEC sont dus en grande partie à son remaniement par les CAFs (**Fig.5**).

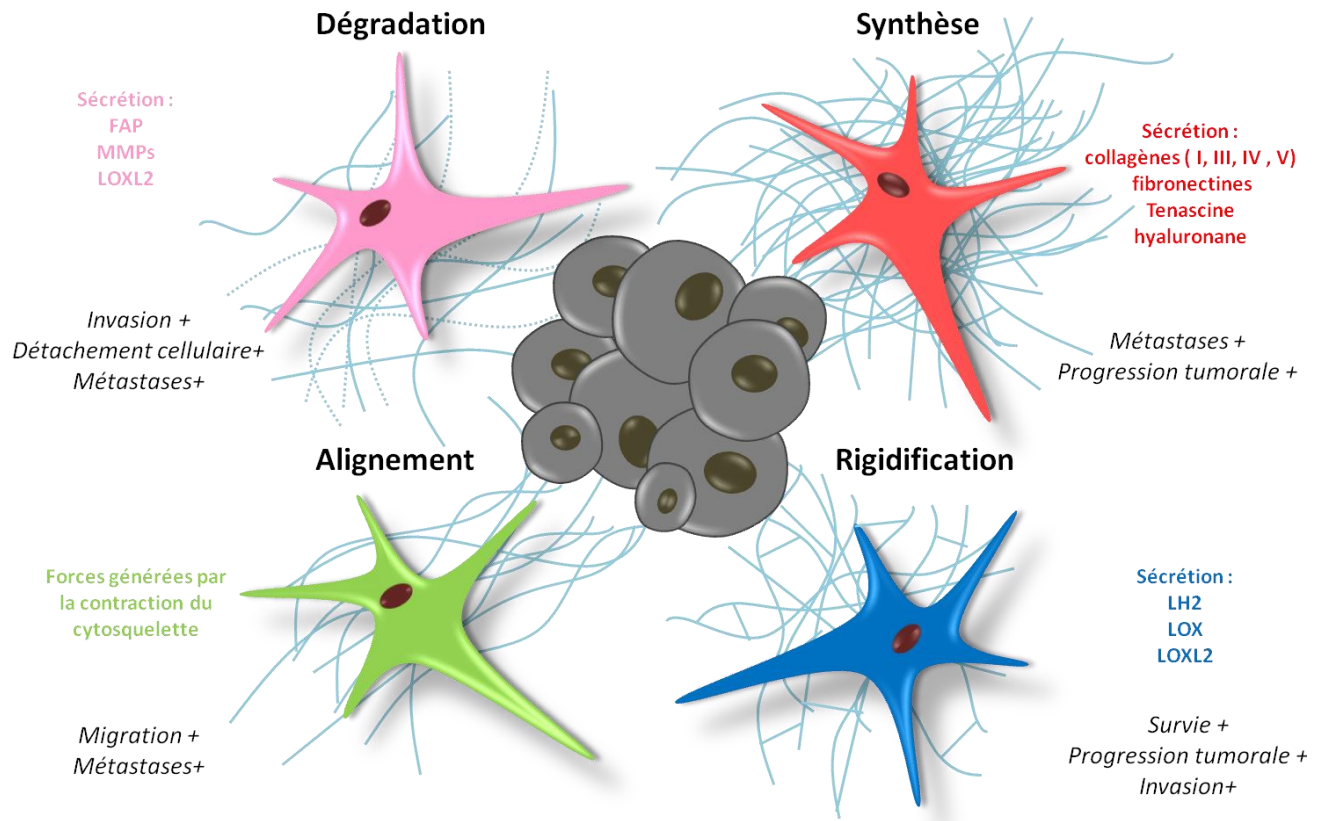


Figure 5 – Actions des CAFs sur la MEC et leurs effets pro-tumoraux

- **B) Recrutement des cellules de l'inflammation**

Comme vu précédemment, les CAFs produisent en grande quantité des facteurs de l'inflammation, qui permettent entre autre de maintenir leur phénotype activé *via* une boucle de rétroaction (*cf. partie I.2.2.a*). In vitro, des CAFs en présence de cellules cancéreuses pancréatiques augmentent la production de facteurs de l'inflammation. L'IL-1 α initie l'augmentation de la réponse inflammatoire en se liant au récepteur de l'interleukine-1 (IL-1R1) exprimé par les CAFs ; ce qui permet de mettre en évidence le rôle des CAFs dans la mise en route et la maintenance de l'inflammation dans la tumeur. La non-expression ou une expression moindre de IL-1 a été corrélée avec une meilleure survie [91].

L'inflammation provoquée est un point de départ à la tumorigenèse. De plus l'inflammation permet un passage d'une immunité anti à une immunité pro-tumorale (*cf. partie I.2.2.a*), les CAFs peuvent donc être responsables de cet effet.

- **C) Echappement immunitaire**

Les CAFs interagissent avec les cellules immunitaires du microenvironnement tumoral entre autres car ils produisent une grande quantité de cytokines et chimiokines et d'autres facteurs. Via des mécanismes mis en œuvres par les CAFs grâce à leur sécrétome, le système immunitaire favorise la progression de la tumeur.

Tout d'abord, les CAFs polarisent l'immunité en faveur des sous populations immunitaires pro-tumorale. C'est le cas pour les lymphocytes Th1 et Th2 mais également pour les macrophages M1 et M2.

Premièrement les CAF peuvent augmenter l'inflammation médiée par les Th2 par rapport au Th1 [92]. Ils influent également directement sur la population de Lymphocyte Th en favorisant leur phénotype pro-tumoral à celui antitumoral. Par exemple les CAFs des adénocarcinomes pancréatiques favorisent la polarisation des cellules Th2 (plutôt que Th1) par le biais du conditionnement des cellules dendritiques (DC) myéloïdes [93]. De la même manière, les CAFs jouent également un rôle dans la polarisation des cellules Th et induisent à la fois une augmentation de la sécrétion de cytokines des Th2 accompagnée d'une diminution des cytokines des Th1 [94].

Les sécrétions des CAF favorisent activement le recrutement de monocytes dans le TME et leur différenciation en un phénotype immunosuppresseur M2 [85]. Il a également été mis en évidence dans une autre étude que les CAF pancréatiques sont capables d'induire la polarisation M2 des macrophages [95]. De même, il a été démontré que la coculture 3D de monocytes, de cellules cancéreuses pancréatiques et de CAFs augmente la production de cytokines immunosuppressives, qui sont connues pour favoriser la polarisation des macrophages M2 [92].

En particulier, la sécrétion de TGF- β par les CAFs est à l'origine de la mise en œuvre de plusieurs mécanismes d'immunosuppression sur des types de cellules immunitaires

différents. Le TGF- β sécrété par les CAFs agit entre autre sur les lymphocytes T CD8 + en favorisant la mort cellulaire des lymphocytes T CD8 + ou encore en modifiant directement la fonction des lymphocytes T CD8 + cytotoxiques *via* l'inhibition de l'expression de gènes impliqués dans leur activité cytotoxique [96]. Ce TGF- β est également impliqué dans la différenciation des cellules T helper 17 protumoraux [97]. En parallèle, il diminue, voire supprime, l'activation des cellules NK et en diminue l'activité cytotoxique [98], [99]. Le TGF- β dérivé de CAFs peut également affecter la fonction des cellules dendritiques. En réponse au TGF- β , les cellules dendritiques régulent négativement l'expression des molécules nécessaires à la présentation efficace de l'antigène, et des molécules qui favorisent le recrutement et la survie des lymphocytes.

D'autres molécules sécrétées par les CAFs permettent de favoriser la réponse immunitaire pro-tumorale, comme CCL2, CCL5, CCL17, CXCL12, SDF1 ainsi que les cytokines polarisantes IL-1, IL-6, IL-13 et IL-26 et agissent sur les différentes cellules du système immunitaire [92] [96]. Ceci diminue globalement la survie des patients [96].

En plus de leurs actions directes sur le système immunitaire par le biais de leur sécrétome, les CAFs peuvent également influencer le système immunitaire indirectement *via* leurs actions sur la MEC ou l'angiogenèse. Par exemple, le VEGF dérivé des CAFs, en plus de son effet pro-angiogénique, inhibe la génération et la maturation des cellules dendritiques [96].

Pour conclure, les CAFs, majoritairement *via* l'action de leur sécrétome, permettent aux cellules cancéreuses d'échapper à la destruction par le système immunitaire en influençant ce dernier.

- **D) Prolifération des cellules tumorales et réduction de l'apoptose**

Les cellules cancéreuses et les CAFs peuvent interagir *via* leurs sécrétomes directs. L'augmentation de la prolifération des cellules cancéreuses en présence de CAFs peut être induite par deux mécanismes : l'augmentation de la mitose et la diminution de la mort cellulaire programmée.

En premier lieu, les CAFs peuvent directement **stimuler la prolifération des cellules cancéreuses** *via* la sécrétion de facteurs de croissance.

Dans une étude, des souris subissant une co-injection de cellules cancéreuses pancréatiques et de CAFs présentaient un indice mitotique plus élevé que les souris ayant reçu

une injection de cellules cancéreuses seules. Cet effet a été partiellement supprimé en neutralisant les anticorps dirigés contre le facteur mitogène PDGF, indiquant que la sécrétion de ce facteur par les CAFs est en partie responsable de la division des cellules cancéreuses [100].

Les CAFs sécrètent de l'EGF qui agit directement sur la prolifération des cellules cancéreuses : il a été démontré que la coculture de cellules cancéreuses du col de l'utérus et de fibroblastes isolés de tissus tumoraux de patients augmentait la prolifération *in vitro* de cellules cancéreuses du col utérin [101].

Un autre facteur de croissance sécrété par les CAFs est l'IGF-1 (Insuline-like Growth Factor 1). Les cellules de mélanome ne sécrètent pas d'IGF-1, leur croissance est stimulée par les CAFs environnants qui sécrètent ce facteur [102].

Les CAFs sécrètent également le facteur de croissance HGF (facteur de croissance des hépatocytes). La surexpression de ce facteur de croissance par les fibroblastes de souris peut induire l'initiation du cancer du sein d'un épithélium normal [103]. Il a été démontré que le HGF recombinant humain sécrété par les CAFs augmente la prolifération cellulaire de lignées de cellules ovariennes cancéreuses humaines [104].

En second lieu, les CAFs peuvent **moduler la mort et la survie des cellules cancéreuses**. Comme vu précédemment, la résistance à l'apoptose est un trait commun à de nombreuses tumeurs (*cf. partie I.1.1*). Il a été montré que les CAFs peuvent réduire la mort cellulaire basale de lignées cellulaires de cancer du pancréas [100], [105].

- **E) Accélération de la formation des métastases**

Dans un modèle orthotopique d'adénocarcinome pancréatique, la co-injection de ces cellules avec des CAFs a permis d'augmenter la proportion de souris atteintes de métastases, les CAFs ont donc également un rôle à jouer dans la diffusion métastatique des cellules cancéreuses [105]. Les CAFs favorisent l'apparition de métastases dans l'organisme *via* l'action de molécules sécrétées ou *via* la sécrétion d'exosomes, *via* leur activité contractile ou encore *via* l'escorte des cellules cancéreuses en dehors de la tumeur.

Tout d'abord, le **sécrétome** des CAFs agit sur la formation des métastases.

Une étude a démontré, à l'aide d'une coculture de cellules cancéreuses du sein métastatiques humaines et de fibroblastes de dermes murins normaux, que le milieu conditionné par les cocultures augmentait la migration et la diffusion des cellules cancéreuses *in vitro*. Les

effets du milieu de coculture sur les cellules cancéreuses étaient dus au TGF- β sécrété par les CAFs sous l'influence des cellules tumorales [106]. Celui-ci augmente l'efficacité de la colonisation des organes par les cellules cancéreuses colorectales : en effet, le TGF- β entraîne la sécrétion d'IL11 par les CAFs, ce qui déclenche la signalisation GP130 / STAT3 dans les cellules tumorales et confère un **avantage de survie aux cellules métastatiques**.

Le sécrétome des CAFs agit également sur la transition épithélio-mésenchymateuse. Cette transition correspond au passage de cellules épithéliales à une forme mésenchymateuse ; elles perdent leur adhésion cellule-cellule et acquièrent des propriétés adhésives nouvelles vis-à-vis de la MEC. Cette transition est impliquée dans l'invasivité des cancers, notamment dans le cancer du pancréas, et implique les cadhérines N et E [107]. Des études ont révélé que la **transition épithélio-mésenchymateuse était favorisée par les CAF** sécrétant du TGF- β , de l'IL-6, ou encore le stanniocalcine 1 [106], [108], [109], [110], [111], [112].

Ensuite, des études ont mis en évidence l'importance du rôle des **exosomes** sécrétés par le CAFs. Dans l'une d'elles, il a été montré que les exosomes présentent Wnt11 sur leur membrane, un ligand internalisé par les cellules cancéreuses *via* le récepteur Fzd6 [113]. La **motilité et le potentiel métastatique** des cellules cancéreuses sont augmentés après internalisation de ce ligand.

En plus de la contribution de leur sécrétome direct et de leurs exosomes, les CAFs peuvent également favoriser l'invasion des cellules tumorales en utilisant leur **propriété contractile** : en tirant et en étirant la membrane basale avec laquelle ils sont en contact, ils peuvent changer ses propriétés physiques, son organisation, et ouvrir ainsi des brèches dans la membrane [82]. La migration et l'invasion cellulaires sont étroitement liées à l'organisation du squelette d'actine. Ainsi, la palladine, une protéine liant l'actine, est un élément majeur participant au processus d'invasion tumorale et de métastases. Il est hautement et principalement exprimé dans les CAFs pancréatiques primaires et métastatiques [114], [115]. Les CAFs exprimant la palladine ont une motilité élevée et une formation accrue d'invadopodes qui remodelent la matrice extracellulaire pour favoriser l'invasion du cancer du pancréas [116], [117].

Une dernière voie permet aux CAFs de favoriser l'apparition de métastases. Des études récentes suggèrent une implication encore plus physique des CAFs dans le processus métastatique. En effet il a été démontré qu'ils **escortent les cellules cancéreuses, du site primaire aux organes secondaires**, facilitant leur survie et leur prolifération [118]. Les deux

populations cellulaires établissent des adhérences hétérotypiques directes E-cadhérine / N-cadhérine entre elles [119]. Ces adhésions étant mécaniquement actives, les CAFs sont ainsi capables d'extraire physiquement des cellules cancéreuses de la masse tumorale et de conduire à **l'invasion et à la dissémination de la tumeur**. Ceci amène l'hypothèse dite de "seed and soil" évoquée plus tôt dans une autre dimension, suggérant que la graine, les cellules cancéreuses, apporte avec elle son propre sol, ou microenvironnement, afin de s'implanter plus aisément dans sa nouvelle localisation.

Par conséquent, les CAFs peuvent favoriser la formation des métastases de plusieurs manières : *via* les facteurs qu'ils sécrètent, *via* leurs exosomes, et *via* des actions physiques sur la MEC ou sur les cellules cancéreuses.

- **F) Actions pro-angiogéniques**

De nombreuses études suggèrent que les CAFs ont également la capacité de réguler l'angiogenèse tumorale. En effet, un milieu conditionné par des CAFs induit une angiogenèse tumorale, comme le montrent l'augmentation du nombre de vaisseaux sanguin *in vitro* et la formation de vaisseaux dirigés chez des souris *in vivo* [120]. La co-injection de cellules cancéreuses pancréatiques et de CAFs dans un modèle orthotopique d'adénocarcinome pancréatique a également permis d'observer l'induction de l'angiogenèse [121].

Matsuo et al. ont montré que le CXCL12 synthétisé par les CAFs augmente la croissance et le caractère invasif des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaines *in vitro*. Il améliore également la production de CXCL8 par les cellules, ce qui facilite indirectement la formation des vaisseaux [122].

Des facteurs pro-angiogéniques tels que le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), le facteur 1 dérivé des cellules stromales (SDF-1), le facteur de croissance des fibroblastes (FGF), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) sont exprimés par la CAFs [123]. Entre autres, il a été démontré que le PDGF dérivé de CAFs était un facteur essentiel dans l'activation de la production de VEGF. Certains de ces facteurs recrutent également des cellules qui sont essentielles à la réalisation du processus angiogénique : SDF-1 recrute les cellules endothéliales dérivées de la moelle osseuse et PDGF favorise quant à lui indirectement l'angiogenèse en recrutant des fibroblastes stromaux sécrétant du VEGF.[124]

Via l'action de leur sécrétome, les CAFs permettent donc une vascularisation plus efficace de la tumeur.

- **G) Métabolisme des cellules cancéreuses**

La reprogrammation métabolique est considérée comme une caractéristique des cellules tumorales (*cf. partie I.1.1*). La glycolyse anaérobie, connue sous le nom d'effet Warburg, est une caractéristique métabolique des cellules cancéreuses. L'effet Warburg est le fait que la plupart des cellules cancéreuses produisent leur énergie *via* un fort taux de glycolyse suivie d'une fermentation d'acide lactique, alors que les cellules saines produisent leur énergie à partir d'un taux de glycolyse plus bas qui est suivie d'une oxydation du pyruvate. Les raisons de cette différence ne sont pas claires mais il peut par exemple découler du fait que l'environnement des cellules cancéreuses est très hypoxique et pauvre en nutriments, ce à quoi les cellules cancéreuses s'adaptent.

Des études récentes ont montré que les cellules cancéreuses peuvent entraîner ce qui a été appelé un effet Warburg inverse dans les CAFs : ils subissent un shift métabolique augmentant leur glycolyse aérobie afin de produire du lactate et du pyruvate. Ces deux métabolites énergétiques sont ensuite utilisés par les cellules cancéreuses pour produire leur biomasse et leur énergie *via* le cycle de Krebs mitochondrial, favorisant ainsi une production d'énergie efficace (génération d'ATP *via* la phosphorylation oxydative). Ce phénomène se traduit par une capacité de prolifération plus élevée des cellules cancéreuses [125]. Ainsi, le rôle pro-tumoral des CAFs passe aussi par leur symbiose métabolique avec les cellules cancéreuses [126].

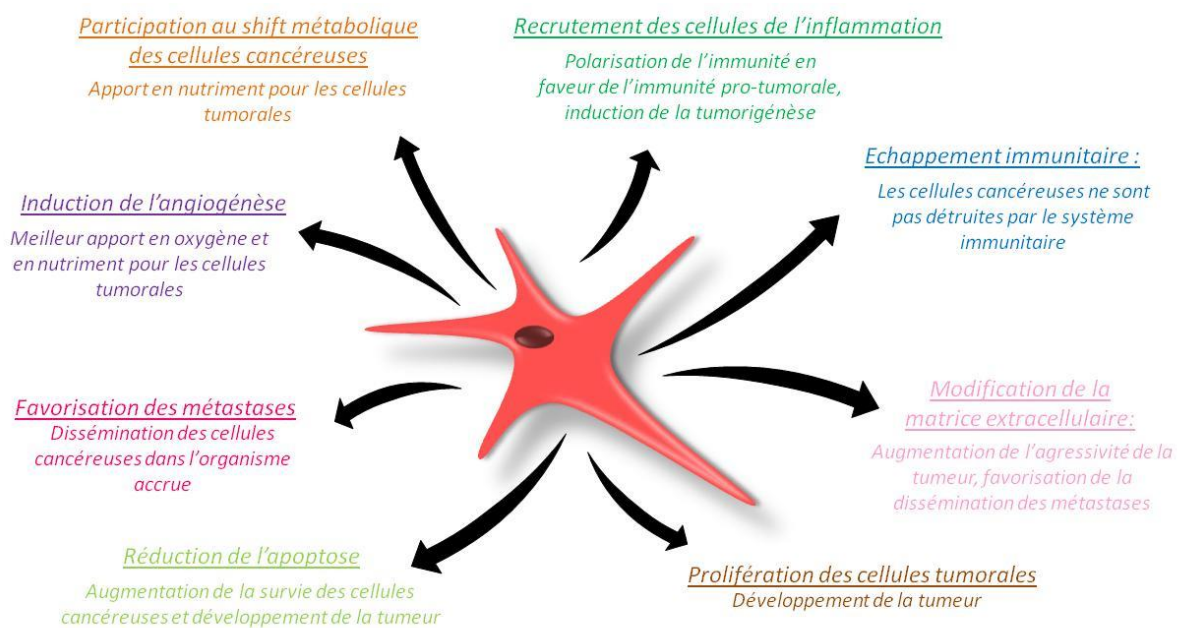


Figure 6- Actions pro-tumorales des CAFs et leurs conséquences pour la tumeur et les cellules cancéreuses

I.2.3.b- Effets antitumoraux des CAFs

Bien que les CAFs aient à l'heure actuelle principalement été décrits comme pro-tumoraux dans un grand nombre de travaux de recherche, de nouvelles études mettent en lumière leurs effets antagonistes antitumoraux.

Tout d'abord, il a été montré que la suppression des CAFs d'adénocarcinomes pancréatiques accélère la progression de la maladie dans un modèle murin [74]. De même, la comparaison de tumeurs entourées d'un microenvironnement riche ou d'un microenvironnement pauvre en CAFs a montré que le microenvironnement pauvre en CAFs favorise davantage la croissance tumorale, les métastases et une meilleure vascularisation des tumeurs [73] [92]. Ces différentes études montrent que la suppression des CAFs accélère la tumorigenèse, et que la présence des CAFs peut freiner le développement des tumeurs : ceci semble indiquer que les CAFs ont des actions antitumorales.

En effet, une étude récente menée sur 155 adénocarcinomes pancréatiques et 48 pancréas normaux a confirmé que la présence d'un nombre plus élevé de CAFs dans les cellules stromales d'adénocarcinome pancréatique est associée à une survie prolongée [127].

Une première hypothèse permet d'expliquer les résultats contradictoires obtenus sur les rôles parfois pro-tumoraux et parfois antitumoraux des CAFs : ces derniers présentent une population très hétérogène, tant au niveau de leurs origines, de l'expression de leurs gènes, que de leurs sécrétomes. C'est cette hétérogénéité qui pourrait expliquer les effets antagonistes sur la tumorigenèse observés dans les différents travaux.

Cette hypothèse selon laquelle les caractéristiques de chaque population de CAFs déterminent leur nature pro ou antitumorale peut être illustrée par les études de Fujiwara et al. et d'Ikenaga et al. [130], [131]. Les premiers ont constaté que l'expression du CD271 dans les CAFs est associée de manière significative à une survie prolongée chez les patients atteints d'adénocarcinome pancréatique tandis que les seconds ont montré que les CAF exprimant CD10 améliorent la progression des cellules cancéreuses pancréatiques [128], [129]. De plus, Öhlund et al. [130] ont identifié deux sous-populations de CAFs basées sur différents niveaux d' α -SMA : ceux avec une expression d' α -SMA élevée n'expriment pas de cytokines inflammatoires promotrices de tumeurs [130].

Egalement, les sécrétions des CAFs peuvent avoir, pour la même molécule, un effet antagoniste. En effet, une étude a montré que la périostine sécrétée par les CAFs n'a pas le même effet suivant son taux d'expression. Dans un adénocarcinome pancréatique, sa légère

surexpression réduit de manière significative la transition épithélio-mésenchymateuse, alors qu'une expression plus élevée augmente cette même transition dans les cellules pancréatiques humaines et les métastases [131].

Une seconde hypothèse, n'excluant pas la première, est que la fonction des CAFs est dynamique pendant la progression du cancer, et que le rôle des CAFs peut dépendre de l'équilibre stroma-tumeur dans le microenvironnement tumoral [132]. La fonction des CAFs dans la tumorigenèse pourrait donc changer de manière dynamique avec l'évolution de la tumeur et ainsi passer d'anti à pro tumoral au cours du temps. Ainsi, au stade de l'hyperplasie, similaire à la réponse classique de cicatrisation de la plaie, les CAFs pourraient jouer un rôle d'inhibiteurs puis avec la progression tumorale, les CAFs favoriseraient la prolifération et la migration des cellules tumorales, et induisent une angiogenèse par divers mécanismes [133].

Les effets protumoraux et antitumoraux des CAFs doivent être davantage étudiés afin de pouvoir affirmer ou infirmer ces hypothèses. Egalement, l'identification de marqueurs distinguant les CAFs protumoraux des CAFs antitumoraux serait une grande avancée pour les traitements visant le microenvironnement tumoral, permettant peut être la mise en place de traitements favorisant les CAFs antitumoraux comparativement aux CAFs pro-tumoraux.

I.2.4. Le microenvironnement du cancer du pancréas

I.2.4.a- Caractéristiques principales du microenvironnement et CAFs pancréatiques

Les adénocarcinomes pancréatiques présentent généralement un stroma abondant en collagène, dense, et donc hypoxique. Celui-ci représente jusqu'à 90% du volume tumoral [92]. L'augmentation de l'expression du collagène de type I a été associée à un risque accru de métastases pour le cancer pancréatique [134]. De plus, son agencement est très altéré : dans les adénocarcinomes pancréatiques il a été démontré que les fibres de collagène de type I sont alignées et orientées [135] tandis que ces mêmes fibres sont non orientées et non alignées dans un microenvironnement sain. Comme vu précédemment, cette dernière caractéristique est aussi favorable à la migration des cellules cancéreuses.

Les microenvironnements des adénocarcinomes pancréatiques sont caractérisés par l'épuisement des lymphocytes T entraînant une perte de leur fonction effectrice cytotoxique. On

observe également une infiltration de macrophages promoteurs de tumeurs, de neutrophiles associés aux tumeurs et de cellules dérivées de myéloïdes suppresseurs, permettant l'évasion immunitaire et la progression tumorale. La forte immunosuppression de ces cancers est également caractérisée par une production abondante de cytokines immunosuppressives [136].

Dans les adénocarcinomes pancréatiques, les CAFs ont été considérés comme une population assez homogène dérivée principalement de cellules stellaires pancréatiques (PSCs) [63], [137]. Une étude montre que les CAFs présentant des caractéristiques myofibroblastiques, définis par des niveaux d'expression élevés d' α -SMA et appelés CAFs myofibroblastiques (myCAF), sont distribués de manière hétérogène dans le stroma des adénomes pancréatiques et immédiatement à proximité des glandes cancéreuses. Une autre sous-population distincte de CAFs est située plus loin des glandes cancéreuses, ne présente pas d'expression α -SMA élevée et sécrète au lieu de cela de l'interleukine-6 (IL-6) et des médiateurs inflammatoires supplémentaires, d'où le terme de CAF inflammatoire (iCAF). Dans le modèle d'organoïde utilisé, les PSC quiescentes peuvent être converties en myCAF ou en iCAF en fonction de leur relation spatiale avec les cellules néoplasiques. En outre, les PSC une fois induites en iCAF peuvent être inversées en myCAF si les conditions sont modifiées, ce qui implique une réversibilité des différents sous-types identifiés[130].

Tout comme pour les autres types de cancer, les CAFs pancréatiques sont des architectes prépondérants du microenvironnement tumoral pancréatique [92] et sont donc des cibles intéressantes pour de futures thérapies. C'est encore plus nécessaire dans le cas du cancer du pancréas, car son microenvironnement particulièrement dense et hypoxique contribue grandement à l'échec des thérapies traditionnelles.

I.2.4.b- Les récepteurs à la cholécystokinine dans le microenvironnement pancréatique

RCCK1 et RCCK2 sont exprimés dans les PSCs (pancreatic stellate cells) de rats [138] mais aussi dans les PSCs humains [139] et dans les CAFs [140]. Ils y sont liés à la production de collagène de type I : leur activation par un agoniste stimule la sécrétion de collagène et l'utilisation conjointe d'antagonistes bloquant ces récepteurs diminue cette sécrétion [149]. De plus, il a été montré que l'utilisation d'un antagoniste des récepteurs à la cholécystokinine diminue la fibrose, ce qui d'après les auteurs est certainement dû à l'action de cet antagoniste sur les récepteurs à la cholécystokinine exprimés par les PSCs ou les CAFs [19] [141] [140].

Ainsi, la présence de RCCKs exprimés par les CAFs pourrait être en lien avec le microenvironnement desmoplastique du cancer du pancréas.

En utilisant des nanoparticules, vectorisées pour cibler les RCCK2, et chargées en siARN ciblant la gastrine, Julian Burks et al. [27] ont inhibé la prolifération et les métastases de tumeurs pancréatiques orthotopiques dans un modèle murin. Ils évoquent la possibilité que leurs nanoparticules puissent agir sur les CAFs, ce qui expliquerait la diminution de fibrose observée, voire également la diminution des métastases[27].

Les RCCKs étant exprimés à la fois dans les cellules cancéreuses pancréatiques (cf. partie I.1.2.b), mais également dans les CAFs, l'utilisation de ligands permettant de cibler ces récepteurs semblent prometteurs pour de futures thérapies.

I.3. Résistances aux traitements médiées par les CAFs

Au vu du rôle prépondérant du microenvironnement et particulièrement des CAFs dans le développement tumoral, les concepts dits classiques ne prenant en compte que les cellules tumorales sont de plus en plus remplacés par des approches complexes étudiant le microenvironnement et ses interactions avec les cellules cancéreuses pour comprendre les résistances de ces cellules aux traitements actuels.

L'éradication des cellules cancéreuses par les traitements conventionnels de chimiothérapie est limitée par des phénomènes de résistance, provenant de la nature même des cellules ou engendrés par le microenvironnement. Le rôle du microenvironnement dans ces résistances semble en grande partie dû à l'action des CAFs qui, comme évoqué dans la partie précédente, de par leurs nombreuses fonctions sont capables de réguler les différents éléments du microenvironnement [63], [142]. Ainsi, de nombreuses études se sont penchées sur le rôle des CAFs dans les résistances des tumeurs aux traitements. Ils favorisent ces résistances de plusieurs manières : en créant une barrière physique piégeant les traitements, par des effets de contacts directs, et en utilisant leur sécrétome (**Fig.7**).

I.3.1. Barrière physique

Le microenvironnement tumoral, et notamment celui des adénocarcinomes pancréatiques, est organisé de telle sorte qu'il agit comme une barrière entre les traitements et les cellules cancéreuses : il est désorganisé, peu vascularisé et dense [92].

La capacité des CAFs à remodeler la matrice extracellulaire (MEC) peut avoir une incidence directe sur l'échec du traitement chez les patients. La production de MEC par les CAFs augmente la densité de la MEC. Cette MEC dense agit comme une barrière physique qui empêche les molécules thérapeutiques de parvenir aux tumeurs ou bien retarde la délivrance de la chimiothérapie aux cellules cancéreuses. L'expression accrue des molécules composant la MEC limite davantage la diffusion de médicaments chimiothérapeutiques dans les tissus cancéreux [143] car elle compresse les vaisseaux sanguins et réduit donc l'apport en molécules thérapeutiques [144].

En particulier le hyaluronane, sécrété en abondance par les CAFs (*cf. partie 3.2.1-a*), s'est avéré responsable de la génération d'un collapsus vasculaire en exerçant une haute pression sur les vaisseaux, et agit en tant que barrière pour la perfusion et la diffusion du médicament chez un modèle de souris [145], [146]. Les résultats de ces études ont ensuite été confirmés par une autre, qui a montré que la suppression de l'acide hyaluronique stromal grâce à une hyaluronidase dans un modèle murin d'adénocarcinome pancréatique a permis d'augmenter la délivrance d'agents chimiothérapeutiques tels que la doxorubicine et la gemcitabine [146].

Il a également été montré que la diminution de la contraction et de la contractilité des CAFs permet de réduire la pression exercée sur les vaisseaux et d'augmenter la délivrance des traitements [147]. Ainsi, la barrière physique du microenvironnement est partiellement due à la vascularisation pressurisée des tumeurs, rendant l'accès aux cellules cancéreuses difficile.

Les CAFs sont capables de constituer eux-mêmes une barrière biophysique à la délivrance des traitements. Une étude a montré que les CAFs piègent la gemcitabine intratumorale, l'accumulent dans leur cytosol, l'empêchant ainsi d'atteindre les cellules cancéreuses [148]. Néanmoins, *in vivo*, les CAFs sont insensibles à la gemcitabine. Ainsi les CAFs peuvent agir directement sur la rétention physique des agents chimiothérapeutiques.

I.3.2. Actions de Contacts

Une autre forme de résistance existe dans les résistances médiées par le microenvironnement : la résistance aux traitements *via* l'adhésion cellulaire, qui est liée à l'adhésion des intégrines des cellules cancéreuses aux composants de la MEC ou bien aux interactions physiques directes des cellules cancéreuses avec les CAFs [149].

Tout d'abord, l'interaction des cellules cancéreuses avec la matrice extracellulaire est connue pour être impliquée dans des mécanismes de chimiorésistance car elle est capable d'engendrer l'activation de voies de signalisation permettant la survie des cellules cancéreuses. Les CAFs étant capables de moduler la MEC, leur rôle dans cette résistance semble prépondérant. Les collagènes de type I et IV, deux types de collagènes sécrétés par les CAFs, peuvent favoriser la résistance aux médicaments grâce aux interactions avec des intégrines sur des cellules cancéreuses [150]. Deux équipes ont démontré que des cellules cancéreuses du pancréas cultivées dans du collagène 3D présentent une sensibilité réduite au traitement à la gemcitabine et une prolifération accrue malgré le traitement [134], [151].

Rice et al. [152] ont montré que l'augmentation de rigidité de la matrice, propriété que les CAFs peuvent moduler (*cf. partie I.2.3.a*), induit *in vitro* une chimiorésistance au paclitaxel suggérant que la rigidité de l'environnement joue un rôle important dans la chimiorésistance. Ici, il a été montré que cette résistance est due au fait que la rigidité augmente la transition mésenchymateuse à endothélial.

En plus de la survie accrue conférée par l'adhésion à la MEC, le contact direct entre les cellules tumorales et les cellules stromales est également source de résistance. Des études ont démontré que l'adhésion de cellules de mélanome à des monocouches de fibroblastes réduit de manière significative les effets cytotoxiques du médicament de chimiothérapie cisplatine [153]. Bien que le mécanisme sous-jacent de cette étude en particulier n'ait pas été étudié, une autre étude a prouvé que les cellules de mélanome et les CAFs interagissent directement les uns aux autres *via* la N-cadhérine et que cette liaison augmente la survie du mélanome via la voie de signalisation AKT/PKB [154].

I.3.3. Sécrétome

La dernière forme de résistance connue est la résistance médiée par les facteurs solubles telle que les cytokines, chimiokines ou facteurs de croissance sécrétés par les CAFs ou par d'autres composants du microenvironnement. Ce paragraphe s'intéressera à des exemples de résistances observées pour quelques traitements parmi tous ceux existants.

Le rôle des facteurs sécrétés par les CAFs a été étudié dans le cadre de la **résistance des cellules cancéreuses aux traitements antiangiogéniques**. Une expérience montre que les CAFs induisent une résistance aux inhibiteurs de la tyrosine-kinase du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) *via* la sécrétion du facteur de croissance hépatocytaire (HGF) dans le cancer du poumon [155]. Une autre étude a également pu mettre en exergue le rôle des CAFs dans la résistance aux traitements du vémurafénib (inhibiteur de la sérine-thréonine kinase BRAF) ou du lapatinib (inhibiteur des domaines intracellulaires de la tyrosine kinase des récepteurs Epidermal Growth Factor ou EGFR) [156].

Le rôle des facteurs sécrétés par les CAFs a été étudié dans le cadre de la **résistance des cellules cancéreuses à la gemcitabine**.

Des études ont notamment mis en lumière l'implication des facteurs de croissance insuline-like (IGF) 1 et 2 [157] et de l'IL-6 [158], [159].

De plus, la participation des exosomes à la chimiorésistance induite par les CAFs a récemment été mise à jour. Une étude récente a montré que les exosomes de CAFs peuvent augmenter le facteur Snail dans les cellules tumorales. Celui-ci favorise la prolifération tumorale et la résistance aux traitement : le traitement des CAFs avec un inhibiteur de la libération des exosomes (GW4869) a significativement accru l'apoptose des cellules cancéreuses dans des cocultures traitées à la gemcitabine [160].

Une fois que les exosomes ont été transférés dans le cytoplasme par endocytose et phagocytose, ils peuvent fonctionner dans les cellules réceptrices. Par exemple, il a été rapporté que des exosomes dérivés de fibroblastes activent la voie Notch, augmentent l'expression des gènes cibles de Notch et induisent par conséquent une **radiorésistance** dans les cellules cancéreuses [161].

De plus, les microARN (miARN) et d'autres substances d'exosomes provenant de CAFs peuvent être transférés dans le cytosol des cellules cancéreuses et inhiber l'expression de

l'ARNm cible. Le micro ARN-21 inhibe APAF1, provoquant une **résistance au paclitaxel** dans le cancer de l'ovaire [162].

De nombreux autres phénomènes de résistance aux traitements médiés par les CAFs ont été mis en évidence dans différentes études [63], [142], [163].

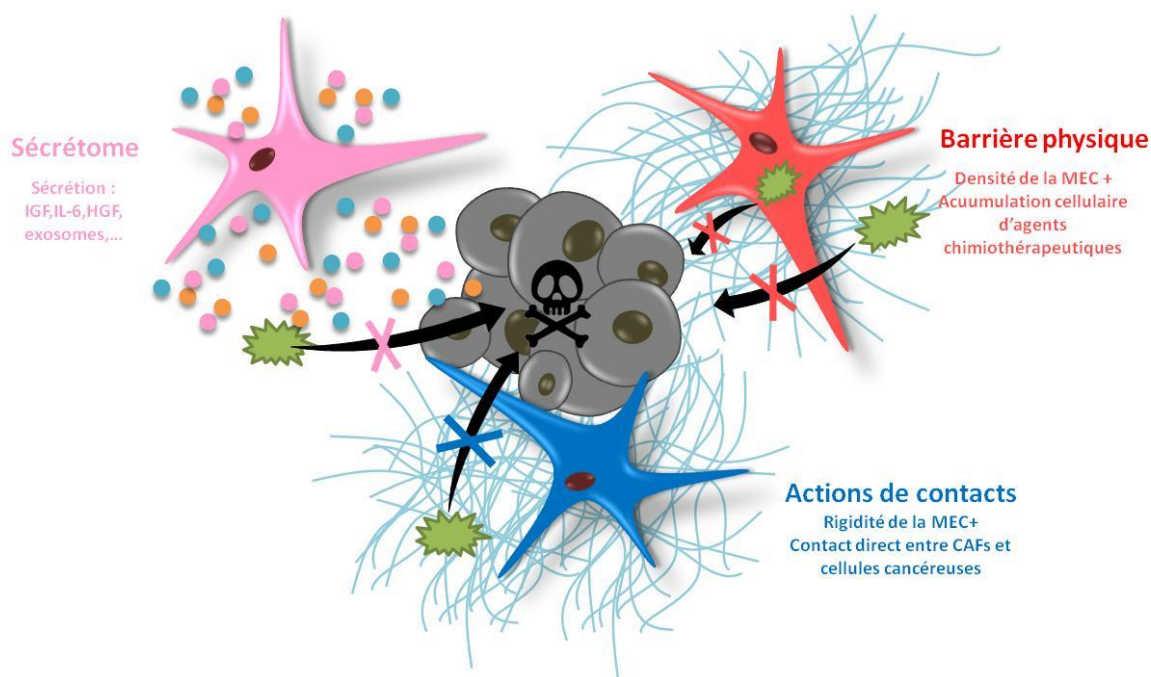


Figure 7 - Représentation schématique des modes d'actions des CAFs médiant la résistance aux traitements des cellules cancéreuses. Les traitements sont représentés en vert.

Dans la mesure où le microenvironnement tumoral semble jouer un rôle significatif dans l'efficacité des traitements anticancéreux, il constitue un centre d'étude et d'intérêt majeur. Ainsi, la combinaison d'un traitement actuel dont les effets sont limités par des résistances médiées par le microenvironnement, avec un traitement ciblant le microenvironnement, pourrait augmenter les effets des thérapies utilisées actuellement.

I.4. Traitement visant le microenvironnement

Les équipes qui se sont penchées sur des traitements visant le microenvironnement tumoral ont adopté des stratégies thérapeutiques différentes, tant au niveau des cibles choisies que pour la manière de les traiter.

I.4.1. Reprogrammation et normalisation du microenvironnement

Plusieurs méthodes reprogrammant le microenvironnement tumoral ou le normalisant en changeant ses caractéristiques sont à l'étude : 1) inactivation des CAFs *via* la modulation de leur phénotype de CAFs en un phénotype de fibroblastes normaux, 2) activation de la réponse immunitaire antitumorale, 3) normalisation des vaisseaux sanguins et de la matrice extracellulaire.

I.4.1.a-Inactivation des CAFs

Différents travaux se sont intéressés à la modulation du phénotype des CAFs : le but des traitements est d'inactiver les CAFs et ainsi de supprimer leur implication dans le développement du cancer.

L'ATRA, un métabolite actif de la vitamine A, régule négativement la contractilité du complexe actine-myosine des CAFs *via* un récepteur à l'acide rétinoïque. Ainsi la force dépendante de la myosine-II des CAFs est réduite. Le phénotype des CAFs étant devenu normal, ceux-ci ne peuvent pas migrer, remodeler la MEC et soutenir le développement du cancer [164].

De la même manière, le minnelide, en régulant la voie du TGF- β *in vitro*, inactive les CAFs, comme le montre l'augmentation des gouttelettes lipidiques contenant de la vitamine A, la diminution de l'expression de l' α -SMA et la réduction de la sécrétion de MEC [165]. Un essai clinique de phase II sur le minnelide chez des patients atteints d'un cancer du pancréas réfractaire est actuellement en cours.

Une étude a montré que le récepteur de la vitamine D (VDR) est exprimé sur les CAFs pancréatiques et que l'activation de ce récepteur *via* un ligand, le calcipotriol, permet une régulation de transcription des CAFs et leur fait perdre leur état d'activation. Ceci permet une reprogrammation des CAFs et un remodelage du microenvironnement. L'action du calcipotriol permet de réduire l'inflammation et la fibrose dans le microenvironnement tumoral humain, mais aussi d'augmenter le taux de gemcitabine intratumoral, de réduire le volume de la tumeur et d'augmenter de 57% la survie des souris par rapport à la chimiothérapie seule [166].

Ces travaux mettent en lumière le fait que le retour des CAFs à l'état de fibroblastes non activés permet d'inhiber leurs actions pro-tumorales, mais également de réduire la résistance aux traitements conventionnel.

I.4.1.b-Augmentation de la réponse immunitaire antitumorale

La stimulation de l'activité antitumorale du système immunitaire a été largement étudiée afin de mettre à contribution différents acteurs pouvant participer à la destruction des cellules cancéreuses.

Parmi les stratégies immunothérapeutiques, on peut noter l'utilisation de la cytokine GM-CSF (facteur stimulant de colonie), normalement sécrétée par les lymphocytes T activés, les fibroblastes, les cellules endothéliales, les macrophages et les lignées érythroïdes. Elle stimule la présentation antigénique des macrophages et des cellules dendritiques. Un vaccin autologue contre le cancer du pancréas a été mis au point, comprenant des cellules cancéreuses irradiées du pancréas spécifiques du patient et génétiquement modifiées pour sécréter le GM-CSF. Lors de la vaccination, le vaccin contre le cancer du pancréas GVAX sécrète le GM-CSF. À son tour, le GM-CSF peut stimuler le système immunitaire de l'organisme contre les cellules tumorales en renforçant l'activation des cellules dendritiques (CD) et en favorisant la présentation de l'antigène aux cellules B et T. De plus, l'utilisation de vaccins GM-CSF induit la production de cytokines par les cellules tumorales et améliore donc la réponse du système immunitaire aux cellules indésirables. Des essais cliniques de phase III sont en cours (NCT03495921; NCT03686683) [167]. Néanmoins le GM-CSF joue également un rôle pro-tumoral, ce qui implique une certaine complexité dans ses application cliniques [168]. D'autres types de vaccins anti-cancer récemment testés augmentent la réponse cytotoxique antitumorale [169], [170]. Pour l'instant aucun des vaccins anti-cancer arrivés en phase III n'a prouvé son efficacité. Mais les innovations en cours dans ce domaine sont néanmoins prometteuses [171].

D'autres cytokines, telles que les interférons $\text{IFN-}\alpha$ et $\text{IFN-}\beta$, les interleukines IL-2, IL-12, IL-15, et IL-21 sont également étudiées. La monothérapie utilisant des cytokines est cependant limitée actuellement : les concentrations adéquates de cytokines au niveau de la tumeur sont insuffisantes et sont associées à de hautes toxicités [172].

Une autre stratégie permettant d'augmenter la réponse immunitaire antitumorale est de lever l'inhibition des points de contrôles immunitaires. Les anticorps ciblant CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4), PD1 (Programmed death receptor 1), ou encore PD1L (ligand du PD1), augmentent l'infiltrat des lymphocytes T CD8 + en particulier, ce qui

augmente l'immunité antitumorale. Le potentiel thérapeutique des agents ciblant les points de contrôles immunitaires ont été listés et leurs phases cliniques étudiées [173].

D'autres méthodes visant l'immunité sont actuellement testées [167], comme par exemple l'inhibition de la différenciation des macrophages en macrophages pro-tumoraux.

Ainsi différentes stratégies immunothérapeutiques augmentant la réponse antitumorale de plusieurs acteurs du système immunitaires ont montré des résultats intéressants.

I.4.1.c-Normalisation de la MEC et des vaisseaux sanguins

Des molécules modulant la vascularisation et la MEC du microenvironnement ont également été testées afin d'améliorer la pénétration d'agents chimiothérapeutiques.

Parmi elles, le losartan semble être prometteur. Le losartan bloque le récepteur de l'angiotensine de type 1 et empêche ainsi la contraction des vaisseaux. Il a été étudié sur des modèles murins de cancer du pancréas, du sein et des ovaires et a permis d'améliorer les effets des traitements chimiothérapeutiques administrés [174]–[176].

Egalement, le losartan baisse l'expression de la thrombospondine-1 (un anti-angiogénique), et réduit la production de collagène et de hyaluronane intratumoraux. Cette réduction de la MEC permet une baisse de la compression des vaisseaux ce qui permet une meilleure délivrance des traitements. Ces études ont abouti à un essai de phase II du losartan associé à une chimio/radiothérapie dans le cancer du pancréas localement avancé [177].

Ces stratégies se basent sur la diminution des pressions anormales exercées sur les vaisseaux sanguins dans la tumeur afin d'augmenter la délivrance d'agents chimiothérapeutiques.

D'autres études ont quant à elles misé sur l'inhibition de l'angiogenèse induite afin de limiter l'apport en nutriments des cellules cancéreuses et ainsi inhiber le développement de la tumeur. Des molécules anti-angiogéniques (Bevacizumab, LY01008, Cediranib...) augmentant la survie globale de patients sont actuellement à l'étude seules ou en combinaison avec des agents chimiothérapeutiques en phase clinique III ou IV [167].

I.4.2. Modulation directe des sécrétomes et des signalisations paracrines

Les sécrétomes des différents composants du microenvironnement jouent un rôle essentiel dans la progression ou la réduction de la tumeur. L'inhibition de la sécrétion de certains facteurs, ou encore la modulation de cette sécrétion permet ainsi de limiter les effets autocrines et paracrines pro-cancéreux.

Une première stratégie est de limiter l'impact des cellules cancéreuses sur les autres composants du microenvironnement, comme les CAFs, pour éviter leur détournement au profit de la croissance tumorale.

Les cellules cancéreuses stimulent les CAFs *via* l'activation des récepteurs au PDGF. Plusieurs TKI (inhibiteurs de tyrosines kinases), notamment l'imatinib, le sorafénib et le sunitinib, confèrent une activité anti-PDGFR. L'imatinib présente également une activité kinase anti-PDGFR et anti-c-kit (c-kit: récepteur de facteur de croissance), entraînant une diminution de la prolifération et une régulation de l'expression des protéines dans les fibroblastes colorectaux humains [178]. De plus, le ciblage des PDGFR augmente l'absorption de la chimiothérapie, y compris le paclitaxel, en diminuant les forces comprimant les vaisseaux sanguins [179].

Une seconde stratégie est de limiter les actions pro-tumorales des composants du microenvironnement sur les cellules cancéreuses.

Duluc et al. [159] ont utilisé le pasiréotide, un inhibiteur de la sécrétion similaire à la somatostatine, qui active le récepteur sst1. Il inhibe ainsi la sécrétion de protéines, dont IL-6, par les CAFs. Ils ont pu ainsi inhiber efficacement les capacités de sécrétion des CAFs, ce qui a permis une réduction de la croissance tumorale et de la chimiorésistance à la gemcitabine [159]. Les analogues de la somatostatine sont utilisés en toute sécurité depuis des décennies sur le plan clinique, ce qui constitue une voie prometteuse pour l'exploration clinique, dont une grande partie a déjà été mise au point pour les tumeurs neuroendocrines du pancréas.

Le facteur de croissance HGF est principalement sécrété par les fibroblastes pour activer le son récepteur (HGFR) chez les cellules cancéreuses. Des rapports cliniques ont montré que l'inhibition de la signalisation du HGFR avait une grande valeur thérapeutique dans plusieurs types de cancers humains [180], [181]. Plusieurs essais cliniques de phases I et II ont étudié l'utilisation de nouvelles molécules ciblant HGFR comme le tivantinib, le cabozantinib et le crizotinib [218], [219], [220].

Les MMPs sécrétées par les CAFs jouent un rôle important dans le développement d'une tumeur (*cf. partie I.2.2.a*), notamment dans l'induction de la croissance tumorale, des métastases et de l'angiogenèse [185], [186]. Actuellement des essais cliniques étudient l'intérêt thérapeutique des inhibiteurs de MMPs (MMPIs). Par exemple, l'incyclinide (ou bien CMT-3 ou COL-3) est un inhibiteur de MMP ayant été soumis à plusieurs essais cliniques de phase I (essais cliniques NCT00004147, NCT00003721, NCT00001683) et de phase II (NCT00020683; [187]). D'autres inhibiteurs ont été récemment découverts, le JNJ0966, qui est hautement sélectif vis-à-vis de la MMP-9, et l'anticorps Fab 3369 qui cible la MMP-14 [188], [189].

I.4.3. Destruction du microenvironnement

Les thérapies ayant pour but la destruction directe du microenvironnement visent différentes cibles stratégiques telles que les CAFs et la MEC.

Le **hyaluronane** est une cible privilégiée des traitements visant la destruction microenvironnement, car il a été démontré qu'il contribue à la compression des vaisseaux (*cf. partie 5.1*). D'après les résultats précliniques, il semble que l'épuisement en hyaluronane soit en corrélation avec une libération élevée de médicament dans le compartiment tumoral (*cf. partie I.3.1*). Une étude de phase Ib a montré que, lorsque la hyaluronidase recombinante PEGylée (PEGPH20) était associée à la gemcitabine, les taux médians de survie globale était de 13,0 mois, respectivement, chez les patients avec de haut taux de hyaluronane et de 5,7 mois chez les patients à faible taux de hyaluronane tissulaire [190]. Dans une récente étude de phase II comparant PEGPH20 / nab-paclitaxel / gemcitabine et nab-paclitaxel / gemcitabine chez des patients atteints de d'adénocarcinome métastatique la survie médiane globale était respectivement de 8,5 et de 11,5 mois [191]. Le PEGPH20 présente des avantages thérapeutiques prometteurs chez les patients atteints d'adénocarcinomes pancréatiques avancés, en particulier dans le sous-groupe à teneur élevée en hyaluronane. De plus, le comparatif des traitements de l'étude de phase II est à l'heure actuelle à l'étude dans un essai clinique de phase III (NCT02715804). Pourtant, son utilisation est encore controversée car une récente étude clinique permet de mettre en doute ses effets bénéfiques [192].

Une autre cible privilégiée pour la destruction de composants du microenvironnement est bien entendu **les CAFs**. Une étude réalisée sur 65 patient a permis de mettre en lumière l'action destructrice du nab-paclitaxel (du paclitaxel conjuguée à de l'albumine) sur les CAFs, qui a pu être mesurée par la désorganisation du collagène et la diminution de la densité en CAF

α -SMA+, comparativement au traitement à la gemcitabine [193]. Cet effet du nab-paclitaxel a été en évidence dans une autre étude [194]. En effet, nab-paclitaxel permet de cibler les protéines protéiques riche en cystéine (SPARC), exprimées par les CAFs [195], se liant à l'albumine et surexprimées dans de nombreux cancers avancés. De plus, les tumeurs présentant des CAFs exprimant SPARC sont un signe de mauvais pronostic pour les patients [196].

Une équipe a quant à elle réussi à cibler et à détruire durablement la population de CAFs SMA+ d'une tumeur avec des nanoparticules de carboxyméthylcellulose-polyéthylène glycol-docétaxel (Cellax-DTX), effet qu'ils n'ont pas observé avec un traitement au nab-paclitaxel seul. De plus, comparé au traitement utilisant la gemcitabine ou le nab-paclitaxel, le traitement avec ces nanoparticules a augmenté la perfusion de la tumeur et prolongé la survie murine dans un modèle métastatique d'adénocarcinome pancréatique [197].

Cependant, la suppression directe des CAFs a donné lieu à une angiogenèse atténuée, à une prolifération accrue des cellules cancéreuses du pancréas, une augmentation de l'hypoxie tumorale, et à une modification défavorable des profils d'infiltration de cellules immunitaires [74]. Egalement, cette suppression n'a pas augmenté l'efficacité d'un traitement à la gemcitabine [74].

Ainsi, il est légitime de se demander si les stratégies déplétant les composants du microenvironnement afin d'améliorer la réponse aux agents chimio-thérapeutiques sont réellement efficaces, d'autant plus que quelques-uns des traitements testés en phase clinique montrent des résultats mitigés ou contradictoires. Néanmoins à l'heure actuelle, les études cliniques n'ont pas mis en lumière un quelconque lien entre la suppression du stroma, l'accélération de la progression tumorale et l'augmentation de métastases.

En conclusion, les stratégies thérapeutiques visant la régression du microenvironnement présentent à l'heure actuelle des résultats thérapeutiques incertains. Ils peuvent augmenter la délivrance et l'efficacité des traitements chimiothérapeutiques, mais aussi éliminer les barrières physiques et biochimiques empêchant les métastases tumorales [198]. En partant du principe que ces effets indésirables sont contrôlables, une des solutions permettant d'empêcher ces effets délétères serait de combiner la destruction du microenvironnement avec un autre traitement. Les approches renforçant l'intégrité des vaisseaux dans la tumeur, antagonisant la formation néovasculaire et transformant le potentiel métastatique cancéreux des cellules tumorales [199], peuvent accroître l'efficacité clinique des thérapies ciblant la destruction du stroma desmoplastique. Également, la progression des CAFs

entraînant un échappement immunitaire, et leur suppression exacerbant cet effet, un co-traitement avec des inhibiteurs du point de contrôle immunitaire (par exemple, anti-PD-1 / PD-L1 ou anti-CTLA4) peut potentiellement réduire les effets négatifs du stroma comme dans l'étude d'Ozdemir et al. [74]. Une autre solution serait d'identifier avec précision les sous-populations pro ou antitumorale, intra et inter-individus, notamment dans les CAFs, via des analyses génomiques ou des méthodes de génie génétique, afin de n'éliminer que les cellules ayant un effet délétère.

I.4.4. Combinaison de plusieurs stratégies

Il est possible de combiner plusieurs des stratégies thérapeutiques évoquées précédemment ou bien encore d'utiliser un traitement ayant des effets multiples sur le microenvironnement.

Une stratégie combinant déplétion des composants du microenvironnement et une normalisation de ses caractéristiques a été testée par Guo et al. [200].

Ces auteurs ont utilisé des nanoparticules chargées en Cisplatine et Rapamycine. Les deux composés étaient encapsulés dans du PLGA (poly-lactic-co-glycolic acide) et testés sur un modèle de xénogreffe de mélanome humain. Le cisplatine a provoqué l'apoptose des cellules cancéreuses, mais aussi des CAFs et donc un appauvrissement en CAFs dans la tumeur ainsi qu'une baisse de leur production en collagène. Les nanoparticules ont donc ensuite pu pénétrer plus facilement dans la tumeur. La rapamycine quant à elle a inhibé la prolifération tumorale en empêchant l'angiogenèse tumorale et en promouvant la normalisation des vaisseaux sanguins [200].

La combinaison entre inhibition des sécrétions et stimulation de la réponse immunitaire antitumorale a été étudiée. Il a été montré que l'inhibition de CXCL12 sécrétée par les CAFs induisait une accumulation de lymphocytes T dans la tumeur et agissait en synergie avec un anticorps anti-PD-L1 pour diminuer le nombre de cellules cancéreuses [201]. Ainsi il est possible d'augmenter les résultats positifs de l'immunothérapie en ciblant le microenvironnement.

Également, des thérapies modulant les signaux paracrines, les sécrétions et normalisant le microenvironnement vu précédemment ont également des effets sur la déplétion du microenvironnement.

Certaines thérapies ayant des buts initiaux comme la stimulation de l'immunité pro-tumorale ou encore l'inhibition des signaux paracrines, induisent parfois également une déplétion du microenvironnement. Un agoniste du CD40 utilisé en immunothérapie, un inhibiteur de la voie de signalisation Hedgehog inhibant des signaux paracrines entre cellules cancéreuses et CAFs [202] ont montré leur capacité à induire une ablation des composants du microenvironnement dans des modèles murins de cancer pancréatique, et ont permis d'augmenter la diffusion des traitements chimiothérapeutiques [204], [204]. Cependant, ces agents n'ont pas eu le succès escompté en phase clinique. Par exemple, le vismodegib, l'inhibiteur de la voie de Hedgehog, et l'agoniste du CD40, CP-870 893 (NCT02304393; NCT01064622, NCT01195415), n'ont présenté aucun bénéfice évident en termes de survie en recherche clinique [205], [206]. Un second inhibiteur de la voie Hedgehog, IPI-926 [207] a quant à lui diminué la survie des patients traités. De plus, il semble que l'ensemble des résultats collectés concernant la voie Hedgehog impliquent que le stroma activé par cette voie présente à la fois une fonction anti-angiogénique et participe à la baisse de la chimiosensibilité, tout en ayant simultanément une activité de réduction de la tumeur dans les adénomes pancréatiques [208].

Mathew et al. [209] ont avancé une explication selon laquelle l'inhibition des corécepteurs Hedgehog exprimés par les CAFs est dépendante de la posologie. La suppression de l'expression des trois corécepteurs Hedgehog, GAS1, BOC et CDON inhibe presque complètement la signalisation de Hedgehog et entraîne la suppression de la tumorigenèse et de l'angiogénèse. A contrario la suppression des deux récepteurs GAS1 et BOC favorise une croissance importante de la tumeur *in vivo* [209]. Ces résultats peuvent expliquer en partie l'échec clinique du blocage de la voie Hedgehog.

D'autres molécules testées ont des effets très variés sur le microenvironnement tumoral et agissent à différents niveaux. C'est le cas de la pirféridone, déjà cliniquement testé en tant que traitement anti-fibrotique dans le cadre de la fibrose pulmonaire idiopathique. *In vitro*, la pirféridone inhibe la prolifération, la migration et l'invasion des CAFs. Dans des modèles murins de cancer mammaire et de cancer pancréatique, il a été montré qu'elle inhibe la voie de signalisation du TGF- β , régule négativement l'expression des gènes COL1A1, COL3A1, HAS2, HAS3, et supprime la production de facteurs tels que PDGF-A, HGF mais aussi de matrice extracellulaire comme la périostine, le collagène de type I, le hyaluronane ou la fibronectine. L'administration orale de pirféridone à des souris présentant un cancer pancréatique réduit significativement la croissance tumorale dans le cas d'une co-implantation

de CAFs et de cellules cancéreuses. De plus, la pirfénidone associée à la gemcitabine inhibe plus efficacement la croissance tumorale orthotopique par rapport à la pirfénidone ou à la gemcitabine seule. Enfin dans le cas du modèle murin de cancer mammaire, la pirfénidone améliore l'efficacité antitumorale de la doxorubicine [210], [211].

L'avenir des thérapies anticancéreuses est sans doute à aller chercher du côté des combinaisons de plusieurs traitements et de plusieurs cibles, à adapter en fonction des particularités de chaque cancer.

II- Nanoparticules et champs magnétiques pour de nouvelles thérapies anticancéreuses

II.1. Les nanoparticules et leurs utilisations biomédicales

Les nanotechnologies, soit des technologies à l'échelle du nanomètre (10^{-9}m), sont porteuses d'un grand potentiel pour de nombreux domaines de recherche et de nombreuses applications associées. Les nanotechnologies comme outils thérapeutiques ou diagnostiques est un sujet d'étude en plein essor depuis quelques années car elles permettraient le développement de traitements plus rapides, beaucoup moins chers, plus efficaces et avec des effets secondaires diminués [212]. Le composant fondamental des nanotechnologies est la nanoparticule.

II-1.1-Nanoparticules

Majoritairement, les nanoparticules sont définies comme des particules ayant une taille comprise entre 1 et 100 nm. Néanmoins, certaines particules de dimensions allant jusqu'à $1\text{ }\mu\text{m}$ sont parfois considérées comme des nanoparticules selon les auteurs et documents. La Commission Européenne [213] a rendu en 2011 une recommandation dans laquelle il est écrit: *"2. On entend par «nanomatériau» un matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé contenant des particules libres, sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont au moins 50 % des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm. [...]"*

Ici, nous nous baserons sur cet avis afin de définir ce que sont des nanoparticules.

Elles sont obtenues par des méthodes de synthèse *bottom-up* ou *top-down*, et caractérisées par leur taille, leur surface (aire, morphologie et charge), leur concentration et leur composition.

Leur taille confère aux nanoparticules des propriétés notamment électroniques, photoniques ou magnétiques intéressantes pour la délivrance de principe actif et l'imagerie médicale, qu'elles n'auraient pas ou qui seraient moindres si leurs dimensions étaient supérieures à cette échelle. Plus les nanoparticules sont petites, plus elles ont une surface spécifique (ratio surface sur volume) augmentée, ce qui joue un rôle important dans des phénomènes comme la catalyse ou l'échange de chaleur. Leur réactivité, leur stabilité lors d'un processus chimique, leur résistance mécanique peuvent être augmentée de par leur taille par exemple [212]. Egalement, leur surface permet le greffage d'un grand nombre de molécules, notamment dans un but de ciblage et d'interaction avec une cible spécifique.

Les propriétés physiques des nanoparticules comprennent des propriétés optiques (couleur, capacités d'absorption, de réflexion...); des propriétés mécaniques (élasticité, ductilité...), des propriétés magnétiques et électriques (conductivité, résistivité). Les propriétés chimiques comprennent la réactivité des nanoparticules avec la cible, leur stabilité et leur sensibilité à des facteurs externes (humidité, atmosphère, chaleur, lumière), mais aussi des propriétés antibactériennes, antifongiques, désinfectantes ou bien encore des caractéristiques corrosives, anticorrosives, d'oxydation, de réduction et d'inflammabilité...

Ainsi les caractéristiques et propriétés uniques de chaque nanoparticule déterminent son potentiel et les applications à envisager.

II.1.2. Nanoparticules développés pour les applications biomédicales.

Bien que les nanoparticules soient utilisées dans des domaines très divers, comme l'électronique, la cosmétique, l'agroalimentaire, la catalyse, la construction ou encore les énergies renouvelables [212], nous allons ici présenter seulement les nanoparticules utilisées dans le domaine biomédical, et nous utiliserons pour cela une classification basée sur leurs matériaux : nanoparticules de carbone, nanoparticules organiques, et nanoparticules inorganiques.

II.1.2.a -Nanoparticules de carbone

Les nanoparticules entièrement constituées de carbone sont des nanoparticules dont les atomes peuvent être agencés de différentes manières, leurs conférant des propriétés différentes.

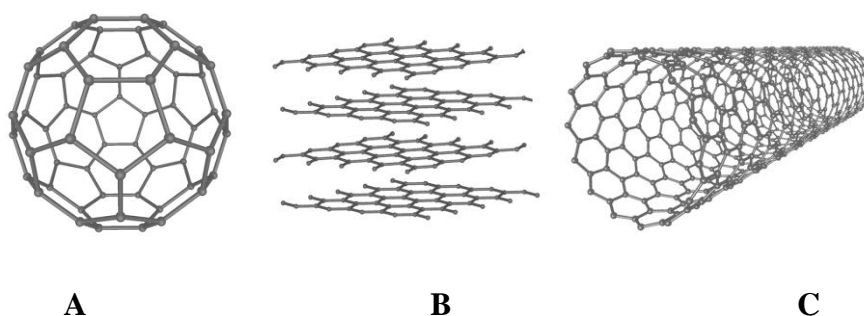


Figure 15 - Nanoparticules de carbone : A) Fullérène B) Graphène C) Nanotube

- **Un fullerène** est une molécule de carbone de forme sphérique composé d'environ 28 à 1500 atomes de carbone et qui présente un diamètre allant jusqu'à 8,2 nm pour une seule couche et de 4 à 36 nm pour les fullerènes multicouche.

- **Le graphène** est un matériau allotrope de carbone en un réseau hexagonal (nid d'abeille) dans une surface plane bidimensionnelle. En général, l'épaisseur de la feuille de graphène est d'environ 1 nm.

- **Un nanotube de carbone** est composé de feuilles de graphène enroulées sur elles-mêmes en cylindre creux, ce qui forme un tube de diamètre pouvant descendre jusqu'à 0,7 nm pour une seule couche et augmenter jusqu'à 100 nm pour plusieurs couches ; la longueur varie de quelques micromètres à plusieurs millimètres. Les extrémités peuvent être soit ouvertes soit coiffées par une molécule de demi-fullerène. Ces nanotubes ont de hautes conductivités électriques et thermiques.

II.1.2.b - Nanoparticules organiques

Comme leur nom l'indique, les nanoparticules organiques sont composées de molécules dites organiques. Elles sont biodégradables et non toxiques.

- **Les liposomes** sont des vésicules composées de phospholipides de diamètre entre 50 et 100 nm. Les liposomes sont classifiés en fonction de leur taille et du nombre de leurs couches. De par leurs caractéristiques physico-chimiques, les liposomes présentent de très bonnes propriétés de circulation, de pénétration et de diffusion [214].

- **Un dendrimère** est une molécule polymérique composée de monomères (dendrons) branchés de façon radiale à un cœur central. Le nombre de points de branchement rencontrés à partir du cœur sur un dendron peut varier. La taille des dendrimères varie entre 1 et 10 nm. Les dendrimères les plus utilisés sont composés de polyamidoamine (PAMAM) ou de polypropylène imines (PPI), mais ils peuvent également être composés de polyamines ou polypeptides, de polyamides, de polyesters, ou encore de carbohydrates [215].

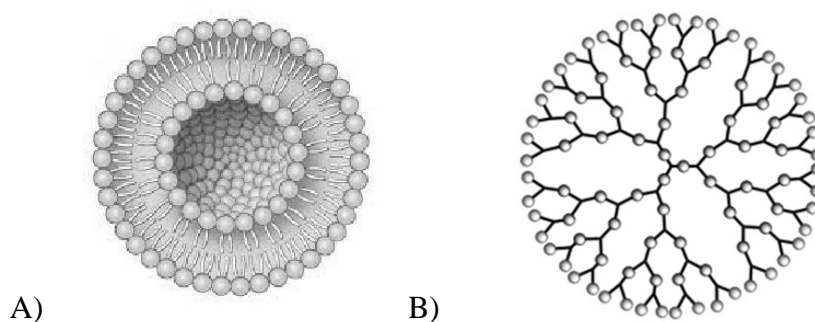


Figure 16 - Nanoparticules organiques A) Liposome B) Dendrimère

II.1.2.c- Nanoparticules inorganiques

Les nanoparticules inorganiques sont définies comme des nanoparticules ne comportant pas d'atome de carbone et élaborées à base de métaux ou d'oxydes de métaux. Pour les applications dans le domaine médical, ces nanoparticules doivent parfois être enrobées de molécules polymériques, permettant leur biocompatibilité, biodégradabilité et pouvant permettre leur vectorisation et ainsi déterminer leur distribution dans l'organisme. Presque tous les métaux peuvent être sous forme nanoparticulaire [212].

- **Les quantum dots** : sont des nanocristaux semi-conducteurs à base de sélénure de cadmium (CdSe), de sulfure de cadmium (CdS), de phosphure d'indium (InP) ou d'arséniure d'indium (InAs) dont les dimensions varient entre 2 et 10 nm. Ils sont caractérisés par un fort rendement quantique, un spectre d'émission élevé et une bonne photostabilité. De plus, les quantum dots possèdent un large spectre d'excitation et un spectre d'émission qui dépend de la taille du cœur de la nanoparticule. Plus la taille de la nanoparticule est grande, plus le spectre d'émission se rapproche du rouge, et inversement plus la taille est réduite, plus il se rapproche du bleu

- **Les nanoparticules d'or** sont comme leur nom l'indique composée d'or. Leur forme et leurs tailles sont très variables de quelques nanomètres (3-4nm) à plusieurs centaines.

- De la même manière, les **nanoparticules magnétiques (NPMs)** peuvent avoir des formes et des tailles variées. Leur composition dépend des propriétés que l'on souhaite leur voir attribuée mais elles sont néanmoins à base de matériaux sensibles au champ magnétique. Elles sont composées de métaux, comme le Fer, le cobalt, le nickel, etc... Cependant, certains métaux et alliages sont moins utilisés que d'autre en médecine en raison de leur toxicité potentielle. C'est pourquoi les oxydes de fer comme la magnétite (Fe_3O_4) et la maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, considérés comme biocompatibles, sont davantage utilisés.

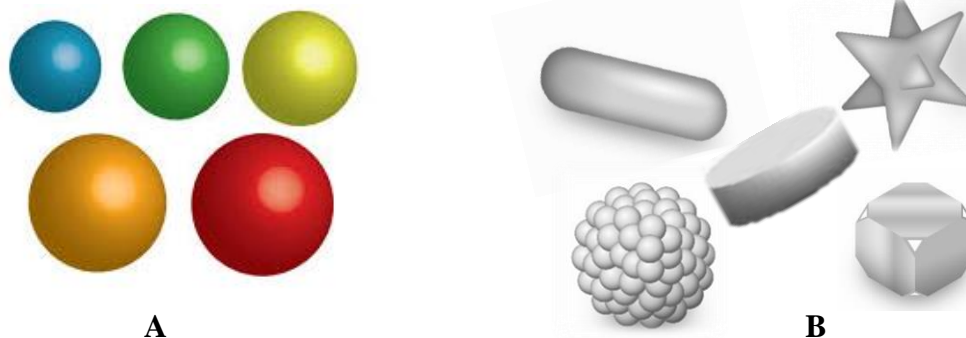


Figure 17- Nanoparticules inorganiques A) Quantum dots B) Différentes formes de nanoparticules d'or ou métalliques

II.1.2.d- Applications biomédicales des nanoparticules

Les différentes applications de toutes ces nanoparticules pour le traitement et le diagnostic en cancérologie sont répertoriées dans le tableau ci-dessous, non exhaustif.

Matériau	Type de nanoparticule	Applications biomédicales	
		Diagnostic	Thérapie
Carbone	Fullérènes	Agent de contraste en IRM, rayon X[216]	Thérapie photodynamique, Délivrance de chimiothérapie, Adjuvant de vaccins anti-cancer [216]
	Graphène	IRM[217]	Thérapie photothermique, thérapie photodynamique, traitement par hyperthermie magnétique , traitement sonodynamique traitement par hyperthermie par ultrasons , radiothérapie, Ingénierie tissulaire...[217]
	Nanotube de carbone	Biosenseur [218]	Hyperthermie (radiofréquence) Délivrance d'agent chimio-thérapeutiques, Thérapie génique, régénération des tissus [218]
Organique	Liposome	Imagerie de fluorescence[219]	Délivrance d'agents chimiothérapeutiques [219]
	Dendrimères	IRM [220]	Délivrance de d'agents chimiothérapeutiques [220]
Inorganique	Quantum dots	Sondes Fluorescentes [221]	-
	Nanoparticules d'or	Biosenseur, Imagerie fluorescente, Dosage immunologique [222]	Thérapie photothermique [222]
	NPMs	IRM [223]	Transport d'agent chimiothérapeutiques, Hyperthermie magnétique [223]

Tableau 1 - Résumé des applications diagnostiques et thérapeutiques des différents types de nanoparticules

Les nanotechnologies auront certainement un rôle à jouer dans l'amélioration de la survie globale des patients atteints de cancer grâce à la conception de dispositifs d'administration de nano-médicament polyvalents permettant un ciblage plus efficace des cellules cancéreuses. La délivrance de molécules chimiothérapeutiques via des NPMs, des nanomicelles, des liposomes et autres ont notamment montré une meilleure efficacité par rapport aux formulations existantes en raison d'une meilleure biodisponibilité, d'une pénétration cellulaire accrue ou d'un ciblage actif.

II.1.3. Devenir in vivo des nanoparticules

Les nanoparticules étant testées dans le cadre de nombreuses applications biomédicales, un grand nombre d'études se sont attachées à décrire leurs parcours et interactions dans un organisme vivant.

II.1.3.a - Clairance

Après injection des nanoparticules dans la circulation sanguine, celles-ci rencontrent immédiatement un environnement complexe de protéines plasmatiques et de cellules immunitaires.

Des protéines s'adsorbent à leur surface, telles que les immunoglobulines, les composants du système du complément, les opsonines, les fibrinogènes et l'albumine[224]. Ces protéines peuvent former un couronne de biomolécules et ainsi déterminer le transport des nanoparticules dans les liquides physiologiques, leur capture cellulaire, leur bio-persistance et leur éventuelle toxicité pour l'organisme [225]. L'adsorption des opsonines par exemple, entraîne leur phagocytose par les cellules du système réticulo-endothélial (RES) dans la circulation sanguine et dans les tissus[224], [226]. Certaines protéines telles que l'albumine stabilisent les nanoparticules tandis que d'autres, comme le fibrinogène, provoquent leur agrégation.[227]. De plus, l'adsorption de protéines à la surface des nanoparticules peut augmenter leur taille globale, changer leur charge de surface ou favoriser leur agrégation, provoquant ainsi de profondes modifications de leurs propriétés physico-chimiques[228].

II.1.3.b-Effet EPR (Enhanced Permeability Effect)

Lors de l'angiogenèse tumorale, la vascularisation est perturbée, rapide. Ainsi les capillaires formés sont discontinus et présentent de larges fenestrations (jusqu'à 600 nm) comparé aux capillaires des tissus sains (60-80 nm) [229]. Cette fenestration de l'endothélium permet l'extravasation des nanoparticules qui vont s'accumuler dans l'espace interstitiel. Ce phénomène est appelé effet EPR (Enhanced Permeability and Retention Effect) [230], [231]. Néanmoins ce phénomène est limité et varie d'une étude à une autre, car l'effet EPR dépend du degré de vascularisation de la tumeur. En effet celles-ci présentent des hétérogénéités de vascularisation et de porosité de leurs vaisseaux [232]. Par exemple, l'effet EPR est peu observé dans les tumeurs hypo-vascularisées comme dans les cas des cancers de la prostate et du pancréas [233].

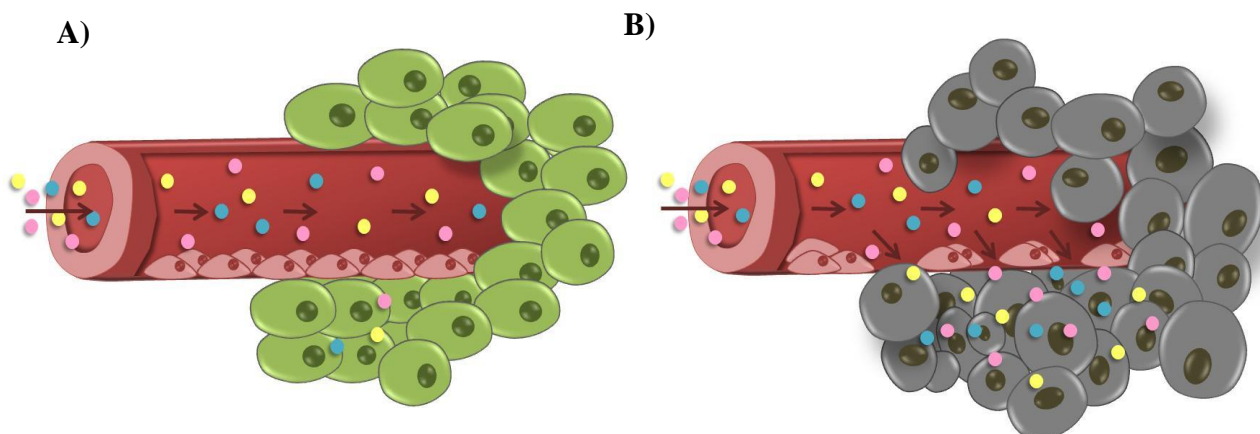


Figure 19.- Illustration de la circulation sanguine des nanoparticules A) dans des tissus sains et B) dans une tumeur (effet EPR)

Lorsque des nanoparticules d'oxyde de fer sont administrées par voie intraveineuse, leur demi-vie plasmatique chez l'humain varie de 2h à plus de 24h en fonction leurs propriétés physico-chimiques. Chez les souris elle varie de quelques minutes à plusieurs jours [234], [235].

Par conséquent les nanoparticules ne sont pas seulement caractérisées par leurs propriétés de synthèse mais également par les interactions multiples et dynamiques avec le milieu dans lequel elles se trouvent. In vivo, ces interactions jouent un rôle important pour leur devenir dans l'organisme et dans les cellules, ainsi que pour leurs effets thérapeutiques. [227]. Comme nous allons le voir dans les prochains paragraphes, différentes propriétés intrinsèques des nanoparticules influent donc sur leur devenir et leur efficacité in vivo, tant au niveau cellulaire qu'au niveau de l'organisme entier.

II.1.3.c-Enrobage et Ciblage

Les nanoparticules peuvent être recouvertes de couches supplémentaires qui leur confèrent des propriétés nouvelles pouvant améliorer ou non leur utilisation *in vivo*. Ces couches peuvent être de nature polymérique (ex: polyéthylène glycol(PEG), dextran), métallique (ex: couche d'or) ou encore minérale (ex: silice).

- **Biocompatibilité**

En premier lieu, enrober des nanoparticules les rend biocompatibles. [235]. Le Nickel et le Cobalt peuvent être rendus biocompatibles par l'ajout d'une couche d'or [236], [237]. Seongbom jeon et al. ont eux rendu leurs nanoparticules moins cytotoxiques en les enrobant d'alginate ou de PGLA [238].

- **Solubilisation et stabilité**

Ensuite l'utilisation de polymère d'enrobage permet d'empêcher la déstabilisation et l'agrégation des nanoparticules, mais également de favoriser leur solubilisation dans les milieux aqueux et biologiques. Après internalisation, il a été montré que l'enrobage des nanoparticules pouvait aussi influencer sur leur temps de dégradation. Ainsi des nanocubes mis dans des conditions chimiques similaires à celles intralysosomales se dégradaient plus lentement et gardaient plus longtemps leur aimantation lorsqu'ils étaient recouverts d'un polymère amphiphile par rapport à lorsqu'ils étaient recouverts de polyéthylène glycol (PEG)[227].

- **Clairance et demi-vie plasmatique**

De plus les nanoparticules non enrobées sont éliminées par l'organisme dans les heures qui suivent l'injection [239], [240]. La clairance rapide de ces nanoparticules limite leur utilisation car celles-ci n'ont pas le temps d'atteindre le tissu ciblé [241]. L'enrobage des nanoparticules peut les rendre furtives. En effet, afin d'empêcher la reconnaissance des nanoparticules par le RES *via* la diminution de l'opsonisation, différents polymères d'enrobage (le polyéthylène glycol (PEG), le poloxamere, ou la polyxamine) ont été testés. Le PEG notamment est un polyéther synthétique linéaire, neutre et hydrophile qui augmente fortement la furtivité, la demi-vie et la biocompatibilité des nanoparticules. Il crée un champ de répulsion stérique autour de la nanoparticule, empêchant ainsi l'adsorption des opsonines. [235] Des études ont mis en évidence que son efficacité dépend de son poids moléculaire [226], [242], [243].

- **Adressage**

Le dernier avantage de l'enrobage des nanoparticules magnétiques est que celui-ci permet de les adresser à une cible thérapeutique. En effet, les nanoparticules non adressées se retrouvent dans les organes du RES, majoritairement dans le foie et dans une moindre proportion dans la rate [228]. En utilisant un enrobage approprié il est possible de diriger les nanoparticules vers d'autres cibles, comme une tumeur par exemple. Pour cela, il existe deux stratégies principales : l'adressage passif et l'adressage actif.

L'adressage passif consiste à faire varier la nature et la longueur des molécules de l'enrobage, ainsi sa charge de surface pour favoriser l'accumulation des nanoparticules dans un tissu particulier ou leur internalisation cellulaire. Par exemple, le polymère biocompatible le plus utilisé pour faciliter l'adressage des nanoparticules aux organes du RES est le dextran car

il est reconnu par les macrophages et entraîne donc la phagocytose des nanoparticules par les cellules immunitaires [244]. Néanmoins la phagocytose de nanoparticules d'oxyde de fer enrobées de silice ou de citrate s'est révélée supérieure à celle des nanoparticules enrobées de dextran [245], [246].

L'adressage actif consiste à conjuguer à la surface des nanoparticules des ligands capables de se lier spécifiquement à des épitopes ou à des récepteurs de surface. Ce principe est entre autre appelé vectorisation des nanoparticules. Les ligands peuvent être des oligosaccharides, des peptides, des aptamères, des anticorps... Ils permettent de cibler un type cellulaire précis, un tissu et d'y adresser les nanoparticules. Par exemple, la vectorisation de nanoparticules avec l'hormone LHRH (luteinizing hormone releasing hormones) a permis la liaison au récepteur surexprimé avec une forte incidence dans le cancer du sein [247] et a donc mené à un ciblage de la tumeur (59% contre 9% pour les nanoparticules non vectorisées). De plus, Vegerhoff et al. [248], en utilisant des nanoparticules vectorisées avec Cetuximab (anti-EGFR), ont montré par IRM une accumulation des nanoparticules dans les tumeurs de souris. Pourtant il peut arriver que la quantité de nanoparticules vectorisées dans la tumeur ne soit pas supérieure à celle de nanoparticules non vectorisées. Ceci peut s'expliquer par une accumulation tumorale des nanoparticules liée à l'effet EPR seul, le ligand ne participant pas à l'extravasation des nanoparticules des capillaires. De plus certains ligands peuvent être plus immunogènes que d'autres et favoriser la clairance des nanoparticules.

II.1.3.d-Dimensions

La taille hydrodynamique d'une nanoparticule comprend le cœur de la particule, c'est à dire la partie magnétique, ainsi que son enrobage et les molécules interagissant autour.

- **Biodistribution**

Pour une application thérapeutique, la taille hydrodynamique est à prendre en compte car elle influence la clairance plasmatique et le devenir des nanoparticules après leur injection dans l'organisme. C'est l'un des paramètres les plus importants à prendre en compte pour la biodistribution [235].

En effet, lorsque la taille des nanoparticules est inférieure à 6-10 nm, elles sont rapidement excrétées par les reins [235], [249]. En règle générale, les nanoparticules de taille hydrodynamique élevées sont phagocytées plus efficacement par les macrophages que des nanoparticules de petite taille similaires (même enrobage, matériau...) [224], [250], [251]. Entre 100 et 300 nm, elles sont massivement captées par les organes du RES (foie et rate) [235].

Généralement, les nanoparticules dont la taille hydrodynamique est située approximativement entre 10 et 100 nm ont une demi-vie plasmatique prolongée, car elles sont suffisamment petites pour échapper à la phagocytose par le RES et pour diffuser à travers les capillaires sanguins vers les tissus. Ceci leur permet d'accéder à d'autres organes que ceux du RES, et notamment de cibler des tumeurs [235].

- **Internalisation cellulaire**

La taille hydrodynamique des nanoparticules est également un paramètre important pour leur internalisation cellulaire. C'est particulièrement le cas pour les nanoparticules vectorisées. Les nanoparticules de taille élevée initient le processus d'enveloppement de la membrane menant à leur endocytose en se liant à de nombreux récepteurs. Cependant, une nanoparticule de diamètre supérieur à 60 nm entraîne une pénurie des récepteurs ciblés, ce qui diminue son absorption car moins de récepteurs sont disponibles pour internaliser d'autres nanoparticules [235]. A l'inverse, les nanoparticules sphériques de taille inférieure à 30 nm, ne parviennent pas à initier le processus d'enveloppement de la membrane car elles ne se lient pas à suffisamment de récepteurs. Néanmoins si un grand nombre d'entre elles se lient à des récepteurs situés à proximité elles peuvent tout de même déclencher leur internalisation [235].

Bien que le diamètre optimal exact varie d'une étude à l'autre (selon le type de nanoparticules, de cellules...), une nanoparticule sphérique revêtue de ligand, dont le diamètre est compris entre 30 et 60 nm, peut recruter et se lier à un nombre suffisant récepteurs cellulaires pour déclencher le processus d'enroulement membranaire sans pénurie de récepteurs [235]. La plupart des études *in vitro* montrent une absorption cellulaire maximale dans la plage de 10 à 60 nm, indépendamment de la composition du noyau ou de la charge en surface [252]–[254].

II.1.3.e-Concentration

La demi-vie plasmatique est dépendante de la dose administrée chez les modèles animaux comme chez les humains [255], [256]. Ce phénomène, ayant lieu pour de nombreux types de nanoparticules, est liée à la saturation des macrophages[257]. Par exemple une étude a démontré que les macrophages du foie et de la rate chez les rats sont saturés lorsque 10^{15} nanoparticules sont injectées [258]. Les nanoparticules restantes circulent généralement dans le sang plus longtemps et ont plus de chance d'atteindre d'autres organes [255].

Dans les prochaines parties nous allons nous intéresser davantage aux nanoparticules magnétiques (NPM). Néanmoins, certains objets magnétiques utilisés dans les études qui seront citées ne correspondent pas à la définition donnée en partie I.1 sur les nanoparticules en termes de dimensions. Elles seront néanmoins prises en compte mais le terme « particules » sera utilisé au lieu de NPMs. Pour autant elles ne feront pas parti des tableaux récapitulatifs présentés.

Les NPMs sont sensibles aux champs magnétiques et cette propriété peut être exploitée pour des utilisations thérapeutiques.

II.2.-Champs magnétiques et leurs effets sur la matière

II.2.1-Définition du magnétisme et des champs magnétiques

Le magnétisme est défini comme étant un ensemble de phénomènes physiques pour lesquels des objets exercent des forces attractives ou répulsives sur d'autres matériaux. Le champ magnétique appelé B dans ce manuscrit correspond au champ d'induction magnétique et est défini comme une région de l'espace où un objet magnétique est soumis à une force. Le champ magnétique en un point est caractérisé par son vecteur de champ noté \vec{B} : il a une direction, un sens et une intensité (ou amplitude) représentée par sa longueur et exprimée en Tesla (T). Le champ magnétique noté H dans ce manuscrit est le champ d'aimantation qui décrit l'aimantation de la matière sous l'effet d'un champ magnétique externe. Il s'exprime en Ampère par mètre (A/m)

Les lignes de champ magnétique indiquent en tout point du champ la direction et le sens du vecteur du champ \vec{B} : ce dernier peut être uniforme ou donner lieu à un gradient (cf. *paragraphe suivant*). La variation du sens et de l'amplitude du vecteur au cours du temps, si elle est périodique, est définie par la valeur de fréquence d'oscillation du champ, exprimée en Hertz (Hz).

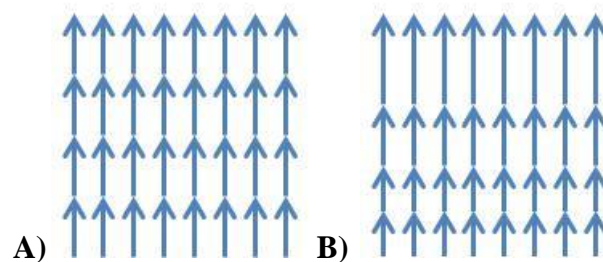


Figure 8 - A) Configuration de champ uniforme B) Exemple de configuration de champ non uniforme

Ce manuscrit caractérisera les champs magnétiques en utilisant les termes suivant définis ci-dessous :

-uniforme : le vecteur de champ a la même intensité en tout point

-non uniforme (ou gradient de champ) : l'intensité du vecteur de champ n'est pas la même en tout point de l'espace

-statique : le vecteur de champ ne varie pas dans le temps

-alternatif : le sens du vecteur de champ est inversé plusieurs fois au cours du temps tandis que sa direction reste la même au cours du temps. Son intensité maximale est toujours la même.

-ininterrompu : champ appliqué sans arrêt durant le temps d'application

-intermittent : champ appliqué, arrêté pendant un temps donné, puis remis en route une ou plusieurs fois

-rotatif : champ dont la direction du vecteur de champ tourne autour d'un axe. S'il est parfaitement rotatif, son intensité reste la même au cours du temps

-unidirectionnel : le vecteur de champ est dans une seule direction

-bidirectionnel : le vecteur alterne entre deux axes, en général dans la littérature il s'agit de directions orthogonales

En l'absence de précision à ce sujet dans le texte, par défaut les champs seront considérés comme ininterrompus et unidirectionnels. Si la configuration du champ n'est pas précisée, c'est qu'elle n'est pas connue.

II.2.2- Sources de champ magnétique

Les champs magnétiques peuvent être issus d'aimants mais également de courants électriques. Un courant électrique parcourant un fil rectiligne crée un champ magnétique **B**, tangent au cercle centré sur le fil, proportionnel au courant et qui décroît en s'éloignant du fil. Ainsi, les bobines sont couramment utilisées afin de générer un champ magnétique, perpendiculaire au plan des spires. Les aimants permanents génèrent eux aussi des champs magnétiques à leur voisinage. Il est également possible d'induire un champ magnétique avec des électro-aimants : les fils conducteurs sont enroulés autour de matériaux ferromagnétiques (*cf. partie II.2.3*).

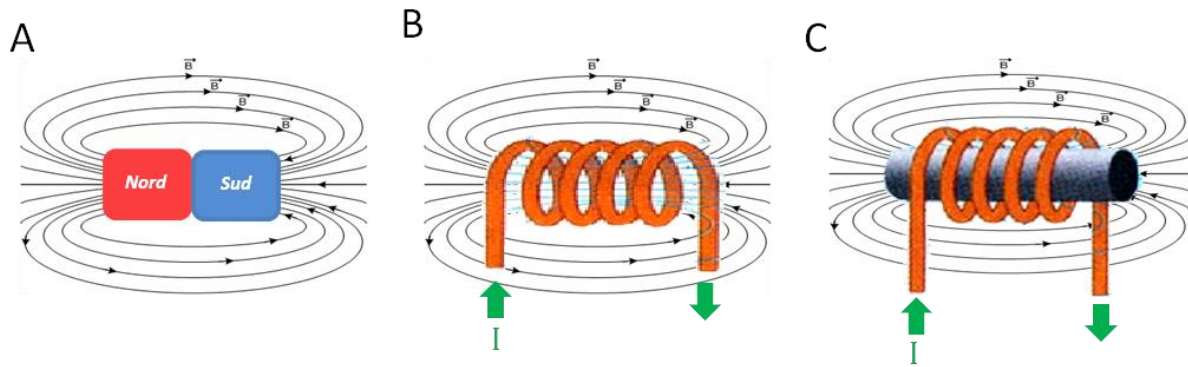


Figure 9- A) Aimant permanent (dipôle), B) Bobine, C) Electroaimant

II.2.3-Comportement des matériaux magnétiques

Les propriétés magnétiques des matériaux s'expliquent par la présence de **courants** dans la matière, liés au mouvement des électrons autour du noyau et au moment magnétique propre d'un électron créé par sa rotation sur lui-même.

Le moment magnétique d'un matériau, résultant de la somme des moments magnétiques de tous les atomes/toutes les parties de ce matériau, peut être inhérent au matériau lui-même et être nul ou non nul ; on dit alors que c'est un moment magnétique permanent.

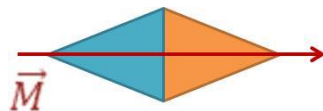


Figure 10- Illustration schématique d'un moment magnétique

Un moment magnétique est dit induit lorsqu'il est créé par la présence d'un champ magnétique \vec{B} . Dans ce cas, le moment magnétique d'un corps se manifeste par la tendance qu'a ce corps à s'aligner dans le sens d'un champ magnétique. Par ailleurs, tout système possédant un moment magnétique produit également un champ magnétique autour de lui. Le moment magnétique se note \vec{M} et s'exprime en ampère mètre carré ($A \cdot m^2$). Le moment magnétique est une grandeur vectorielle.

Plusieurs phénomènes magnétiques sont observés selon les matériaux en présence ou en absence d'un champ magnétique extérieur :

- le *diagnéisme* : En l'absence de champ magnétique, le moment magnétique global permanent du matériau est nul. En présence de champ magnétique, les matériaux alignent leur

moment magnétique de façon antiparallèle avec les lignes de champ soit un moment magnétique opposé au sens du champ magnétique, ce qui explique pourquoi les corps diamagnétiques sont repoussés par les aimants (**Fig.11**).

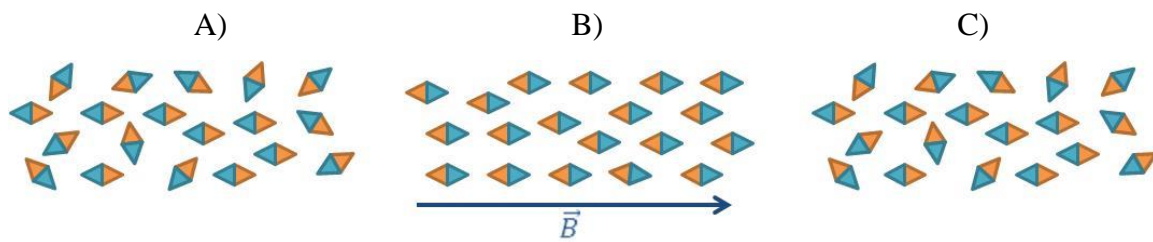


Figure 11- Illustration schématique des mouvement des moments magnétiques d'un matériau diamagnétique A) avant, B)pendant, C) et après l'application d'un champ magnétique

- *le paramagnétisme* : En l'absence de champ magnétique, les différents moments magnétiques sont orientés au hasard, n'interagissent pas entre eux, résultant en un moment magnétique global et une aimantation nuls. En présence d'un champ magnétique externe le matériau a tendance à aligner ses moments magnétiques dans le sens des lignes du champ. Quand le champ est arrêté, le matériau perd son aimantation et le moment magnétique redevient nul (**Fig.12**).

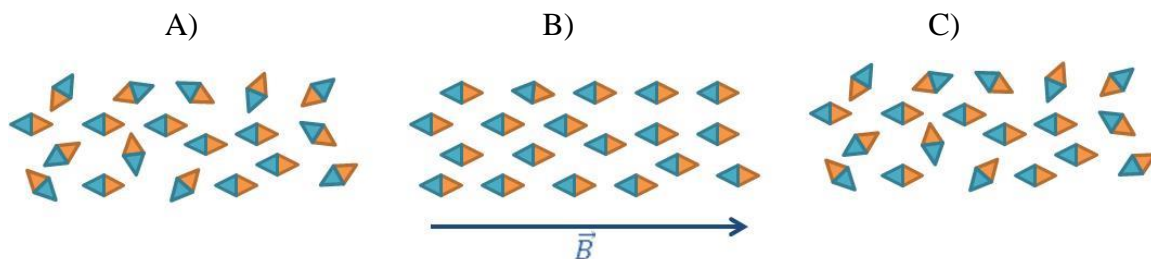


Figure 12- Illustration schématique des mouvement des moments magnétiques d'un matériau paramagnétique A) avant, B)pendant, C) et après l'application d'un champ magnétique

- *le ferromagnétisme*: Dans un tel matériau, les moments magnétiques de leurs atomes sont alignés dans la même direction et dans le même sens dans de nombreuses régions du matériau, appelées domaines. Ceci est dû à une interaction entre les différents moments magnétiques du matériau. En présence d'un champ magnétique extérieur, les différents moments s'alignent dans la direction des lignes de champ. Une fois le champ arrêté les moments magnétiques des différents domaines restent orientés dans le sens du champ et le moment magnétique total est non nul. Lorsque tous les moments magnétiques sont orientés de la même manière, on dit que le matériau est saturé. Cet ordre magnétique n'apparaît que sous une température seuil, appelée température de Curie (T_C). Ce phénomène concerne le Fer, le Nickel et le Cobalt, leurs alliages

et quelques terres rares. Au-delà de cette température, ces matériaux se comportent comme des matériaux paramagnétiques (**Fig.13**).

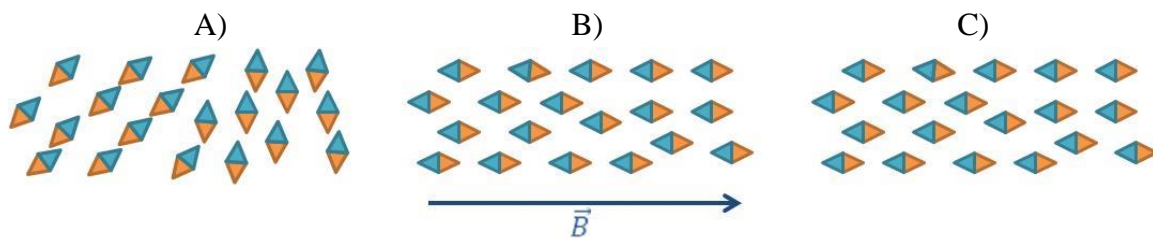


Figure 13- Illustration schématique des mouvements des moments magnétiques d'un matériau ferromagnétique A) avant, B) pendant, C) et après l'application d'un champ magnétique

- *l'antiferromagnétisme* : en l'absence de champ, les différents moments du matériau sont antiparallèles deux à deux et égaux en amplitude, ce qui conduit à un moment total nul du matériau. Au-dessus de la température de Néel, un corps antiferromagnétique adopte un comportement paramagnétique.

- *le ferrimagnétisme* : Les ferrites (famille d'oxydes de fer particuliers), ont des propriétés similaires aux substances ferromagnétiques : ils possèdent un moment magnétique global non nul en l'absence de champ magnétique extérieur. En effet leurs différents moments magnétiques s'alignent antiparallèlement deux à deux, ont des amplitudes différentes et donc ne se compensent pas entre eux. Contrairement aux matériaux ferromagnétiques, les corps ferrimagnétiques sont des isolants électriques. En présence d'un champ magnétique extérieur, les moments magnétiques ont tendance à s'aligner dans la direction du champ magnétique. Lorsque la température est inférieure à la température de Curie, un comportement similaire aux matériaux ferromagnétiques est observé et une saturation de l'aimantation du matériau apparaît pour une valeur de champ particulière. Au-dessus de la température de Curie, le matériau adopte un comportement similaire aux matériaux paramagnétiques.

Un dernier phénomène est le **superparamagnétisme** : des matériaux ferromagnétiques peuvent adopter un comportement de matériaux paramagnétiques lorsqu'ils sont sous la forme de nanoparticules. Pour pouvoir atteindre un régime superparamagnétique, un matériau doit avoir une taille suffisamment petite, et cette taille critique dépend du matériau lui-même. Par exemple les nanoparticules d'oxyde de fer peuvent atteindre cet état pour des dimensions en-dessous de 20 nm, à température ambiante.

On distingue deux régimes pour les nanoparticules ferromagnétiques monodomaines : le régime superparamagnétique lorsque l'agitation thermique est suffisante pour induire un retournement spontanée de l'aimantation et le régime ferromagnétique lorsque cette agitation thermique est insuffisante pour provoquer un retournement d'aimantation sur une échelle de temps pertinente pour l'expérience ou l'étude en cours. Ainsi, une température peut être définie, pour un temps de mesure donné, comme la température de transition entre les régimes superparamagnétique et ferromagnétique.

La différence entre les deux régimes est illustrée par les courbes décrites par l'aimantation du matériau en fonction de l'amplitude du champ magnétique (**Fig.14**). L'aimantation correspond à une densité volumique de moments magnétiques.

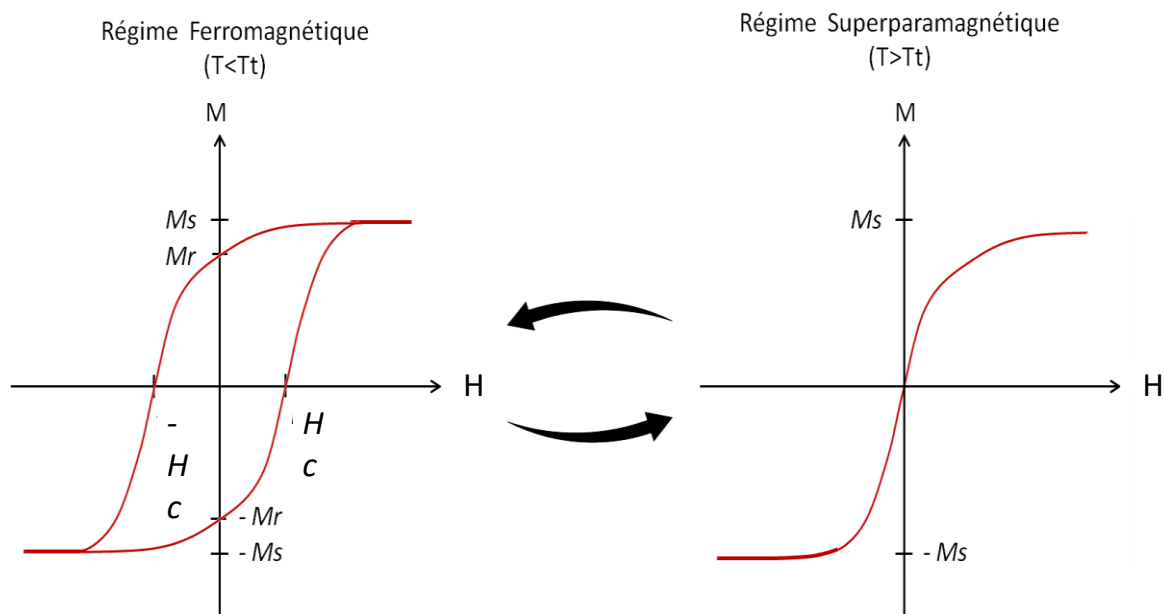


Figure 14- Courbes d'aimantation d'un matériau ferromagnétique (gauche) et d'un matériau superparamagnétique (droite). L'aimantation (M) du matériau est tracée en fonction du champ magnétique (H).

Le régime superparamagnétique est une propriété des matériaux à l'échelle nanométrique qui nous intéresse tout particulièrement pour l'application thérapeutique que nous allons étudier plus en détails dans la partie suivante de ce manuscrit.

II.2.4- Propriétés et applications des états magnétiques des nanoparticules magnétiques

II.2.4-a. Champs magnétiques hautes fréquences ($\geq 10\text{kHz}$) - Effet thermique

- **Principe**

Lorsqu'elle est soumise à un champ magnétique de fréquence de plus en plus élevée, une nanoparticule superparamagnétique transite progressivement vers le régime ferromagnétique. Ainsi il y a ouverture de son cycle d'hystérésis, ce qui entraîne un échauffement de la nanoparticule, l'aire du cycle étant de l'énergie dissipée sous forme de chaleur. On appelle également cette chaleur dissipée « pertes par hystérésis ». En outre, plus la fréquence de parcours de ce cycle d'hystérésis est élevée, plus la NPM dissipe de la chaleur. La puissance thermique dissipée par unité de masse de matériau ferromagnétique, appelée Specific Absorption Rate (SAR), correspond à l'équation suivante:

$$\text{SAR} = Af \text{ (1)}$$

A : aire du cycle d'hystérésis du matériau considéré; f : fréquence du champ magnétique

Le cycle d'hystérésis décrit les différents états d'aimantation par lesquels passe un matériau lors de l'application d'un champ magnétique (**Fig.14**). L'aimantation à saturation M_s correspond à l'aimantation du matériau une fois que tous ses moments magnétiques sont alignés avec le champ. L'aimantation rémanente M_r correspond à l'aimantation d'un échantillon lorsque le champ magnétique appliqué est arrêté ; celle-ci est non-nulle (sa valeur est à minimiser si l'on cherche à éviter l'agglomération des nanoparticules). Afin de faire retrouver au matériau une aimantation nulle, il est nécessaire de le soumettre à un champ opposé. Une augmentation forte de ce champ opposé entraîne l'aimantation du matériau dans le sens contraire à celui initial (H_c , valeur du champ coercitif), jusqu'à une possible saturation inverse. En appliquant alternativement des champs magnétiques de sens opposés on peut donc faire parcourir entièrement à une nanoparticule son cycle d'hystérésis

- **Traitement par hyperthermie magnétique**

L'objectif de l'hyperthermie magnétique ou MFH (pour *Magnetic Fluid Hyperthermia*) est d'induire leur échauffement de NPMs *via* l'utilisation de champs magnétiques alternatifs à haute fréquence. Au niveau biomédical, ce phénomène a été étudié en tant que stratégie antitumorale alternative ou complémentaire aux thérapies conventionnelles (chimiothérapie et

la radiothérapie). En effet il a été démontré que les cellules tumorales sont plus sensibles aux augmentations de températures que les cellules saines, et qu'une hyperthermie (soit une température d'environ 45°C) dans la tumeur peut engendrer sa destruction [259].

Les NPMs sont des outils très intéressants pour une génération locale d'hyperthermie au niveau tumoral. Cependant à l'échelle nanométrique, l'énergie dissipée par ces objets est relativement faible, il est donc nécessaire d'appliquer des champs magnétiques de fréquences supérieures à quelques dizaines de kHz pour générer une puissance de chauffe suffisante.

En 1957, l'étude de R. K. Gilchrist et al. [260] montrent des nanoparticules d'oxyde de fer ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) d'un diamètre entre 20 nm et 100 nm, exposées à un champ magnétique alternatif d'environ 22 mT à 1,2 MHz, engendrent une augmentation de température suffisante pour détruire les cellules tumorales localisées dans des ganglions lymphatiques contenant des métastases, après 3 minutes d'application du champ magnétique. Depuis, de nombreuses équipes de recherche ont testé cette stratégie, et la société MagForce, fondée en 1997, fut la première [261] à développer cette technique au stade préclinique [262], puis clinique. Une étude clinique sur la récurrence de glioblastome a montré une augmentation de quelques mois de la médiane de survie des patients grâce à une combinaison de radiothérapie et d'hyperthermie magnétique [263].

Cependant, la théorie selon laquelle l'hyperthermie magnétique provoque une élévation thermique globale est actuellement en discussion [264]. En effet, plusieurs études étudiant l'hyperthermie magnétique montrent une diminution de la viabilité cellulaire, sans détecter d'élévation de la température suffisante dans le milieu pour induire des dommages aux cellules [265], [266]. Trois hypothèses principales ont émergées afin d'expliquer ce phénomène.

La première est issue d'une étude théorique qui propose que l'oscillation des NPMs dans un champ alternatif inhomogène crée des ultrasons [267].

Une deuxième hypothèse se base sur des résultats expérimentaux montrant une augmentation de température au voisinage de NPMs [268], [269], [25]. La température locale augmente de plusieurs dizaines de degrés à la surface des NPMs puis décroît de manière abrupte à quelques nanomètres de celle-ci.

La dernière hypothèse est que l'effet délétère de l'hyperthermie magnétique sur les cellules serait dû à une action mécanique des NPMs. Leur rotation ou leur translation engendrerait des signaux de mécano-transduction dans les cellules et perturberait leur fonctionnement [271]. Néanmoins une étude récente apporte des éléments permettant de remettre en cause cette dernière théorie [272]. Les auteurs ont superposé un gradient de champ

magnétique alternatif et un champ statique, ce qui permet d'empêcher les NPMs de chauffer mais également de maximiser leurs mouvements. Aucune mort cellulaire, normalement enregistrée lorsque les nanoparticules chauffent, n'a été enregistrée, ce qui a permis d'exclure toute implication de stress mécanique dû aux NPMs.

Pour la suite de ce manuscrit, nous ne prendrons pas en compte la dernière hypothèse évoquée et nous considérerons que les champs magnétiques haute-fréquence provoquent une hausse de température, locale ou globale, et que les champs magnétiques basse-fréquence génèrent des forces mécaniques, comme nous allons le détailler dès à présent.

II.2.4-b. Champs magnétiques basses fréquences ($\leq 1\text{kHz}$) - Effet mécanique

Dans le cas de NPMs, soumises à champs de basse fréquence, l'énergie dissipée est négligeable (voir équation (1)). Néanmoins les champs magnétiques basse-fréquence peuvent induire le mouvement d'une NPM.

L'exposition d'une NPM à un gradient de champ magnétique entraîne son déplacement rectiligne vers la zone où le champ magnétique est maximal. L'exposition d'une même NPM à un champ magnétique uniforme et unidirectionnel entraîne sa rotation grâce à l'alignement de son moment magnétique avec le champ magnétique [273]. Dans le premier cas, la NPM subit une force translationnelle, dans le deuxième celle-ci subit un couple. (**Fig.18**). Une des conséquences du deuxième effet est qu'une NPM soumise à un champ magnétique homogène rotatif peut tourner en continu.

Il est possible de calculer les couples et forces mécaniques qui entrent en jeu pendant l'application d'un champ magnétique à l'aide des équations suivantes :

- Le **couple magnéto-mécanique** est donné par le produit vectoriel entre le moment magnétique de l'objet et le champ magnétique appliqué, tel que : $\vec{\tau} = \vec{M} \times \vec{B}$. Ce couple exerce une force magnéto-mécanique (exprimée en Newton) sur l'objet magnétique, décrit par la formule suivante : $\|\vec{F}_c\| = \frac{\|\vec{\tau}\|}{d}$ soit : $\|\vec{F}_{cmax}\| = \frac{MsVB}{d}$ (2)

- La **force translationnelle** est exprimée par le produit vectoriel entre le moment magnétique de l'objet et le gradient de champ appliqué:

$$\vec{\tau} = \vec{M} \times \vec{\nabla B} \Rightarrow \|\vec{F}_{tmax}\| = MsV\|\vec{\nabla B}\| \quad (3)$$

(B le champ magnétique, M le moment magnétique de la NPM, V le volume de l'objet, Ms l'aimantation à saturation, d le diamètre de l'objet)

Ces équations permettent de connaître la valeur d'amplitude de champ à appliquer afin de générer des forces d'une certaine intensité. Elles permettent également de comprendre qu'un champ de plus basse amplitude est nécessaire pour générer une force de même intensité *via* un champ générant un couple par rapport à un gradient de champ générant une force translationnelle. Enfin elles permettent d'évaluer la force maximale possiblement appliquée par les objets d'une étude à leur environnement en fonction des différents paramètres choisis par les auteurs.

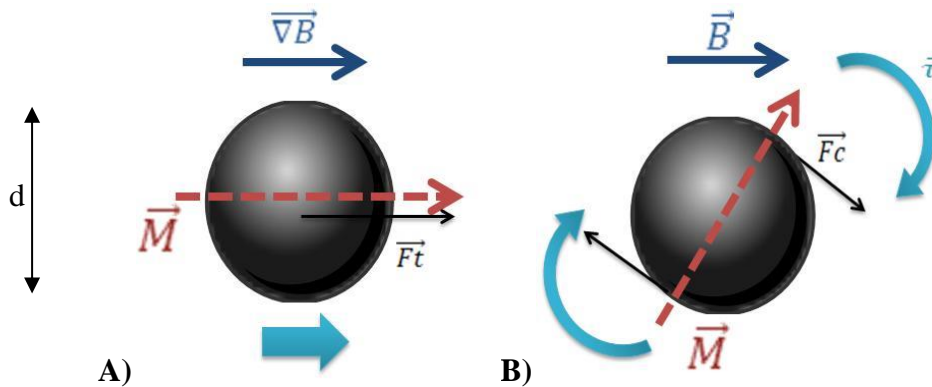


Figure 18 - Les deux types de forces s'exerçant suite à l'application d'un champ magnétique sur une NPM. (A) Mouvement de translation (flèche bleu clair) avec un champ magnétique non uniforme (B) Mouvement de rotation (flèche bleu clair) avec un champ magnétique uniforme et unidirectionnel.

L'une des propriétés des matériaux à prendre en compte pour l'application de forces mécaniques *via* l'action de nanoparticules est l'anisotropie magnétique. Cette dernière correspond aux orientations préférentielles des moments magnétiques d'un matériau qui dépendent des axes cristallographiques des matériaux ainsi que de leur forme. Une NPM possède une anisotropie globale, due à son anisotropie magnétocristalline, à sa forme, ou encore à une combinaison des deux. Cette anisotropie globale correspond à la direction préférentielle d'aimantation d'une nanoparticule, appelé axe facile d'aimantation. L'anisotropie doit être suffisamment forte pour qu'une nanoparticule soit capable de réagir mécaniquement lors de l'application d'un champ magnétique externe. Plus elle est élevée, plus la force maximale possiblement appliquée par les nanoparticules est grande.

Comme nous l'avons vu (cf. partie II.2.4-a.) la capacité des NPMs à provoquer une hausse de température en présence de champ magnétique est actuellement utilisée afin d'induire une hyperthermie magnétique des cellules cancéreuses. De la même manière des chercheurs ont testé la faculté des NPMs à exercer des forces mécaniques sur leur environnement afin de mettre au point un nouveau type de traitement contre le cancer. Dans la suite de ce manuscrit nous allons nous intéresser à leurs travaux.

II.3.-Mort cellulaire provoquée par des champs magnétiques à effet mécanique

II.3.1- Forces mécaniques dans le vivant

Les forces mécaniques influencent des fonctions cellulaires telles que l'expression des gènes, la prolifération cellulaire, la différenciation et la sécrétion de protéines matricielles, ou bien encore la production de cytokines et de facteurs de croissances [274].

Ces forces peuvent à la fois être bénéfiques et participer au bon développement des cellules ou au contraire lui nuire. *In vivo* les cellules sont soumises à des forces mécaniques extérieures (provenant de leur environnement) et intérieures (tension interne). Pour ce qui est des forces mécaniques extérieures, elles peuvent être des forces de tension, de compression ou de cisaillement. Toujours *in vivo*, les différents types cellulaires ne seront pas exposés aux mêmes types de forces. Par exemple les fibroblastes des ligaments sont sujets à des forces de tension et les chondrocytes sont sujet à des forces de compression. Selon le type cellulaire et selon la nature et l'intensité des forces exercées, les conséquences sur les cellules seront donc très différentes [274].

C'est pourquoi les forces exercées par des nanoparticules magnétiques peuvent avoir de nombreuses application et effets. Elles ont été notamment étudiées dans le cadre d'organisation des tissus par des nano-guides (rassembler, orienter ou faire migrer les cellules), pour moduler les communications cellulaires (à travers une action sur les canaux ioniques par exemple), réorganiser les protéines intracellulaires, moduler le trafic intracellulaire ou encore faire de la magnétofection (technique utilisant un champ magnétique et des NPMs liées à des acides nucléiques afin d'améliorer l'efficacité de la transfection) [275].

Dans les parties qui vont suivre, nous nous intéresserons exclusivement aux études cherchant à provoquer un effet délétère sur les cellules en leur appliquant des forces

mécaniques à l'aide de champs magnétiques à effet mécanique (CMEM) et de particules/nanoparticules magnétiques.

II.3.2- Caractéristiques clés des nanoparticules magnétiques

Les nanoparticules utilisées par les auteurs qui se sont intéressés aux **champs magnétiques à basse fréquence, appelés dans ce manuscrit "champs magnétiques à effet mécanique" (CMEM)**, et à leurs effets délétères sur les cellules, sont très hétéroclites. Aucune d'entre elles ne possèdent les mêmes caractéristiques, en terme de forme, de taille, de composition, d'enrobage. Elles n'ont pas non plus été utilisées à des concentrations comparables d'une étude à l'autre. (Ces différents paramètres sont détaillés pour chaque étude dans le **Tableau A** dans les annexes de ce manuscrit.)

Certains objets magnétiques utilisés dans les études qui seront citées ne correspondent pas à la définition donnée en partie I.1 sur les nanoparticules en termes de dimensions. Elles seront néanmoins prises en compte mais le terme « particules » sera utilisé pour les désigner au lieu de NPMs. De plus les études recourant à leur utilisation ne feront pas partie des tableaux récapitulatifs présentés.

Dans les paragraphes suivants, l'importance des différentes caractéristiques des NPMs pour de futures applications de CMEM *in vivo* sera expliquée.

- **Matériau**

Comme mentionné précédemment, le Fer, le Cobalt et le Nickel peuvent atteindre un état superparamagnétique. Pour élaborer une nanoparticule compatible avec une utilisation de CMEM, il convient de choisir le matériau composant la nanoparticule en prenant en compte sa susceptibilité au champ magnétique, son anisotropie ainsi que sa toxicité et biocompatibilité *in vivo*.

Le Fer est le matériau ayant la susceptibilité magnétique la plus élevée, il nécessite donc des champs magnétiques d'amplitude plus élevée afin d'induire un changement de direction des moments magnétiques. Les matériaux à base de fer (Fe, FeCo et FeNi) sont des matériaux dont l'anisotropie magnétocristalline est relativement faible.

Pourtant, la majorité des publications utilisant les CMEM utilisent des NPMs comportant du Fer (*cf Tableau A - Annexes*). Ceci s'explique par le fait que le Fer présente des avantages pour les applications biologiques. En effet, il a été démontré que le Nickel et le Cobalt sont plus toxiques pour les cellules que le Fer [276], quant à lui métabolisable par l'organisme, peu toxique et biocompatible.

Les auteurs privilégient particulièrement les oxydes de fer, plus stables que le Fer seul, comme la magnétite (Fe_3O_4) et la maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). FeO n'est pas un oxyde de fer intéressant, n'étant pas sensible au champ magnétique. Des alliages FeCo et FeNi sont également utilisés.

- **Dimension**

Nous avons mentionné précédemment (*cf. partie II.1.3.d*) l'importance de la taille des particules dans le cadre d'une utilisation thérapeutique. Entre autre, les nanoparticules doivent être suffisamment petites afin d'être utilisées *in vivo* et assez grandes pour tout de même obtenir un effet mécanique sur les cellules. En effet, le couple maximal appliqué par une NPM est proportionnel à son volume (*cf. partie II.2.4-b*) donc augmenter la taille d'une NPM permet d'augmenter les forces exercées. Wong et al. (2018) et Vegerhof et al. ont montré que l'augmentation du diamètre des particules qu'ils ont utilisées augmentait l'effet délétère observé sur les cellules cancéreuses [248], [277].

De plus, la taille de NPMs destinées à être injectées par voie intraveineuse doit être suffisamment petite pour traverser les pores des vaisseaux sanguins et pénétrer dans les tissus [278], [279]. Dans les publications étudiant les CMEM, une majorité des NPMs se situent au-dessus des tailles idéales pour leur devenir *in vivo* et leur internalisation intracellulaire (taille hydrodynamique $>60\text{-}100\text{nm}$ -*cf. partie II.1.3.d*) pour au moins une de leur dimension. (*cf. Tableau A - Annexes ou tableau 3*). Dans ces cas une injection par voie intraveineuse ne serait pas judicieuse et seule l'injection intratumorale pourrait être envisagée pour qu'un nombre suffisant de nanoparticules atteignent leur destination. Pour pouvoir envisager des applications en thérapie, les tailles des NPMs de ces travaux devraient être réduites, tout en analysant si cette diminution de taille leur fait conserver un effet délétère suffisant sur les cellules

- **Forme**

La forme des nanoparticules est également un paramètre à prendre en compte pour appliquer des forces mécaniques.

La sphère est la forme la plus utilisées par les différents auteurs (11 publications) puis viennent les nanoparticules en forme de disques (6 publications) et celles de forme allongées décrites comme des fils, des bâtonnets, des aiguilles (5 publications) (*cf. Tableau A - Annexes*). La forme la moins utilisée est le cube (2 publications). Pourtant, la forme sphérique, la plus utilisée, est celle présentant le moins d'anisotropie de forme. Il semblerait nécessaire de choisir des paramètres entraînant la plus grande anisotropie pour maximiser l'effet mécanique et l'effet biologique induits, et donc de privilégier les formes comme les bâtonnets.

Néanmoins, les différentes publications étudiant les CMEM et utilisant des nanoparticules à base de fer et sphérique [238], [248], [280]–[287] obtiennent des effets délétères sur les cellules (*cf. Tableau D- Annexes*).

- **Enrobage**

Comme vu précédemment (*cf. partie II.1.3.c*), l'enrobage des nanoparticules joue un rôle dans leur toxicité, leur biodistribution, leur demi-vie *in vivo*, leur internalisation cellulaire, leur temps de dégradation.

Dans l'étude de Seongbom Jeon et al., les NPM non enrobées couplées au CMEM ont un effet délétère plus élevé comparé aux nanoparticules enrobées d'alginate ou de PLGA (poly(lactic-co-glycolic acid)) [238]. De la même manière, Martinez-Banderas et al. ont montré que des nanoparticules enrobées d'APTES ((3-aminopropyl)triethoxysilane) étaient moins efficaces que des nanoparticules enrobées de BSA (bovine serum albumin) pour diminuer la survie cellulaire en présence de CMEM[288] (*cf. Tableau D-Annexes*). La nature de l'enrobage des NPMs a donc une importance lorsqu'elles sont utilisées avec des CMEM et sa modulation peut permettre des effets délétères plus élevés.

De la même manière, la différence entre NPM vectorisées et non vectorisées se retrouve dans l'efficacité du traitement par CMEM. En effet la vectorisation des nanoparticules augmente fortement leur internalisation et leur accumulation intracellulaire. Belyanina et al. [285] ont montré qu'après application d'un CMEM, ils diminuaient le volume tumoral en utilisant des NPM vectorisées avec un aptamère ciblant la fibronectine des cellules de carcinome Ehrlich (AS-14). Les NPM non vectorisées ne diminuent pas le volume de la tumeur. (*cf. Tableau 3*)

- **Concentration**

De trop hautes doses de nanoparticules peuvent se révéler toxiques. C'est pourquoi la plupart des auteurs de publications ont choisi des doses non cytotoxiques ou à défaut ont présenté la valeur de toxicité de leurs nanoparticules seules (*cf. Tableau D-Annexes*). Enfin, il est généralement montré dans les publications associant nanoparticules et CMEM que l'augmentation de la concentration augmente l'effet délétère [248], [286], [288]–[291]. Néanmoins quelques une montrent que celle-ci n'a pas d'influence notable [238], [292].

Wen et al font le lien entre la stagnation de la quantité de NPMs internalisées malgré l'augmentation de la concentration en NPMs mise en présence des cellules, et la stagnation de l'effet de mort cellulaire induit, qui plafonne aux alentours de 25% pour les cellules BEL-7402 [293]. Ce sont donc bien les NPMs internalisées qui induisent la mort suite à l'exposition à un

CMEM et l'effet observé est dépendant de la quantité de NPMs présentes dans les lysosomes. Ainsi au-delà d'une certaine concentration extracellulaire, l'effet délétère du traitement ne peut pas être augmenté car les cellules sont saturées en NPMs.

Au vu des conséquences des caractéristiques des NPMs sur leur devenir in vivo (cf. partie II.1.3) et des conséquences de ces mêmes caractéristiques pour l'utilisation de CMEM (cf. partie II.3.2), il semble possible d'optimiser les NPM pour une future utilisation thérapeutique in vivo des CMEM.

La NPM à priori la plus optimale pour appliquer des forces mécaniques dans le cadre d'une thérapie serait à base de fer, en forme de bâtonnet/fil/aiguille, de dimensions hydrodynamique comprises entre 10 et 60nm (et permettant néanmoins l'application d'une force suffisante pour induire un effet biologique), avec un enrobage biocompatible et de charge neutre, et vectorisée. Néanmoins, les différentes caractéristiques d'une nanoparticule interagissant entre elles et avec un milieu biologique extrêmement complexe, et les cibles biologiques à traiter (tumeurs) étant toutes très différentes les unes des autres, il semble difficile de pouvoir faire une telle généralisation. A l'heure actuelle, la seule possibilité d'optimisation est de tester de manière empirique les différentes combinaisons pour chaque application.

II.3.3- Influence des paramètres des CMEM sur la mort cellulaire

La plupart des études ont été menées *in vitro* sur des cultures de cellules cancéreuses. (Les différentes lignées cellulaires utilisées sont précisées pour chaque publication dans le Tableau B dans les annexes de ce manuscrit.)

Les champs magnétiques à effet mécanique (CMEM) utilisés par les auteurs sont très divers. Un tiers des publications étudie les champs rotatifs, environ la moitié les champs alternatifs et les publications restantes étudient les champs statiques. Les amplitudes testées vont de 0,5 mT à 1 T, les fréquences de 1 à 1000 Hz. Les temps d'application sont aussi très variables, allant de quelques minutes à plusieurs heures en continu. Parfois les champs sont appliqués, arrêtés, puis redémarrés sur des intervalles de quelques minutes et parfois les expositions sont répétées sur plusieurs jours (les différents paramètres d'application de CMEM utilisés par les auteurs sont exposés en détails dans le Tableau C dans les annexes de ce manuscrit).

Pour quantifier l'effet délétère des forces mécaniques sur les cellules, la plupart des auteurs ont réalisé des tests de viabilité (MTT, Résazurine, CCK8, Bleu de trypan, Sulforhodamine B). Lorsque cela n'a pas été le cas [280], [294], [295], dans le Tableau D en

annexe de ce manuscrit , un test quantifiant la mort et donnant des informations sur son mécanisme (Annexin/IP,LDH,TUNEL) a été ajouté. Par soucis de comparaison des effets entre les différents travaux, les effets délétères ont été exprimés en pourcentage de diminution de viabilité ou d'augmentation de mort cellulaires dans les tableaux récapitulatifs.

Cette grande variété de paramètres, associée à la variété de nanoparticules utilisées et de types cellulaires ciblés rendent les comparaisons inter-publications très difficiles. Les seules véritables comparaisons qui pourront être faites seront intra-études, lorsque les auteurs ont fait varier les paramètres de leurs expériences. Ainsi les comparaisons inter-publications et les inférences qui en découleront dans cette partie seront à regarder d'un œil critique.

Les principaux paramètres des travaux utilisant des NPM et des CMEM, ainsi que leurs effets sont résumés dans le **tableau 2 ci-dessous**.

Références	Type de champ	Amplitude (mT)	Fréquence (Hz)	Dimensions des NPMs	Forme des NPMs	Quantification de la mort cellulaire in vitro	Mécanisme de mort	Localisation des NPMs
Kim. et al.[294]	Alternatif Uniforme	3,6,9,13	10,20,40,50, 60	ø : 1µm h : 70nm	Disque	9mT 10Hz : 80% ; 20Hz :80% ; 40Hz :65% ; 50Hz : 15% ; 60Hz :0%	Apoptose/perméabilisation de la membrane	Membrane
Dun Liu et al.[296].	Rotatif	20,40,75	~17Hz	ø moyen: 100nm/ L :> 100nm	Tube	20mT :+7% ; 40mT : +16% ; 75mT :+29%	Création de pores dans la membrane plasmique entraînant la mort	-
Cho et al.[281]	Statique Gradient (léger)	~200 (centre)-250(bord)	0	ø15nm	Sphère	47%	Apoptose suite à l'activation d'un récepteur	Membrane (70% des nanoparticules)
Wang et al.[297]	Statique et Alternatif Gradient	200	0,2,5,10Hz	L=580nm l=80nm	Aiguille	SMF : 5% ; 2Hz-10Hz : entre 25 et 35%	-	Membrane
Contreras et al. (2014)[298]	Alternatif	12;20	20	L=3.5 µm l=36nm	Fil	12mT :4.5%, 20mT :2.5%	-	-
Wen[293]	Alternatif	0,7	100	ø20nm	Sphère irrégulière	BEL-7402 : 11,14 HL7702 :3,52	Apoptose	Internalisation
Zhang et al.[280]	/ (alternatif ? rotatif? gradient)	30	20	ø100nm	Sphère	Annexin : 8,5% 7AAD : 0.9% Diminution du nombre de cellules de 11*10 ⁵	LMP	Lysosome
Contreras et al. (2015)[289]	Alternatif	0,5	1 ou 1000	ø35nm L=4µm	Fil	<i>NB :effet similaire à 10 et 30 mins</i> 1Hz : 2,4µg/mL : 16.5%, 12µg/mL : 21% 1000Hz : 2,4µg/mL : 16.5% 12µg/mL : 27%	Perméabilisation de la membrane	Endosome précoce, et en membrane
Leulmi S. et al. [299]	Alternatif	30	20	l=60nm ø1,3-2µm	Disque	Environ 83%	Apoptose	Membrane
Vegerhof A. et al. [248]	Alternatif Gradient	0,62	4	ø50,100, 200	Sphère	(øNPM non précisé) 2mg/mL : 30% 5mg/mL :32% 7mg/mL :41% 10mg/mL : 51%	-	-
Ju et al. [295]	Alternatif	0,7	100	ø40m	Sphère	Bel-7402 : 11,3% HepG2 : 17,7% HL-7702 : 2,3%,	Apoptose	Membrane:
Cheng Y. et al.[300]	Rotatif	1000	20	ø2µm l=70nm	Disque	1h :25% 24h :45%	Perméabilisation de la membrane plasmique/ apoptose	Internalisées
Master. et al. [282]	Alternatif	62.8 ou 125.6	50	ø7-8nm	Sphère	MDA-MB-M1 : effet max 50% BT474 : effet max 75% MCF10A : effet max 20%	Pas de LMP, Stress mécanique sur le cytosquelette	Lysosomes
Martinez-Banderas . et al. [288]	Alternatif	1	10	L=7µm ø30-40nm	Fil	8,7 et 26 µFe/mL APTES-NPM : 14 et 23% APTES-NPM-DOX :10 et 10% BSA-NPM : 21 et 28% BSA-NPM-DOX : 15 et 10%	-	Internalisation
Zamay et al.[292]	Alternatif	10	100	e=50nm ø500nm	Disque	Ascites : 90,95% de mort pour chaque concentration de chaque AS9NPM et AS14NPM Hépathocytes : 25%	Apoptose/inhibition de canaux ioniques	Membrane
Li W. et al. [283]	Alternatif	0.1, 5, 10, 15, 20	2, 5, 10, 15, 20	cœur :7nm; 30nm (hydrodynamique)	Sphère	(2Hz, 20mT) = 25% (effet maximal observé)	-	Stroma/MEC autour de la tumeur
Muroski and al.[291]	Rotatif	1000	20	e=60nm ø2µm	Disque	10 NPM/Neural stem cell :8% 20NPM/Neural stem cell : 5% 50NPM/Neural stem cell :35%	Perméabilisation de la membrane plasmique	Internalisation

Références	Type de champ	Amplitude (mT)	Fréquence (Hz)	Dimensions des NPMs	Forme des NPMs	Quantification de la mort cellulaire in vitro	Mécanisme de mort	Localisation des NPMs
Brossel et al.[284]	Statique Gradient	660	0	ø100nm	Sphère		-	-
Shen Y. et al. [301]	Rotatif	40	15	62nm	Cube	JOUR 1 :55% JOUR 2 : 33% JOUR 3 :32%	LMP/Destruction cellulaire/apoptose	Lysosomes
Mazuel F. et al. [302]	Statique et Rotatif	130 180	0 1	L=1,1µm l=110nm	Bâtonnet	0%	Absorption du stress mécanique	Membrane
Belyanina et al. [285]	Alternatif	10	50	ø50nm total	Sphère	-	Apoptose et nécrose	Membrane
Mansell et al.[303]	Rotatif	1000	20	ø2µm l=70nm	Disque	11%	-	Internalisation
Du S. et al. [286]	Rotatif	10	5	cœur : ø12-21nm, moyenne :18nm	Sphère (ou légèrement elliptique)	U2OS : 50µg/mL : 0%; 100µg/mL : 10% ; 200µg/mL :25% SAOS2: 50µg/mL : 0%; 100µg/mL : 15% ; 200µg/mL :25%	Autophagie et apoptose	Lysosomes
Seongbeom Jeon et al.[238]	Statique	100	-	ø10,91,127nm	Sphère	NPM 16 µg/mL : 30% (effet maximal) PLGA NPM: 256µg/mL :8% (effet maximal) Alginate NPM: 256 µg/mL :10% (effet maximal)	-	Internalisation Membrane
Spyridopoulou K. et al. [287]	Statique ou Alternatif ou Rotatif Gradient	40,50,60, 100,150,200	0 ou 2 ou 4,8Hz	100nm (cœur 85nm)	Sphère	STATIQUE 200mT :18% (effet maximal) ALTERNATIF : (8Hz;100mT)=-32% (effet maximal) ROTATIF : 200mT : 30% (effet maximal)	-	Lysosome
Chiriach et al.[290]	Statique gradient ou Rotatif	1	0,20,70,100	Lmajoritaire : 10-55nm (s'étale entre 10 et 200)	Rectangulaire	STATIQUE (HOS) : 5-10% de de moins comparativement au rotatif ROTATIF (HOS) : [20Hz, 10 minutes]: 5mg/mL : 88% (effet maximal) ROTATIF (NHDS) [20Hz,10mins,2mg/mL] : 0%	Apoptose	Membrane et Lysosomes

Tableau 2 - Récapitulatif synthétique des paramètres de champs magnétiques ainsi que des effets biologiques des études utilisant des NPMs et des CMEM. Si la configuration de champ magnétique n'est pas précisée, c'est que les publications ne la mentionnaient pas et n'avaient pas suffisamment décrit leur générateur de champs pour en permettre la déduction (symbole : /). Les dimensions données en absence de précision correspondent au diamètre du cœur et non pas au diamètre hydrodynamique, qui est plus élevé et non mesuré dans une partie des publications. Pour plus de simplicité les valeurs du tableau correspondent à la diminution de la survie cellulaire/taux de mortalité cellulaire. L'absence d'étude du mécanisme de mort cellulaire est traduit par "-".

Dans cette sous-partie, les publications ont été étudiées en fonction du type de CMEM utilisé.

- **CMEM statiques**

Trois publications ont fait varier les paramètres d'application de CMEM statiques pour en étudier les effets.

Pour ce qui est des CMEM statiques, l'influence de l'**amplitude** du champ magnétique sur la survie cellulaire a été étudiée par Spyridopoulou et al.[287] à l'aide de NPMs de 100 nm de diamètre. Ils ont testé différentes amplitudes (40, 50, 60, 100, 150, 200 mT) et ont montré que l'augmentation de l'amplitude permettait d'augmenter la mort cellulaire. Néanmoins à partir de 100mT la mort cellulaire atteint une valeur seuil de 18% environ. De la même manière, en utilisant des particules de 350 nm, Wong et al. ont montré que l'augmentation du **gradient d'amplitude** d'un champ statique intermittent (de 5 à 23.3 T/m) entraînait une plus forte diminution de la survie cellulaire (de 0 à 30%). L'utilisation de particules de diamètres inférieurs (150 et 250 nm) a provoqué des diminutions de survie maximales plus faibles (5 et 15%). Un champ statique intermittent uniforme quant à lui, avec une augmentation de l'amplitude de 5 à 25 mT, engendre une diminution de la survie cellulaire de 2 à 10%. [277]

Chiriac et al. [290] ont démontré que l'augmentation du **temps d'application** du traitement (5, 10,15 minutes) permet de diminuer la survie cellulaire (-5,-10,-12%) pour un CMEM statique d'amplitude 1mT avec des NPM de 10-55nm.

Il semble donc que l'augmentation de l'amplitude (de 40 à 100mT) ou du gradient d'amplitude (de 5à 23T/m) des CMEM statique augmente les effets délétères sur les cellules pour des nanoparticules et particules de 100nm et plus. Il semble également que sur des temps d'applications de quelques minutes de CMEM, l'effet délétère peut être augmenté en rallongeant le temps d'application de quelques minutes supplémentaires.

- **CMEM alternatifs**

Comparativement aux CMEM statiques, un plus grand nombre d'auteurs se sont penchés sur les variations des paramètres d'application des CMEM alternatifs et leurs effets.

Cinq publication ont fait varier **les amplitudes** de champ magnétiques et étudié leur impact [282], [283], [287], [294], [298]. Li et al ont montré que l'augmentation de cette amplitude augmentait l'effet délétère : pour une fréquence de 20Hz et avec des nanoparticules de 30nm, ils ont mesuré une augmentation de la mort cellulaire de 10% pour 5mT, 20% pour 10mT et jusqu'à **25%** pour 20mT, ce qui est l'effet maximal observé sur la gamme d'amplitude testée de 4-20mT [283].

Kim et al. ont utilisé des nanodisques (ϕ : 1 μ m / h : 70nm) et étudié la mort cellulaire pour des amplitudes de 3, 6, 9 et 13mT (20Hz) montrant que la plus forte mort cellulaire observée est de 60% à 9mT (3mT : 25%, 6mT : 30%, 13mT : 37%) [294].

Au contraire, Master et al., Spyridopoulou et al. et Contreras et al. (2014) ont conclu que la variation de l'amplitude n'avait pas d'impact sur la survie cellulaire, car les passages de 62 à 125mT ou de 70 à 100mT ou encore de 12 à 20mT n'ont pas entraîné davantage d'effet délétère en utilisant des nanoparticules de 8nm ou 100nm ou 36nm. Respectivement, ces trois auteurs ont engendré des diminutions de survie cellulaire maximales autour de 50%, 30% et 5% [282], [287], [298].

A la lumière de ces différents travaux, il semble qu'il existe une amplitude optimale permettant de maximiser les effets délétères. C'est ce que montrent les travaux de Kim et al., bien que la gamme d'amplitudes testée soit assez restreinte (3-13mT)[294]. Ces auteurs ont utilisé de très grandes nanoparticules, puisque l'une de leurs dimensions est de l'ordre du micromètre. C'est également le cas de Contreras et al. qui, eux, n'ont pas enregistré de diminution de la viabilité cellulaire entre 12 et 20mT. **Ainsi pour des nanoparticules de cet ordre de grandeur, c'est à dire avec une dimension dépassant le micromètre, l'amplitude optimale se situe probablement aux alentours de 9mT.**

On peut supposer que pour de plus petites NPM, comme c'est le cas des autres publications ayant étudié la variation de l'amplitude, l'amplitude optimale sera différente.

Master et al., Spyridopoulou et al. et Li et al. utilisent des NPM dont les tailles sont du même ordre de grandeur. Les publications de Master et al. et Spyridopoulou et al. sont cohérentes entre elles car pour des amplitudes testées équivalentes, elles n'enregistrent pas de variation de l'effet délétère observé[282], [287]. Etant donné que Li et al. constatent une diminution de la viabilité cellulaire entre 4 et 20mT, et que Master et al. et Spyridopoulou et al. constatent une stagnation de l'effet délétère en comparant deux amplitudes autour de 60 et 125mT, **on peut supposer que l'amplitude optimale pour des NPM de cet ordre de grandeur se situe entre 20 et 60mT.**

Kim et al. , Wang et al., Contreras (2015), Li et al. , Spyridopoulou et al. ont quant à eux étudié **l'influence des variations de fréquence**. La majorité des études montrent une augmentation de l'effet délétère sur les cellules avec l'augmentation de la fréquence.

Wang et al ont testé les fréquences 2,5,10 Hz (200mT) couplées à des nanoparticules (L=580nm l=80nm) et constatent que l'augmentation de la fréquence tend à faire augmenter légèrement l'effet délétère (de 25 et 35%) [297]. Contreras 2015 ont testé deux fréquences très éloignées, à savoir 1 et 1000 Hz, pour deux concentrations de nanoparticules (ϕ 35nm L=4 μ m)

[289]. A 2.4ug/mL la fréquence n'a pas d'incidence sur le mort cellulaire, à 12ug/mL la mort cellulaire est légèrement plus élevée à 1000Hz (27 contre 21%). Li W. et al ont constaté une légère diminution de la survie cellulaire avec une augmentation de la fréquence de 2 à 20Hz en utilisant des nanoparticules de 30nm (de 5 à 10% de diminution supplémentaire entre 2 et 20Hz pour différentes amplitudes) [283]. L'effet maximal observé était de 25% de diminution de la survie cellulaire par rapport aux contrôles.

De la même manière Subramanian et al. [304] qui ont testé un champ magnétique alternatif à gradient sur des particules (100-250nm) internalisées dans des cellules de carcinome hépatique, ont montré une diminution de la viabilité cellulaire entre 2,3 et 4Hz (5, 10 et 25%). De façon surprenante, Subramanian et al. montrent que la survie cellulaire des neuroblastomes ne diminue pas avec l'augmentation de la fréquence mais reste stable entre 1 et 3Hz (diminution de la survie de 5% pour toutes les fréquences), contrairement à ce qu'ils ont observé sur les cellules de carcinomes hépatiques.

Pour des gammes de fréquences similaires (0.17-3.33Hz) Wong et al (2018) obtiennent la même tendance en utilisant des particules (150-350nm). La diminution de survie cellulaire pour la plus basse fréquence est de 20% et de 50% pour la plus haute. Au-delà de 1 Hz la tendance à la diminution de la viabilité est moins de moins en moins forte et atteint une valeur seuil vers 3Hz [277].

Kim et al. ont montré que l'augmentation de la fréquence, entre 20 et 60Hz entraine une diminution de l'effet délétère du traitement (test LDH : de 90% de fuite à 0% de fuite) en utilisant des nanodisques (\varnothing : 1 μ m / h : 70nm) [294].

Ces différentes études laissent à penser qu'il peut exister une **fréquence optimale pour les CMEM alternatifs et qu'elle se situerait entre 20 et 40Hz**. En effet les effets délétères dans les travaux Kim et al. sont similaires à 10 et 20Hz puis décroissent à partir de 40Hz tandis que les autres publications (Wang et al., Li et al., Wong et al., Subramanian et al.) montrent une augmentation de effets sur des fréquences comprises entre 0.17 et 20Hz [277], [283], [297], [304]. L'augmentation de l'effet dans la publication de Contreras et al.(2015) n'est pas prise en compte dans cette hypothèse, car seules les fréquences 1 et 1000Hz ont été testées, ce qui laisse une large plage de fréquences non répertoriées au sein de laquelle pourrait se trouver un optimum entraînant des effets supérieurs à ceux observés [289].

Néanmoins, il se peut également que la fréquence optimale soit dépendante du type cellulaire, comme le montre la publication de Subramanian et al. en comparant deux types cellulaires [304].

Une autre condition étudiée est le **temps d'application** du traitement. En Contreras et al. n'ont pas enregistré de différence significative entre 10 et 30 minutes d'application[298].

Enfin, Master et al. ont cherché à comparer des **champs sans interruption par rapport à des champs intermittents**, montrant que ces derniers étaient plus efficaces pour les concentrations 0.05 et 0.1mg/mL pour deux lignées cellulaires cancéreuses. Avec la concentration de 0.25mg/mL l'effet des champs ininterrompus étaient du même niveau que celui champs intermittents [282].

Il semblerait donc que pour les temps courts de quelques dizaines de minutes l'augmentation de temps n'application d'un CMEM alternatif n'influe pas sur la viabilité cellulaire. Par contre, l'interruption et la reprise d'un CMEM alternatif semble pouvoir augmenter son pouvoir délétère sur les cellules.

- **CMEM rotatifs**

Seul un petit nombre de publications ont décrit les effets des variations des paramètres d'un CMEM rotatif.

Dun Liu et al, Spyridopoulou et al. ont montré que l'effet délétère sur la survie cellulaire augmentait avec l'**amplitude** en utilisant des nanoparticules de 100nm [287], [296]. En effet Dun Liu et al. rapportent une diminution de la viabilité de 7,16 et 29% pour 20,70 et 75mT à 17Hz tandis que Spyridopoulou et al montre une diminution progressive de 0 à 15% pour les amplitudes en dessous de 150mT et une diminution de 30% pour 200mT à 2Hz.

L'étude de l'effet **des fréquences** par Chiriach et al, en utilisant des NPMs de 10-60nm, a montré que l'effet délétère était optimal à 50Hz, pour des fréquences testées entre 20 et 100Hz (20Hz:22%; 50Hz: 32%; 70Hz:22%; 100Hz: 20%). Nair et al. ont utilisé des particules de 200nm et enregistré une plus forte augmentation de fuite de lactate deshydrogénase (LDH) à 1Hz (x8 par rapport au contrôle) comparativement aux fréquences 3 (x5.5) et 5Hz (x4.5) pour un CMEM de 12mT [305].

L'étude de Chiriach et al. a également permis de montrer qu'augmenter le **temps d'application** du champ de 5 à 20 minutes permettait de diminuer davantage la viabilité de 30% pour des CMEM rotatif de 1mT et 20Hz [290] (5mins:15% ; 10mins:22% ; 15mins:30%; 20mins:46%). Leurs essais ont été réalisés avec des nanoparticules de tailles comprises entre 10 et 55nm.

Le peu de travaux s'étant penchés sur les effets des paramètres des champs magnétiques ne procurent que très peu données pour avancer des hypothèses généralisables aux CMEM

rotatifs. Au vu des résultats, il est possible de supposer que l'augmentation de l'amplitude permet d'augmenter l'effet délétère et que pour des nanoparticules de taille environnant les 100 nm, si une amplitude optimale existe et peut être atteinte, elle se situe au-delà de 200mT. Pour ce qui est de la fréquence, les deux études présentées ne permettent pas d'aiguiller vers une hypothèse plutôt qu'une autre. En ce qui concerne les temps d'applications courts, l'augmentation de temps d'application du CMEM rotatif permet d'augmenter les effets délétères.

- **Comparaisons intra-études**

Plusieurs publications ont cherché à déterminer les efficacités relatives des types de CMEM sur la survie cellulaire.

La **comparaison entre champ statique et champ alternatif** a été faite par Wang et al, montrant un effet bien supérieur du traitement avec l'utilisation des champs alternatifs (+25% de taux de mortalité cellulaire) [297]. De plus la comparaison d'un **champ alternatif non uniforme et d'un champ statique intermittent non uniforme** utilisés aux mêmes fréquence et combinés avec des particules, a de la même manière permis de montrer la plus grande efficacité des champs alternatifs (20 % de diminution de viabilité supplémentaire) [277]. Wong et al ont également **comparé un champ statique intermittent uniforme et un champ statique intermittent non uniforme**, mettant en évidence les effets plus délétères du CMEM non uniforme (environ 20 % de diminution supplémentaire de la viabilité cellulaire)[277]

En comparant **champ statique et champ rotatif**, Chiriac et al [290] ont mis en évidence que le champ rotatif était légèrement plus efficace pour réduire la survie cellulaire (+5 à +10% de diminution de la survie cellulaire pour les conditions étudiées). D'autres auteurs ont **comparé les champs rotatifs aux champs statiques et alternatifs**, montrant que le rotatif était plus efficace [287].

Wong et al., utilisant des particules, ont testé un **champ alternatif biaxial dans deux directions orthogonales et un champ alternatif uniaxial**. Leur étude montre que le champ biaxial engendre un effet délétère plus important sur la viabilité des cellules HeLa (diminution de 30% de la survie cellulaire contre 15% à 1Hz) [306]. Cette même étude a aussi mis en évidence la plus grande efficacité d'un **champ statique intermittent comparé à un champ alternatif** (diminution de 20% de survie cellulaire contre 10% à 1Hz).

Certains auteurs utilisant des CMEM alternatifs ont comparé l'efficacité du traitement sur **plusieurs types cellulaires**. Master et al. ont montré que des lignées cellulaires de cancer du sein étaient sensibles au traitement, provoquant la diminution de la survie cellulaire, tandis qu'une lignée de cellules saine ne voyait pas sa viabilité diminuer de façon significative suite

au traitement [282]. Cette moindre sensibilité des cellules saines par rapport à une lignée cancéreuse a également été mise en évidence par Wen et al. [293] et les mêmes lignées ont montré des réponses similaires pour Ju et al [295]. La comparaison de deux lignées cellulaires d'ostéosarcome par Du S. et al n'a montré aucune différence en terme d'efficacité de traitement entre les deux lignées [286].

Il semble que de prime abord que les champs rotatifs soient plus efficaces que les champs alternatifs et statiques selon les comparaisons intra-publications de ces différents types de champs. Les champs statiques semblent les moins efficaces des trois types de champs magnétiques. Néanmoins le rajout d'un mode intermittent augmente les effets délétères de ces champs.

A partir des résultats des différentes études, il est possible d'supposer un classement comparatif de la capacité des CMEM à induire des effets délétères sur les cellules cancéreuses. Ce classement ressemblerait globalement à celui qui suit :

Statique uniforme < Statique non uniforme < Alternatif uniaxial uniforme < Statique non uniforme intermittent < Alternatif non uniforme < Alternatif biaxial (directions orthogonales) < Rotatif

Pour finir, les cellules saines semblent moins sensibles aux forces mécaniques appliquées par des champs alternatifs que les cellules cancéreuses, ce qui démontre un intérêt supplémentaire pour l'application des CMEM dans le cadre de thérapies anticancéreuses.

Au vu des différents travaux présentés, il semble possible de dégager des tendances afin d'émettre des hypothèses pour identifier une combinaison des différents paramètres de CMEM (type de champ, amplitude, fréquence, temps d'application,) qui permettrait de maximiser l'effet délétère sur les cellules.

Tout d'abord le type CMEM le plus efficace semble être le CMEM rotatif. Le peu de données sur ces champs permet seulement de supposer une possible fréquence optimale au-delà de 200mT pour des NPM d'environ 100nm, ainsi qu'une fréquence optimale. Néanmoins ces hypothèses ne se basent que sur un nombre très restreints de travaux. Il se pourrait également que, comme nous l'avons dit concernant les champs alternatifs, la fréquence optimale soit dépendante du type cellulaire. Les données sur les CMEM alternatifs ont permis de dégager une gamme d'amplitude restreinte où pourrait se situer une amplitude optimale (20-60mT) pour des NPM dont les dimensions sont inférieures à 100nm, ainsi qu'une fréquence optimale qui se situerait entre 20 et 40Hz, mais qui pourrait varier en fonction du type cellulaire.

Pour ce qui est du temps d'application des CMEM, peu de publications ont étudié sa variation. On peut néanmoins supposer que l'optimisation de celui-ci sera en fonction de la force exercée par les NPMs, mais aussi en fonction de la rapidité de réponse au stress mécanique des cellules ou encore en fonction de la nature des perturbations délétères provoquées dans les cellules.

II.3.4- Mécanismes de mort et perturbations cellulaires engendrés

Dans plusieurs de leurs publications, Y. I. Golovin et al. [307], [308] ont présenté des tableaux qui font correspondre différentes gammes de valeur de force avec différents processus mécano-chimique. Ces valeurs ont été rapportées dans le tableau ci-dessous.

Processus	Force (pN)
Activation de canaux ioniques	0.2pN
Interaction Protéine-Protéine	1 -10
Activation de récepteur membranaire	10 - 50
Rupture de l'attraction entre une membrane lipidique et une protéine membranaire	30 - 50
Interaction anticorps-antigène	10 - 100
Déplieement de protéine	20 - 100
Interaction Ligand-Récepteur	50-350
Interaction Lipide-Protéine	50 - 100
Rupture d'une membrane lipidique bicouche	60 - 150
Rupture d'une liaison covalente	1000 - 5000

Tableau 3 - Estimation de forces nécessaires pour induire des réactions biologiques[312],[313].

Ceci montre la diversité de champ d'action des NPMs qui peuvent potentiellement induire des dommages mécaniquement où activer des voies de signalisations néfastes pour la survie des cellules. En effet, les CMEM peuvent engendrer de nombreux types de morts cellulaires suite aux effets délétères des forces mécaniques sur les cellules, comme le montrent les études qui se sont penchées sur le sujet et que nous allons détailler plus loin.

La localisation des NPMs dans les cellules joue un rôle déterminant sur la nature des dommages et des processus biologiques engendrés, car ceux-ci dépendent des éléments sur lesquels s'appliquent les forces mécaniques. Globalement les nanoparticules sont localisées soit en membranes cytoplasmique et lysosomale, soit internalisées dans les endosomes et lysosomes.

Déterminer la localisation des nanoparticules dans la cellule est une nécessité, car cela permet de s'assurer que les nanoparticules sont situées à l'endroit attendu, d'évaluer l'efficacité de leur liaison/internalisation et de proférer des hypothèses quant à leur mode d'action.

Quelques d'études ne prouvent pas la localisation de leurs nanoparticules mais présupposent de leur localisation [277], [294], [292], [285] . Dans ce cas, nous respecterons l'avis des auteurs même s'il ne semble pas cohérent avec les conditions expérimentales [277], [292], [285]. Nous ferons de même pour les travaux qui concluent sur la localisation des NPMs sur la base d'images qui ne permettent pas de véritablement trancher [294], [302].

Les localisations subcellulaires et tests utilisés par les auteurs pour les mettre en évidence sont détaillés pour chaque publication dans le Tableau B dans les annexes de ce manuscrit.

Dans la suite de ce manuscrit, les effets des forces mécaniques appliquées par les NPMs seront étudiés en fonction de la localisation de ces dernières, liées en membrane (plasmique ou lysosomale) ou bien libres dans les lysosomes.

II.4.3-a. NPMs à la membrane cytoplasmique

- **Actions membranaires initiatrices de la mort cellulaire**

Les NPMs liées à des membranes cellulaires, si elles appliquent des forces suffisamment élevées, peuvent provoquer la formation réversible de pores, voire une rupture de la membrane.

Quelques auteurs ont mis en évidence des dommages engendrés à la membrane cytoplasmique par la fuite de la lactate déshydrogénase (LDH) [294], [296] , [277] , [289], [305], [100] ou bien par un marquage du noyau avec des intercalant de l'ADN[69], [76], [95].

Un cas particulier est celui de Zhang et al. Dans une stratégie ciblant spécifiquement les lysosomes à l'aide de NPMs liées à l'anticorps LAMP1, ces auteurs ont démontré une perméabilisation des compartiments lysosomaux par la diminution d'intensité des marqueurs LysoTracker [280].

Pour appuyer leurs résultats, certains auteurs ont cherché à calculer l'intensité des forces exercées par les NPMs.

Les calculs de Dun Liu et al. ont montré que leurs NPMs ne pouvaient à priori pas rompre la membrane plasmique. Ils ont néanmoins montré que l'intensité de la force était du même ordre de grandeur que des forces nécessaires pour faire passer des nanoparticules au travers d'une membrane dans un but d'électroporation (calculé dans une autre publication) à savoir aux environ de $5.04 \times 10^{-16} \text{N}$ (in vitro) et $9.69 \times 10^{-20} \text{N}$ (in vivo) [296], [309]. Par ailleurs ils montrent expérimentalement une augmentation de la rugosité de la membrane par

Microscopie à Force Atomique après l'application d'un champ magnétique et la création de pores membranaires[296].

De la même manière, Kim et al. ont calculé que leurs NPMs pouvait exercer des forces d'une dizaine de piconewton. Néanmoins, une force minimale de l'ordre de la centaine de piconewton est nécessaire pour rompre une membrane. L'intensité de la force calculé leur a permis d'avancer les hypothèses suivantes : les NPMs peuvent soit créer des pores de 10nm environ dans la membrane plasmique soit activer les canaux ioniques membranaires [294]. Ce sont les hypothèses que Contreras et al.(2015) et Wong et al. (2018) ont aussi avancé pour des forces de 0.2pN et entre 0.041-0.97pN respectivement [277], [289]. Néanmoins, en ce qui concerne l'activation de canaux ioniques, aucun de ces travaux n'en a fait la preuve expérimentale.

Seuls Ju et al. et ont mesuré l'influx d'anion dans les cellules, et trouvé que celui-ci était plus élevé après application du traitement que les forces exercées par des NPMs de 40nm perturbent les échanges ioniques à la membrane [295]. De même, Zamay et al. ont évalué la variation du sodium et potassium intracellulaire, et montré que le sodium intracellulaire diminuait de 33%. Ils en ont concluent que les forces mécaniques des NPMs (e=50nm ø500nm) exercées sur la filamine A inhibaient des canaux ioniques [292].

De leur côté, Cho et al. ont voulu montrer que les forces mécaniques exercées par les NPMs en membrane sont également capables d'activer des récepteurs déclenchant la mort cellulaire. Les NPMs de 15nm utilisées ciblaient le récepteur DR4 (death receptor 4) qui est connu pour déclencher l'apoptose. Le traitement au CMEM a engendré la formation de clusters de NPMs et donc des récepteurs DR4, entraînant la trimérisation des récepteurs et le déclenchement de la mort cellulaire [281]. Les auteurs ont montré que l'attraction générée entre les NPMs représentait une force autour de 30fN, ce qui permettait de faire bouger les NPMs sans provoquer de dommage cellulaire direct.

Ainsi, plusieurs mécanismes d'action des NPMs situées en membrane semblent possibles : la rupture de la membrane, la formation de pores membranaire ou encore l'activation/inactivation de canaux ioniques et l'activation de récepteurs.

- **Morts cellulaires engendrées**

Certains auteurs concluent que le mécanisme de mort à l'œuvre est unique, seules les altérations à la membrane cytoplasmique sont la cause de la mort cellulaire et provoquent la nécrose des cellules [277], [290], [296].

Une majorité de publications proposent l'apoptose comme mécanisme de mort [70], [74], [78], [85], [87], [88], [92]. Par exemple, Leulmi et al. ont réalisé un marquage à l'AnnexinV/IP et montrent un plus fort marquage à l'AnnexinV et l'AnnexinV/IP après traitement. Ils ont également mis en évidence l'activation de la caspase 3 [299]. Cependant, Zamay et al. concluent à une mort par apoptose en se basant sur un marquage AnnexinV/IP seul [292], ce qui n'est pas une preuve suffisante, ce marquage n'étant pas spécifique de cette mort programmée [310].

D'autres considèrent que plusieurs mécanismes sont à l'œuvre, associant une nécrose issue de la rupture de la membrane et une mort programmée en tant que mécanismes indépendants [285], [294], [301] ou l'un étant la conséquence de l'autre [280], [289], [300]. Néanmoins deux des trois publications avançant cette dernière hypothèse (Cheng et al, Contreras (2015) et al) n'ont pas réalisé de test attestant d'une mort cellulaire programmée, et ne se basent que sur des suppositions [289], [300].

Les différences entre les différents événements initiateurs et mécanismes de mort cellulaire engendrés ne semblent à priori pas liées aux types de CMEM employés, chaque mécanisme de mort étant induit par des CMEM statique, rotatif ou alternatifs. Ainsi, l'intensité des forces, plutôt que leurs natures, est possiblement à l'origine de ces différences.

II.4.3-b.NPMs internalisées

Les NPMs internalisées dans les lysosomes des cellules n'induisent pas tout à fait les mêmes effets que les NPMs en membrane.

- **Rupture et Perméabilisation membranaires**

Des auteurs se sont demandés si l'application de forces mécaniques par des NPM libres dans les lysosomes, et donc sans attache membranaire, pouvait tout de même induire la rupture ou la perméabilisation d'une membrane.

Les NPMs internalisées dans les cellules et libres dans les lysosomes exercent dans un premier temps une force sur ceux-ci. C'est pourquoi quelques auteurs ont étudié la rupture et la perméabilisation de la membrane lysosomale. Shen et al. [301] ont montré la perméabilisation des lysosomes en utilisant un marquage à la galactine 3. Cette perméabilisation était due à la rupture de la membrane lysosomale par les nanoparticules, montrée en microscopie à transmission. Au contraire dans une autre étude, Master et al. ne trouvent pas de preuves de perturbation lysosomale ni de perméabilisation de la membrane lysosomale par marquage de LysoTracker Green et d'acridine orange[282].

Shen et al. [301] ont également mis en évidence une rupture de la membrane cytoplasmique de la même manière par microscopie à transmission. D'après les auteurs, les NPMs, après avoir détruit la membrane lysosomale, sont libres dans le cytoplasme et au contact de la membrane cytoplasmique provoquent la destruction de cette dernière. Shen et al. appuient ce résultat en calculant que la force exercée par une assemblée de leurs NPMs équivaut à plusieurs centaines de piconewton. Cheng et al., quant à eux, se sont également intéressés à la membrane plasmique, montrant une perméabilisation de cette dernière à l'aide d'un marquage au 7-AAD, 5 et 30 minutes après application du CMEM. Néanmoins, les NPMs n'étant pas au contact de la membrane plasmique, le mécanisme à l'œuvre est soit le même que celui proposé dans la publication de Shen et al, soit cette perméabilisation de la membrane est engendrée par une autre perturbation directe des forces mécaniques exercées par les NPMs.

Ainsi, malgré leur manque d'attache membranaire, les NPM libres dans les lysosomes sont à même d'induire la rupture et la perméabilisation de membranes tant lysosomales que plasmiques.

- **Perturbation du cytosquelette**

Une seule publication s'est intéressée aux possibles effets des CMEM sur le cytosquelette. Master et al., qui comme dit précédemment ne détectent pas de perméabilisation des lysosomes, expliquent la diminution de la viabilité cellulaire par l'impact du mouvement des lysosomes, entraînés par les mouvements des NPMs, sur le cytosquelette[282]. En appliquant des forces mécaniques sur ce dernier, la mort cellulaire serait provoquée. En effet, l'observation des fibres de cytosquelettes des cellules cancéreuses en microscopie après application du traitement montre des points de ruptures de ces fibres.

Les auteurs de cette étude montrent également que l'effet létal du traitement dépend des propriétés mécaniques des cellules, ce qui explique que dans leurs travaux les cellules cancéreuses soient plus impactées par le traitement que les cellules saines. En effet, les cellules cancéreuses sont moins rigides que les cellules saines. Un co-traitement à la Cytochalasine D, un inhibiteur de la polymérisation des filaments d'actine permettant donc de diminuer la rigidité des cellules, montre que des cellules saines dont les propriétés mécaniques ont été modifiées deviennent sensibles au stress mécanique induit par le mouvement des NPMs.

Les auteurs estiment la force exercée par une assemblée de leur NPMs entre quelques douzaines et 300pN. D'après la bibliographie, les liaisons actine-actine nécessitent des forces de traction de 600pN ou des forces de torsion de 320 pN pour être rompues. De plus, les auteurs émettent l'hypothèse que comme les forces générées par les NPMs sont répétées et que les

forces exercées en dynamique nécessaire pour rompre un matériau sont 3 à 4 fois plus faible que des forces statiques, il est d'autant plus probable que les forces exercées par les NPMs soient suffisantes pour détruire les fibres du cytosquelette.

Les forces exercées par les NPMs libres dans les lysosomes peuvent entraîner ces derniers, les faire bouger, et ainsi tirer sur les filaments du cytosquelette pour entraîner leur désorganisation et leur rupture.

- **Morts cellulaires engendrées**

Plusieurs auteurs estiment que les CMEM induisent une mort apoptotique dans leurs expériences. Wen et al. concluent à une mort par apoptose à l'aide d'un marquage AnnexinV/IP. Pourtant, le marquage AnnexinV/IP n'étant pas spécifique de l'apoptose et pouvant être le témoin d'une autre mort programmée, cette hypothèse est discutable [310]. D'autres auteurs, en parallèle de l'apoptose, identifient l'induction d'un autre mécanisme de mort cellulaire dans leurs expériences de CMEM.

Shen et al. émettent l'hypothèse que deux mécanismes sont à l'œuvre lors de l'application du traitement: une mort nécrotique et une mort par apoptose [301]. Cette dernière, quantifiée par un marquage AnnexinV/IP serait provoquée par la rupture de la membrane lysosomale (22% de mort cellulaire). La mort nécrotique serait provoquée par la destruction de la membrane plasmique par les NPMs (57% de marquage à l'IP juste après application du CMEM). Pour ce qui est de la mort par apoptose, le marquage AnnexinV/IP n'étant pas spécifique de l'apoptose, il pourrait correspondre à une autre mort programmée [310].

Du et al. ont mis en évidence un type de mort cellulaire original par rapport aux autres publications, montrant que l'autophagie, en plus de l'apoptose, était également impliquée. Le pourcentage d'activation de caspases 3/ 7 et 8 (*cf. Tableau E - Annexes*) après inhibition de l'autophagie a diminué de façon significative, indiquant une apoptose partiellement induite par l'autophagie [286]. Le traitement réduit le potentiel membranaire de la mitochondrie, augmente la production de ROS, et provoque l'apoptose et l'autophagie.

La présence des NPMs dans les lysosomes permet donc de provoquer une mort apoptotique, nécrotique ou autophagique et possiblement d'autres voies de mort cellulaire programmées. Le peu d'études recensées ne permet pas de faire un lien entre mécanismes et types de CMEM utilisés.

Ainsi dans ces études, il a été démontré que différents types de champs très divers sont à même de provoquer un effet observable sur les cellules via l'application de forces mécaniques à l'aide de particules sensibles aux champs magnétiques.

Les NPMs liées à la membrane plasmique sont à même d'agir directement sur cette dernière et donc à activer des récepteurs membranaires, activer ou inactiver des canaux ioniques, ce que les NPMs libres dans les lysosomes ne peuvent à priori par faire. Pour autant, les NPMs liées à la membrane plasmique tout comme les NPMs libres dans les lysosomes peuvent également provoquer la perméabilisation ou rupture de membrane plasmique. Néanmoins seules les NPMs lysosomales (libres ou en membrane) semblent pouvoir déclencher la perméabilisation et la rupture des membranes lysosomales, et détruire les fibres du cytosquelette. Ainsi de par leurs localisations cellulaires les NPMs ne peuvent pas agir sur les mêmes composants cellulaires.

Les NPMs membranaires ou libres dans les lysosomes peuvent engendrer la nécrose, l'apoptose et parfois ces deux types de mort cellulaire en parallèle. Seules les NPMs libres dans les lysosomes ont montré une induction de l'autophagie. Les mécanismes de mort cellulaire engendrés par les CMEM semblent à la fois dépendant de la localisation des NPMs et de l'intensité des forces qu'elles appliquent. Aucun lien entre les types de CMEM utilisés et les mécanismes observés n'a pu être mis en évidence.

II.3.4- Etudes in vivo

Les détails des protocoles des études *in vivo*, ainsi que les effets obtenus par les auteurs sont détaillés dans le **tableau 3 ci-dessous**.

In vivo						
Auteurs	Animal : cellules	Injection des NPMS- Quantité- Temps d'incubation	Déroulement de l'essai	Analyse	Résultat	
					NPM+MF+	Contrôles
Cho et al.[281]	Poisson-zèbre	Intravitellus - 25ng- 24h avant exposition	Une exposition de 24 h	Morphologie	Altération morphologique de la queue	NPM+MF- : Pas d'altération
				Activation de la caspase 3	117 cellules positives	MF-NPM+ : 30 cellules
Vegerhof A. et al.[248]	Souris nude:A431 en sous-cutané	Injection intraveineuse-30 mg/mL soit 300 mg par kilo de souris- 2h avant exposiiton	Sur 14 jours, traitement un jour sur deux (6 jours) - 30minutes	Mesure du volume de la tumeur	NPM50nm : 148%; NPM100nm:119%; NPM200nm:32% + Présence de nécrose	Contrôle cetuximab : 543%
Cheng Y. et al.[300]	Souris nude athymique/U87 en orthotopique	Intracranienne -5 000 000 NPMS / souris- 24h avant exposition	Une exposition par jour pendant 7 jours-1h	Survie	63 jours	(NPM+MF-) 56 jours
				Volume de la tumeur (bioluminescence de la luciférase) : jour 21	Diminution ou perte de la bioluminescence	-
				TUNEL (dans la région tumorale)	25% de cellules en apoptose	NPM+MF- : 7% de cellules en apoptose
				Activation caspase3	Marquage d'activation de caspase 3 présent	Pas de marquage
Zamay et al.[292]	Souris ICR 6 : cellules EAC dans la cuisse	Intratumorale- 2.10 ⁷ NPMS/mL- 1h avant exposition	1 ou 3 jours de traitements journalier- 10minutes	Coupe histologiques (4h)	Forte destruction des cellules cancéreuses	Légère destruction des cellules cancéreuses par AS9 et AS14 seuls
				Réduction visuelle (photos) de la tumeur (24h)	Réduction de la taille de la tumeur sans nécrose et sans destruction des tissus environnants, sauf au 3 ^e jour	As14/AS9 : pas de réduction de la tumeur NPM non fonctionnalisées : réduction de la tumeur mais nécrose et destruction du muscle et de l'épithélium
Brossel et al.	Souris nude BALB/C : MDA- MB-231 en sous- cutané	Co-injection avec les cellules de la future tumeur -5mg/souris- 18jours	1 exposition/jour pendant 21 jours- 2h	Mesures du volume de la tumeur	Réduction significative du volume par rapport aux groupes contrôles	Groupes contrôles : [Souris Tumeur+NPM+MF-] ;[Souris Tumeur+,NPM-,MF+] ;[Souris Tumeur+,NPM-,MF-]
Li W. et al.	Souris C57BL/6 : MCF-7 en sous cutané	Intratumorale-100 µg/g de souris-8h avant exposition	2 Hz et 20 Hz 1 mT et 10 mT-1h	Coupe histologique	Destruction cellulaire	NPM+MF- ; NPM-MF+
Belyanina . et al.	Souris ICR	Intraveineuse (queue) - 1,6 µg/kg de souris - 30 minutes avant exposition	10 minutes d'exposition x 3 (un jour sur deux)	Volume de la tumeur	Réduction de la taille de la tumeur (Jour 13): 45mm ; Nécrose	[NPM non fonctionnalisées + ; MF+] ; [AS14+MF+] : pas de réduction de la tumeur Taille de la tumeur (jour 13) : 85mm
Du . et al.	Souris BALB/c- nude :	Intratumorale - 2 mg/kg de souris- 24h avant exposition	Exposition tous les deux jours pendant 30 jours -	Volume de la tumeur sur 30 jours (relatif)	2 et 5 (U2OS et SAOS2)	[MF-NPM-] : 40 et 45 (U2OS et SAOS2) ; [MF+NPM-]:40 et 45(U2OS et SAOS2); [NPM+MF-]: 10 et15 (U2OS et SAOS2);
				Survie sur 60 jours	80% (U2OS et SAOS2)	[MF-NPM-] :0% (U2OS et SAOS2) ; [MF+NPM-]:10% (U2OS et SAOS2); [NPM+MF-]: 40 et 50% (U2OS et SAOS2);

Tableau 3.- Etudes in vivo des traitements associant des nanoparticules et des champs magnétiques basse fréquence

II.3.4-a. CMEM statiques

En plus de leurs études *in vitro*, certains auteurs ont étudié l'effet des CMEM statiques *in vivo*.

En 2012, Cho et al. ont étudié l'effet de l'application d'un champ magnétique d'environ 200mT combiné à des NPMs de 15nm sur des poissons-zèbres. Des altérations morphologiques ont été observées au niveau de la queue et l'activation de la caspase 3 a été augmentée d'un facteur 4 (110 cellules positives contre 30 dans les contrôles) pour le groupe de poisson zèbre ayant reçu le traitement comparé au groupe contrôle avec NPMs seules[281]. Les auteurs ont pu ainsi montrer que les NPMs étaient également capables d'entraîner *in vivo* la formation de clusters de récepteurs OTR (équivalent du récepteur humain DR4 chez le poisson zèbre) entraînant la mort cellulaire.

Néanmoins cette étude s'est intéressée à l'effet des CMEM statiques sur des cellules cancéreuses. C'est ce qu'on fait Brossel et al. et Bouchlaka et al.

Brossel et al. et Bouchlaka et al. ont quant à eux travaillé sur des modèles murins. A l'aide de microparticules de 6-8µm et d'un CMEM de 400mT, Bouchlaka et al. [311] sont parvenu à induire la mort des cellules tumorales, à ralentir la croissance des tumeurs primaire, à diminuer la propagation de métastases. Le traitement a également permis d'augmenter l'activation de cellules dendritiques et le recrutement de celles-ci et de lymphocyte T cytotoxique CD8+ dans la tumeur. Brossel et al. ont utilisé des NPMs de 100nm, un CMEM de 660mT, et ont mesuré le diamètre des tumeurs : ils ont montré une réduction significative du volume des tumeur pour les souris recevant le traitement comparé aux groupes contrôles [284].

Ainsi les CMEM statiques sont capables de traiter les tumeurs cancéreuses en diminuant leur volume ou en ralentissant leur développement, en diminuant la formation de métastases et en favorisant l'immunité antitumorale.

II.3.4-b. CMEM alternatifs

D'autres auteurs ont voulu mettre en évidence la capacité des CMEM alternatifs à induire des effets *in vivo*. Des tests *in-vivo* similaires ont été réalisés par Zamay et al. et Belyanina et al. Les paramètres de ces études diffèrent seulement de par la forme, le matériau et la taille des NPMs, ainsi que par la fréquence de CMEM employée.

Dans la publication de Zamay et al., les tailles des tumeurs sont estimées sans mesure et comparées via des photographies effectuées le jour suivant l'application du champ. Il est cependant difficile de distinguer la tumeur sur les photographies présentées (1 par condition), la patte de la souris n'est pas présentée exactement dans les mêmes conditions sous l'objectif.

L'absence de quantification de taille ou de volume ne permet pas de convenablement différencier les effets entre les différentes conditions. Les auteurs concluent néanmoins que les NPMs vectorisées réduisent le volume de la tumeur sans entraîner de nécrose tandis que les NPMs non vectorisées provoquent une destruction de la tumeur mais aussi des muscles et de l'épithélium, causant une nécrose des tissus [292].

Belyanina et al. ont mesuré le volume de la tumeur et montré une diminution du volume de la tumeur par rapport aux groupes contrôles après traitement par application de CMEM. Les coupes histologiques ont révélées que les NPMs non vectorisées provoquaient une nécrose partielle. Les nanoparticules vectorisées provoquaient davantage de nécrose, de destruction cellulaire (tumoraux et du microenvironnement) et de réponse immunitaire. [285] En effet, une importante nécrose tissulaire est également visible sur les photographies, que l'on ne retrouve pas sur les photographies correspondant aux nanoparticules non vectorisées. Ces résultats sont en contradiction avec la précédente publication de Zmay et al., car la publication de ces derniers ne montre pas de nécrose avec l'utilisation de NPMs vectorisées. Les différences de résultats entre les deux publications peuvent potentiellement s'expliquer par les différences entre les paramètres utilisés.

Enfin Belyanina et al ont montré que le groupe recevant le traitement présentait une augmentation de l'activation de caspase 3 par rapport aux groupes contrôles, montrant qu'en plus de la nécrose, les NPMs vectorisées provoquaient le déclenchement de l'apoptose. Ces résultats sont en accord avec ceux qu'ils avaient observés *in vitro*.

Vegh et al. ont évalué l'efficacité de trois diamètres différents de NPM (50, 100, 200nm), vectorisées avec des anticorps cetuximab pour cibler les récepteurs EGF. La mesure du volume des tumeurs à la fin du traitement au CMEM (0.62mT, 4Hz) a révélé que les nanoparticules de plus grandes dimensions présentaient la plus grande efficacité comparé au groupe contrôle recevant du cetuximab seul : 32% de croissance tumorale seulement contre 543% pour le contrôle[248]. Egalement dans un modèle de tumeur sous-cutanée, l'étude des coupes histologiques par Li et al. montrent que les tissus des groupes contrôles ne présentent pas d'altérations tandis que les tissus du groupe soumis au CMEM (2 Hz et 20 Hz ; 1 mT et 10 mT) en présence des NPMs (30nm) présentent des signes morphologiques de destruction [283].

Ainsi *in vivo*, les CMEM alternatifs peuvent induire la destruction des cellules tumorales via la nécrose et l'apoptose et par conséquent ralentir la croissance des tumeurs.

II.3.4-c. CMEM rotatif

De la même manière que pour les CMEM statiques et alternatifs, des auteurs ont cherché à évaluer l'efficacité des CMEM rotatifs *in vivo*. Du S et al. et Cheng et al. montrent une diminution du volume tumoral et une augmentation de la survie des souris après traitement ((10mT;5Hz, NPMs de $\phi 2\mu\text{m}$, $l=70\text{nm}$) et ((1000mT,20Hz); NPM de 18nm) comparativement au contrôles[286],[300] De plus, l'étude histologique de coupes de cerveau par Cheng et al. a montré une augmentation de 18 % du nombre de cellules en apoptose (TUNEL) et une augmentation de l'activation de caspase3. [300]. Ces auteurs ont donc mis en évidence l'induction de l'apoptose à l'aide d'un traitement utilisant des CMEM rotatifs, menant à une réduction du volume tumoral et à une augmentation de la survie globale.

D'après les études présentées, tous les types de champs sont à même d'avoir des effets in vivo. Mais le peu de publications disponibles et l'absence de comparaison intra-étude ne permet pas de conclure sur les efficacités relatives des types de champs les uns par rapport aux autres. L'application de champs magnétiques couplés à des nanoparticules pour appliquer des forces mécaniques dans un organisme semble être une stratégie à développer dans le cadre de traitement anti-cancéreux. En effet, les traitements ont permis de réduire les volumes des tumeurs, d'augmenter la survie moyenne, et parfois de diminuer les métastases et de favoriser l'immunité antitumorale.

Conclusion de la bibliographie

Les études de CMEM appliquées à la thérapie contre le cancer étant relativement récentes, aucune ligne directrice concernant la marche à suivre et les étapes à respecter n'a été clairement établie. Pour pouvoir assurer une reproductibilité des résultats entre différentes équipes, mais également pour pouvoir faire des conclusions globales sur les effets des CMEM, tous les points listés dans les tableaux A, B, C situés en annexe de ce manuscrit devraient être systématiquement vérifiés et précisés dans les publications. Il faudrait également définir une appellation commune pour désigner l'utilisation des CMEM et des nanoparticules. Aucun consensus n'a été adopté, ce qui complique l'inventaire des publications sur le sujet. Enfin, un autre consensus sur les appellations des différents CMEM devrait être défini, comme celui qui a été proposé au début de la partie II de ce manuscrit.

Les CMEM ont démontré des résultats prometteurs *in vivo* encourageants pour le développement de futures thérapies anticancéreuses. De plus, trois études *in vitro* ont montré que les cellules saines semblent moins sensibles aux forces mécaniques appliquées par des champs alternatifs que les cellules cancéreuses [282], [293], [295], ce qui démontre un intérêt supplémentaire pour l'application des CMEM dans le cadre de thérapies anticancéreuses.

Les différentes études présentées illustrent la diversité de stratégies qui peuvent être utilisées pour appliquer des forces mécaniques sur les cellules à l'aide de CMEM. En effet les NPMs sont des outils modulables qui peuvent être conçues en fonction de la cible tissulaire, cellulaire, ou sub-cellulaire de la thérapie. Elles pourraient également être personnalisables en fonction des particularités du cancer traité, de son microenvironnement et du phénotype et génotype des tumeurs.

Pour autant, aucune étude n'a pour le moment tenté de cibler le microenvironnement tumoral. Comme nous l'avons vu précédemment, le cancer n'étant pas uniquement le fait des cellules cancéreuses mais également celui du microenvironnement, la modification de celui-ci permettrait d'augmenter l'efficacité de pénétration des nanoparticules dans la tumeur, en particulier du cancer du pancréas, mais également de diminuer la résistance des cellules cancéreuses aux traitements. L'injection par voies intraveineuses de nanoparticules vectorisées au design optimisé et personnalisé pour chaque cas, combiné à une application à distance de champ magnétique ainsi qu'à l'utilisation d'un traitement permettant la déplétion/modification du microenvironnement, pourraient permettre de surmonter les difficultés associées au traitement du cancer. Au vu de leurs rôles dans la tumorigenèse et la résistance aux traitements (*cf. partie I*). Il serait notamment intéressant de cibler les fibroblastes associés au cancer (CAFs).

III-RESULTATS

III.1. Première partie des résultats : Mort cellulaire des CAFs provoquée par l'application de forces mécaniques exercées par des NPM soumises à un CMEM rotatif

Comme détaillé précédemment dans la partie 2 de ce manuscrit, les champs magnétiques haute fréquence peuvent induire l'échauffement de particules ou de nanoparticules magnétiques et donc provoquer une élévation de température. L'application des champs magnétiques hautes fréquences pour des thérapies anticancéreuses a été étudiée et testée au stade clinique [263]. Les champs magnétiques basse fréquence, eux, entraînent le mouvement des particules ou nanoparticules magnétiques qui peuvent ainsi exercer des forces mécaniques sur leur environnement. Le nombre d'études sur les champs magnétiques basses fréquences, que nous appellerons champs magnétiques à effet mécanique, est encore restreint.

Actuellement, les auteurs s'intéressant aux nanoparticules magnétiques (NPMs) et aux champs magnétiques à effet mécanique (CMEM) pour induire la mort cellulaire se sont en très grande majorité penchés sur leurs capacités à induire la mort de cellules tumorales. Seules deux études ont choisi de s'intéresser aux effets délétères que pourrait avoir la combinaison d'objets magnétiques/NPMs et de CMEM sur des fibroblastes [238], [312]. Les CMEM pouvant induire la mort de fibroblastes sains, il est possible qu'ils puissent également induire la mort cellulaire des CAFs.

Comme nous l'avons évoqué dans la partie I de ce manuscrit, les fibroblastes associés au cancer (CAF) sont une cible à privilégier pour des traitements ciblant le microenvironnement, car ils sont fortement impliqués dans la tumorigenèse et la résistance des cellules cancéreuses aux thérapies traditionnelles [63], [68].

Nous avons donc cherché à établir la preuve que les NPMs couplées à des CMEM rotatifs peuvent induire la mort des CAFs via l'application de forces mécaniques.

Nous avons pour cela utilisé des NPM ciblant le récepteur CCK2 (RCCK2), un récepteur dont l'expression dans les CAFs pancréatiques a été démontrée [140]. Les NPM ont été vectorisées avec un agoniste de ce récepteur (gastrine) qui entraîne son internalisation de manière spécifique : ces NPM@Gastrine se retrouvent ainsi dans les lysosomes de CAFs pancréatiques exprimant le récepteur CCK2 (CAF-RCCK2),

Notre équipe a cherché à déterminer si une amplitude optimale existait pour induire la mort des CAFs pour des NPMs avec un cœur magnétique de 6nm. Nous avons pour cela balayé des amplitudes situées entre 20 et 380mT. Nous avons choisi de la même manière de balayer plusieurs fréquences, sur une gamme de fréquence allant de 0.2 à 20Hz. Nous avons déterminé, pour des paramètres de CMEM identiques (amplitude, fréquence, temps d'application), quel était le type de CMEM (rotatif, alternatif, statique) le plus efficace pour induire la mort cellulaire des CAFs.

Enfin nous avons initié l'étude du mécanisme impliqué dans la mort cellulaire déclenchée. Au vu des mécanismes décrits dans la littérature, nous nous sommes particulièrement intéressés à la perméabilisation lysosomale, à la nécrose, et à l'activation de morts cellulaires programmées.

Targeted magnetic nanoparticles remotely induced mechanical destruction of tumor microenvironment through rotating magnetic field

Lopez S^{1,2}, Halalli N¹, Lalatonne Y³, Hillion A¹, Clerc P^{1,2}, Antunes J³, Fourmy D^{1,2}, Motte L³, Carrey J^{1*#}, Gigoux V^{1,2*#}.

1. Laboratoire de Physique et Chimie des Nano-Objets, CNRS UMR5215-
INSA, Université de Toulouse III, Toulouse, France.

2. INSERM ERL1226, Receptology and Targeted Therapy of Cancers,
Toulouse, France.

3. Laboratory for Vascular Translational Science, INSERM U1148,
University Paris 13, Bobigny, France.

* Correspondance: à définir Véronique Gigoux, INSERM ERL1226, 1 Avenue du
Professeur Jean Poulhes, F-31432 Toulouse, France. Email : veronique.gigoux@inserm.fr and
Julian Carrey, LPCNO-CNRS UMR5215, 135 avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France.
Email: julian.carrey@insa-toulouse.fr

Conflicts of Interest: None.

: equal participation à définir sur le premier, second et dernier rangs

ABSTRACT

The development of nanotherapies targeting the microtumoral environment is an interesting strategy to inhibit cancer progression. For this purpose, the destruction of cells using the mechanical activation of magnetic nanoparticles (MNPs) by low-frequency magnetic fields is an approach that is technically easier and with potentially less undesirable effects for the patients than magnetic hyperthermia. Here, we develop MNPs decorated with the agonist gastrin, which successfully bind to CCK2R, a receptor overexpressed in several types of cancer cells and also expressed in cancer associated fibroblasts (CAFs). MNPs internalize and accumulate in the lysosomes of pancreatic CAFs, cells which are widely known to increase tumoral development and resistance of cancer cells to chemotherapeutics agents. A screening of the magnetic field characteristics used (amplitude, frequency, alternating vs rotating) permits to demonstrate that cell death is maximized when the magnetic field rotates and displays a maximum as a function of the field amplitude. These two features were expected theoretically and are supported by kinetic Monte-Carlo simulations, allowing to estimate that the force generated by an assembly of MNPs is of the order of 1 pN under optimal conditions. Using a rotating field of 40 mT at 1 Hz, a cell death ratio of 40% could be reached. Finally, we showed that cell death occurs through a lysosomal pathway. This study establishes the proof-of-concept that targeted MNPs can disrupt tumor microenvironment through mechanical forces upon rotating magnetic field exposure and opens new opportunities for cancer therapy.

Keywords: cancer, magnetic nanoparticles, magnetic field, mechanical forces, torque, tumor microenvironment, 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 nanotherapy of cancers¹. Over the past few decades, a wide range of IONPs of controlled size, composition and functionality has been developed, providing an excellent resource for nanomedicine. Indeed, they have been already approved for clinical use as contrast agent for magnetic resonance imaging and iron supplement for the treatment of iron deficiency anemia². Exposed to a high frequency alternating magnetic field, IONPs release heat which can be used to develop several biological approaches such as the eradication of cancer cells⁵, the release on demand drugs⁶, the stimulation of neurons⁷, the induction of gene expression⁸ or the disruption of extracellular matrix constituting the tumor microenvironment⁹. In particular, magnetic hyperthermia has been the subject of an active research activity in the past decades and tremendous progresses have been made in basic research on this promising cancer treatment³. A large diversity of IONPS nano-heaters with high heating efficiencies have been developed, including chemically-synthesized magnetic nanoparticles or biogenic magnetosomes extracted from bacteria⁴. Magnetic hyperthermia using IONPs under a high frequency alternating magnetic field has distinctive benefits for tumor ablation in deep tissue thanks to distant control and manipulation by the magnetic field. However, this approach, requiring magnetic fields with high frequencies ranging (from tens of kHz to MHz), generates eddy currents inside healthy tissues that might cause patient discomfort. But above all, applying high-frequency magnetic fields on a large scale (humans) remains a technical challenge, because of the strong heating of coils and magnetic cores when they work at high frequency¹⁰. Consequently, only few clinical trials has been performed applying a moderate frequency and magnetic field amplitude (100 kHz, 20 mT) which causes several adverse effects due to heat diffusion to surrounding tissues and presents limiting factors such as the irregular intratumoral heat distribution¹¹.

Recent reports highlight new potentialities of IONPs for anti-cancer therapy. Exposed to a rotating low-frequency magnetic field (RMF), IONPs generate mechanical forces or torques and transmit them to the materials they are in contact with. Such torques can be used to control the calcium entry within cells, improve gene transfection or tissue engineering, manipulate molecules, stimulate drug release, induce proteins degradation or activate enzymes¹². It makes also possible to explore the strategy of remote mechanical ablation, i.e. destroying cells using the combination of low-frequency magnetic field and nanoparticles. The proof of concept of *in vitro* and *in vivo* targeting by IONPs of tumors overexpressing surface receptors could, moreover, make this possible without any invasive intratumoral injections This

new approach could solve the problems of elevated temperature increases observed in most magnetic hyperthermia approaches, as well as the technological problems related to the magnetic field generation, and would be highly beneficial to IONP-based cancer therapy.

Several studies have already demonstrated that micrometric discs, microspheres or micro-wires induce the death of cancer cells upon a low-frequency alternating or rotating magnetic field¹³. However, such micro-objects present limited applications notably due to their large size, incompatible with intravenous injection. So far, only few studies have reported the death of cancer cells using IONPs exposed to a low frequency alternating or rotating magnetic field (20 mT, 20 Hz)¹⁴.

First, the theoretical aspects underlying the torque generated by assemblies of magnetic nanoparticles have been recently addressed by our group using kinetic Monte-Carlo simulations. In these studies, several predictions were made, which should have strong repercussions for experimental studies. Thus it was predicted that rotating magnetic fields generate much stronger torques than alternating ones, a point which has so far never been tested experimentally. Moreover, when rotating magnetic fields are used, it was predicted that the torque as function of the magnetic field amplitude follows a non-monotonic behaviour and displays a maximum. To be proven experimentally, cell death experiments as a function of magnetic field amplitude have to be done. These two points are addressed in the present article.

Second, we focus in the present work on the demonstration that magneto-mechanical ablation can be applied to tumor environment cells. Recent studies demonstrate that cancer progression and invasiveness is not only determined by the genotype of the cancer cells, but also by their interactions with the tumor microenvironment¹⁵. Indeed, whereas cancer cells develop their own mechanisms of resistance (overexpression of efflux pumps, enzymes of detoxification of chemotherapeutic agents, mutations of proteins involved in cell death signaling...), the tumor microenvironment was also shown to contribute to the tumor resistance such as in pancreatic adenocarcinoma¹⁶. The tumor microenvironment is composed of immune cells, dendritic cells, endothelial cells, fibroblasts immersed in an extracellular matrix (ECM) which can be extremely dense and compact, such as in pancreatic adenocarcinoma. Among the cells constituting the tumor microenvironment, the Cancer-associated fibroblasts (CAFs) exert a critical role in cancer resistance to conventional anti-cancer treatments¹⁶.

In the present work we thus report on the magneto-mechanic ablation of tumor microenvironment components, CAFs, using ultra-small IONPs with a 6 nm core targeting pancreatic CAFs, chosen as a model. We demonstrated the ability of these IONPs decorated with gastrin (MNP@Gastrin) to target pancreatic CAFs expressing the type 2 cholecystokinin

receptor (CCK2R), and accumulate into CAFs lysosomes. Finally, we used them as a targeted therapeutic agent to induce the death of CAFs through a cell death lysosomal pathway, upon a low frequency rotating magnetic field. We show that a rotating magnetic field is much more efficient than an alternating one, and that cell death displays a maximum, as expected experimentally. Monte-Carlo simulations are used and bring a theoretical support to our *in vitro* experiments. Thus, we showed that a small amount of nanoparticles (30-40 pg Fe / cell) directed into CAFs lysosomes are able to induce cell death by magneto-mechanic ablation upon a low frequency rotating magnetic field. This set of result is very encouraging and promise future developments for targeting CAF therapy using IONP and low frequency RMF.

MATERIALS AND METHODS

Chemical materials

Phosphonate-polyethylene glycol-COOH (PO-PEG-COOH) MW 2.000 g/mol was purchased from Specific Polymers. CA-074-Me and Pepstatin A inhibitors were from Sigma-Aldrich. Annexin V Binding Apoptosis Assay Kit was from AAT Bioquest, Inc. (Sunnyvale, CA, USA). LysoTracker® Green DND-26 was from Invitrogen.

Nanoparticles synthesis and functionalization

Iron (III) acetyl acetonate (>99.9%) and Benzyl alcohol (99.8%) were purchased from Sigma Aldrich. Phosphonate – poly(ethylene glycol) PEG – carboxylic acid MW 2500 g/mol (PO-PEG-COOH) and citrate ions was respectively purchased from specific polymers (ref. SP-1P-10-002) and Sigma Aldrich (citrate ions). 6 nm IONPs (Ultra-small Iron Oxide Nanoparticles) were synthesized in benzyl alcohol under microwave heating as reported previously {Richard, 2016 #976}. Briefly, Iron (III) acetylacetonate (1.2 mmol) was added to 10 ml of benzyl alcohol and reacted at 210°C during 30 min under microwave irradiation on a Monowave 300 from Anton Paar. The resulting suspension was extracted from benzyl alcohol to water by adding 10 ml of dichloromethane and a 10 ml of citrate ions (3.3 mmol) dispersed in water. Immediately a phase separation occurs with the transfer of IONP within the upper water phase. Excess of citrate is removed using ultrafiltration process (Amicon30 kDa, Merck Millipore). The coated citrate are removed with NaOH (1 mol/l) and IONPs are separated using a neodymium magnet. The solid (Fe_3O_4 = 40 mg) was redispersed in water at pH 2 using an HCl solution at 10^{-1} mol/l and passivated by mixing the solution with a PO-PEG-COOH water solution (pH 2; 200 mg). Then, the excess of PO-PEG coating molecules is removed using ultrafiltration process (Amicon30 kDa, Merck Millipore) and IONP@PO-PEG are dispersed in water at pH 7.4 using HCl (10^{-1} mol/l) and NaOH (10^{-1} mol/l) solutions. The average number of molecules of PO-PEG-COOH per nanocrystal was measured by total X-ray fluorescence (TXRF) analysis Ref. Infrared spectra in KBr pellets of various proportions of PO-PEG-COOH mixed with a constant amount of Fe_3O_4 nanoparticles were recorded. Then, the normalized 1110 cm^{-1} band was used for the establishment of the calibration curve and the average number of PO-PEG-COOH per nanoparticle was deduced from this curve.

The IONP@PO-PEG were then decorated with ~100 molecules of a synthetic replicate of gastrin (Covalab) and ~20 molecules of the fluorescent label NHS-DY647-PEG1 (Dyomics GmbH, Jena, Germany), and termed as MNP@Gastrin. An aliquot of IONP@PO-PEG-COOH was sonicated for 10 min on melting ice (Bioblock Scientific 88154). Firstly, the carboxylic

acid functions at the outer surface of the IONP@PO-PEG-COOH were activated using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC, 2n COOH) and incubated with ethylènediamine (10n COOH) in MES buffer pH 4.5 at room temperature for 1 h. After 5 washes with 10 volumes of H₂O, the second step was the linkage of the fluorophore NHS-DY647-PEG1 (20 molecules per IONP) in phosphate buffer pH 8.3, at room temperature for 1 h. Then, 3-Maleimidopropionic acid N-hydroxysuccinimide ester (BMPS, 2n COOH) 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 pH7.2 and let to react for 2h. Finally, free maleimide functions were saturated by addition of an excess of cystein (1000n NOOH) in 50 µL in phosphate buffer pH7.2. After 8 washes with 10 volumes of H₂O, MNP@Gastrin were stored at 4°C. The average number of gastrin derivatives was measured by the OPA method after calibration curve establishment (supplementary Figure S2). 50 ml of the sample was diluted in 50 l of NaOH 2N and left overnight at 60°C. 1 ml of OPA reagent was added to the mixture and fluorescence measurement was recorded. The average number of gastrin peptide per nanoparticle was deduced from a calibration. Before use, MG-IONP-DY647 were sonicated on ice for 10 min.

Physico-chemical characterization of MNP

Transmission Electron Microscopy (TEM) samples were prepared by depositing a drop of MNP suspension on carbon coated copper grids placed on a filter paper. TEM images were obtained using a FEI CM10 Microscope (Philips). The median diameter was deduced from TEM data measurements, simulating the diameter distribution with a lognormal function.

The stability of USPIO Fe₃O₄ ([Fe] = 0.25 mM) was investigated by dynamic light scattering using a Nano-ZS (Red Badge) ZEN 3600 device (Malvern Instruments). Suspension of MNP@Gastrin at 0.1 mg/ml was prepared in DMEM-F12 containing 0.5% FBS. The MNP suspension was sonicated for 10 min on ice. After temperature equilibrium to 20°C, particle size was measured by dynamic light scattering using Nanotracs 250 (Microtracs, York, PA).

The magnetization curve of USPIO Fe₃O₄ was measured on a VSM magnetometer (Quantum Design, Versalab) at room temperature. VSM measures magnetization cycles by applying a field from -2300 to 2300 kA/m with a sampling rate of approximately 8 kA /s. The measurements were performed on a sample in solution at a concentration of 0.2 g/l at 298°K. FZC / FC measurements were performed by applying an external magnetic field of 10 mT over a temperature range of 50 to 300 K.

Magneto-mechanic simulations

The magnetic properties of the MNP assembly have been calculated using a kinetic Monte Carlo program. The torque is calculated using monodisperse MNPs of diameter $d = 6$ nm, with a uniaxial anisotropy $K_{eff} = 13 \text{ kJ.m}^{-3}$, displaying a magnetization per unit volume $M_s = 500000 \text{ A.m}^{-1}$ in a rotating or alternating magnetic field. In order to get the closest of the behavior of MNPs inside a lysosome, the magnetic interactions have been taken into account by studying a sphere containing 3000 particles at different volume concentrations.

Cell lines

Two immortalized human cancer-associated fibroblasts (CAF) cell lines were used in the present article. The immortalized human CAF1 line was established by retrovirus-mediated gene transfer of simian virus 40 (SV40) T antigen and human telomerase reverse transcriptase (hTERT) into human pancreatic fibroblasts isolated from the resected pancreas tissue of a patient undergoing operation for pancreatic cancer, and obtained from Dr A. Masamune (Division of Gastroenterology, Tohoku University Graduate School of Medicine, Japan) {Hamada, 2012 #956}. The immortalized human CAF2 line was obtained from Dr C. Bousquet's laboratory (CRCT, France). CAF2 cells were isolated from patient tumor tissues of pancreas surgically resected from PDAC patients, using the outgrowth method as already described {Bachem, 1998 #958}, and then immortalized through lentivirus-mediated gene transfer of human telomerase reverse transcriptase (hTERT). Briefly, small tissue blocks were cut (0.5–1 mm³) using a razor blade and were seeded in 10 cm² uncoated culture wells in the presence of DMEM-F12 containing 10% foetal calf de-complemented serum (FBS). Tissue blocks were cultured at 37°C in a humidified atmosphere at 95% air and 5% CO₂. 18 h after seeding, culture medium was changed. CAFs grew out from the tissue blocks 1 to 3 days later. Fresh patient PDAC samples were obtained after informed consent in accordance with the declaration of Helsinki and stored at the « Cancer Research Center of Toulouse» collection (CRCT, INSERM U1037, N° CPP DC-2016-2654), according to the French law (declaration to the ministry of higher education and research). This study was approved by the ethic committee of the Institution.

Both cell lines 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 clones were selected with 400 µg/ml geneticin (Sigma-Aldrich) and termed respectively CAF1-CCK2R and CAF2-CCK2R. CAFs cells were cultured in DMEM/F-12 medium (DMEMF-12 GlutaMAX™, Thermofisher Scientific)

containing 10% fetal bovine serum (FBS), 100 IU/ml penicillin/streptomycin (Penicillin-Streptomycin P4333; Sigma-Aldrich) in a humidified atmosphere at 95% air and 5% CO₂ at 37°C. CAF-CCK2R cells were grown with 400 µg/ml geneticin (Sigma-Aldrich).

Analysis of cell viability

10⁴ cells/well of CAF1-CCK2R and CAF2-CCK2R were plated into 96-well plates (Thermo Scientific™). After overnight growth, cells were incubated with increased concentrations of MNP@Gastrin DMEM/F-12 medium buffered with 10 mM HEPES buffer pH7.4 containing 0.5% FBS and 100 IU/ml penicillin-streptomycin for 24 h. Cell viability was determined using a MTT viability assay.

Quantification of MNP@Gastrin binding and uptake by flow cytometry

For MNP binding experiments, cells were seeded into 24-well plates (Thermo Scientific™) at a density of 25×10^3 and 40×10^3 cells/well for CAF1-CCK2R and CAF2-CCK2R, respectively, and grown overnight. Cells were incubated with MNP@Gastrin (2 to 32 µg magnetic Fe/ml) for 1 to 24 h at 37 °C in DMEM/F-12 medium buffered with 10 mM HEPES buffer pH 7.4 containing 0.5% FBS and 100 IU/ml penicillin-streptomycin. Then, cells were rinsed twice with iced-cold PBS containing 0.5% BSA and once with PBS alone. Cells were recovered and transferred to FACS tubes. Cell-associated fluorescence was determined using a BD FACSCalibur™ flow cytometer.

MNP@Gastrin localization by confocal microscopy

25×10^3 and 40×10^3 cells/compartments of CAF1-CCK2R and CAF2-CCK2R were respectively plated onto 4-compartment Cellview culture dishes (greiner Bio-One). After overnight growth, cells were incubated with MNP@Gastrin (16 µg magnetic Fe/mL) in DMEM/F-12 medium buffered with 10 mM HEPES buffer pH7.4 containing 0.5% FBS and 100 IU/ml penicillin-streptomycin for 24 h. For lysosome staining, cells were incubated for 30-min in the presence of 10 nM LysoTracker Green DND-26 (excitation: 488 nm, Invitrogen). MNP@Gastrin (excitation: 633nm) and Lysotraker co-localisation was analyzed using LSM780 confocal microscope (Zeiss).

MNP@Gastrin localization by transmission electron microscopy

10⁴ CAF1-CCK2R and CAF2-CCK2 cells were grown in 6-dishes plates (Thermo Scientific™) and incubated with MNP@Gastrin (16 µg magnetic Fe/mL) for 24 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 12h and postfixed in 1% osmium tetroxide (osmium 2%, saccharose 0.25 M, Sorensen 0.05 M) for 1h at 20°C, followed by washings with distilled water and uranyl acetate 2% for 12h at 4°C. The cells were dehydrated by sequential washings of 10 min in 30, 50, 70 and 95% ethanol followed by 3 washings of 15 min in absolute ethanol. Cells were then embedded in EMBed 812 resin for 12h. Resin polymerization was obtained at 60°C for 48h. 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.

Quantification of superparamagnetic Fe contained in MNP@Gastrin by electron paramagnetic resonance

10⁵ and 1.6 x 10⁵ CAF1-CCK2R or CAF2-CCK2R cells were respectively seeded onto 6-well plates and grown for 24 h. Cells were incubated with MNP@Gastrin (16 µg magnetic Fe/ml) in DMEM-F12 medium buffered with 10mM HEPES buffer pH7.4 containing 0.5% FBS and 100 IU/ml penicillin-streptomycin for 24 h, at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere, washed twice with ice-cold PBS. The number of cells was counted on an aliquot and the electron paramagnetic resonance analysis was performed as described previously {Gobbo, 2015 #364}.

Magnetic field generation

Two different magnetic field generators were used for this study. For most RMF experiments (Figures 3 a-b-c, Figure 4, Figure 5), the setup used is a homemade bench based on a magnet rotated by a motor. The magnet itself is a 2.5 cm thick cylindrical magnet Halbach magnet with an inner diameter of 6 cm and an outside diameter of 15 cm. At each magnetic field amplitude is associated a different magnet. The magnetic field amplitude variation is small with the position at the scale of the Cellview dish, as shown by space-dependent magnetic field measurements: for the magnet rated as “380 mT” and “40 mT” the magnetic field equals 380 ± 50 mT and 41 ± 1 mT, respectively. The rotating magnet is surrounded by a Plexiglas chamber, the temperature inside which is regulated using a fan able to blow heated air.

For the experiments aiming at testing the difference between LF-RMF and LF-AMF (Figure 3d), a second home-made setup is used. In this setup, the magnetic field is generated by an ensemble of 6 laminated silicon iron magnetic poles surrounded by copper wires in a

configuration resembling the one of a stator. The sample space has a diameter of 4.5 cm. Depending on the phase of the current sent into the coils surrounding the poles, either a rotating magnetic field or an alternating one is generated. The temperature inside the sample space and the coil is regulated using a similar device than with the previous magnetic field generator. In all these experiments, the temperature of the Cellview dish was maintained at $37.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$ during magnetic field exposure. At the end of the experiments, cells were placed in a humidified atmosphere at 5% CO_2 and 37°C .

Cell treatment by low magnetic field

Experiments where the cells were exposed to low frequency rotating (RMF) and alternating (AMF) magnetic field were performed as follows. 25×10^3 and 40×10^3 cells/compartiment of CAF1-CCK2R or CAF2-CCK2R cells were seeded into 4-compartment Cellview dishes (Greiner Bio-One), grown overnight and incubated with MNP@Gastrin (4, 8 or 16 μg magnetic Fe/ml) for 24 h at 37°C in DMEM/F-12 medium buffered with 10 mM HEPES buffer pH 7.4 containing 0.5% FBS and 100 IU/ml penicillin-streptomycin. After removing medium, cells were rinsed twice with incubation medium, incubated in incubation medium with or without 10 μM CA-074 Me or 10 μM Pepstatin A for 1 h, and then exposed to low frequency RMF or AMF for 2h, at different amplitudes (20, 40, 60, 200, 380 mT) and frequencies (0.2, 1, 5, 10, 20 Hz).

Determination of cell death

The effects of magnetic fields treatment were investigated by labeling dead cells with Annexin V-iFluor488 and Propidium Iodide (excitation: 488 and 540 nm respectively, AAT Bioquest), 4 h after magnetic field exposure and counted them using a BD FACSCalibur™ flow cytometer.

Lysosomal membrane permeabilization

CAF1-CCK2R and CAF2-CCK2R cells having internalized MNP@Gastrin were exposed to low frequency RMF for 2 h, incubated with DMEM-F12 medium 0.5% FBS containing 10 nM LysoTracker Green DND-26 (Invitrogen, excitation wavelength: 488 nm) for 15 minutes, rinsed with incubation medium. Lysosome integrity was determined by analyzing LysoTracker fluorescence intensity by flow cytometry using a BD FACSCalibur™ flow cytometer.

Statistical analysis

Results are expressed as the mean \pm SEM of at least three independent experiments. Statistical analysis was performed using ANOVA test. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

MNP@Gastrin and specific CAF targeting

Ultra-small IONPs were synthesized using microwave non aqueous sol-gel method¹⁸. As shown in previous studies, the IONP surface has to be functionalized in order to obtain bio-stability, bio-compatibility and to allow specific targeting. Herein, the IONP surface was functionalized with phosphonate pegylated ligands bearing carboxylate functions as terminal group. The phosphonate groups show high affinity for metal oxide surface whereas carboxylate groups could be used in a second step for covalent coupling of targeting molecules. The magnetic core size, measured by TEM, equaled 6.0 ± 1.3 nm (Figure 1a). The concentration of NPs inside a lysosome has been evaluated in the range 500-5000 NPs per lysosome while the volume concentration is estimated in the range 10-25%. The average number of PO-PEG-COOH per nanoparticle was evaluated, using total X-ray fluorescence (TXRF) analysis (see method), to 176 ± 16 (supplementary Figure S1). The hydrodynamical diameter biological medium enriched by 0.5% SVF was found equal to 20.6 ± 2.6 nm, indicating low aggregation (Figure 1b). As expected, 6 nm IONPs exhibited a saturation magnetization of 65.6 ± 1.8 Am² / kg Fe (Figure 1c). IONPs were then decorated with a fluorophore, for their cytometry detection, and with a synthetic analog of gastrin, to selectively target pancreatic CAFs expressing the CCK2R. The analysis by DLS, in a biological medium enriched by 0.5% SVF, showed a distribution of the functionalized IONPs, called MNP@Gastrin, around 43 ± 4 nm (Figure 1b). OPA assay indicate an average number of 26 peptides per nanoparticles.

The type 2 cholecystokinin receptor, CCK2R, was recently proven expressed on cancer-associated fibroblasts (CAFs) in pancreatic adenocarcinoma and their targeting using an antagonist inhibit the secretion of collagen and reduce fibrosis in the tumor microenvironment. The tumor microenvironment targeting strategy elaborated in this study requires a specific recognition of pancreatic CAFs expressing the CCK2R by MNP@Gastrin. We therefore elaborated pancreatic CAFs expressing or not the CCK2R. Two immortalized human CAFs lines, called CAF1 and CAF2, were isolated from the resected pancreas tissue of two patients undergoing operation for pancreatic cancer and permanently transfected with an expression

vector coding for the human CCK2R; two CAFs lines expressing the CCK2R were selected and termed CAF1-CCK2 and CAF2-CCK2 respectively (Figure S3). Of note, the CAF2-CCK2 cell line expresses the CCK2R with a 3.7-fold lower level than the CAF1-CCK2 cell line (Figure S3). We therefore characterized the cytotoxicity, the binding, the uptake and the cellular fate of MNP@Gastrin in the CAFs lines (Figure 2a-g). The cytotoxicity study shows that the viability of CAF1-CCK2 and CAF2-CCK2 was still above 90 % after 24 h of incubation with MNP@Gastrin at Fe concentration ranging from 1 to 32 $\mu\text{g/ml}$ of Fe, confirming the low cytotoxicity of this nanoplatform (Figure 2a). MNP@Gastrin binding and internalization determined by flow cytometry indicates that the amount of MNP@Gastrin taken up by CAFs cells increased with the MNP@Gastrin concentration (Figure 2b-c). Quantification of flow cytometry results also showed high specificity and targeting of CAFs expressing the CCK2R since MNP@Gastrin were taken up in very high amounts by CAF1-CCK2 comparatively to CAF1 cell lines lacking the CCK2R, after 24 h of incubation (Figure 2b). Indeed, we observed 14.6 ± 2.1 , 8.5 ± 1.3 , 7.4 ± 1.0 or 3.2 ± 1.2 uptake ratios by CAF1-CCK2 cells comparatively to CAF1 cells at the low extracellular concentrations of MNP@Gastrin corresponding to 4, 8, 16 or 32 $\mu\text{g Fe/ml}$ (Figure 2b). Similarly, the uptake ratios by CAF2-CCK2 cells were 14.6 ± 2.1 , 8.5 ± 1.3 , 7.4 ± 1.0 or 3.2 ± 1.2 higher than in CAF2 cells at the same MNP@Gastrin concentrations (Figure 2c). The 3- to 14-fold increase uptake depending on MNP@Gastrin concentration validate the use of gastrin to target pancreatic CAFs expressing the CCK2R. The kinetics of MNP@Gastrin binding and internalization determined by flow cytometry indicates that the amount of MNP@Gastrin taken up by CAF1-CCK2 increased promptly after 1 hour of incubation, then kept increasing with the time of incubation without reaching a plateau (Figure 2d). After 24 h of incubation, magnetic measurements showed an amount of 35.1 ± 3.3 and 44.4 ± 2.5 pg of magnetic Fe per CAF1-CCK2 and CAF2-CCK2 cell respectively (Figure 2e). Finally, confocal microscopy study showed that MNP@Gastrin are mainly localized in the lysosomal compartment of CAFs cells expressing the CCK2R after 24h of incubation (Figure 2f). Figure 2g confirms this result but at the nanoscale, with transmission electron micrograph of CAF1-CCK2 cells incubated with 16 $\mu\text{g/ml}$ of MNP@Gastrin for 24h.

Torque undergone by an assembly of particle

Figure 3a illustrates the theoretical aspects related to the force generated by MNPs submitted to a rotating or alternating magnetic field. The calculations have been performed using the magnetic parameters of magnetite (see Methods) and for a nanoparticle diameter of 6

nm. The volume concentration of the nanoparticles used in the simulations (15%) has been estimated from TEM images (see Methods). First, it can be observed that, when an alternating magnetic field is applied, the force increases with the field and, at large field, displays a plateau. However, when a rotating magnetic field is applied, a strong torque peak occurs in a small range of field amplitude (20-60 mT), a behavior which was already described in a previous article and is due to a breaking of time reversal symmetry when the magnetic field rotates. Only in a small range of field amplitude (30-60mT) the generated forces are able to be above 1 pN which is the lower limit to start breaking chemical and/or biological bond. Superimposed to the simulations are shown the cell death rate obtained at different amplitude of field. Results will be discussed later in this paper but it can be seen at first sight that the shape of the curve follow closely the force amplitude generated by MNPs.

Internalized MNP@Gastrin cause CAFs death upon rotating low frequency magnetic field

Based on simulations, we screened the efficiency of different amplitudes (20 to 380 mT) and frequencies (0.2 to 20 Hz) of rotating magnetic field (RMF) to induce the death of CAFs having accumulated MNP@Gastrin in their lysosomes. For this purpose, CAF1-CCK2 cells expressing high level of CCK2R were incubated with MNP@Gastrin at 4, 8 or 16 $\mu\text{g Fe/ml}$ for 24 h, washed to eliminate unbound and non-internalized MNP@Gastrin and exposed to RMF for 2 h with temperature maintenance at 37°C. Controls were composed of cells lacking MNP@Gastrin and cells having internalized MNP@Gastrin but that were not exposed to RMF. After RMF exposure, the cells were cultured under standard conditions for recovery. The impact of treatment was determined by counting cells labeled with FITC-tagged annexin V (AnnV) and/or propidium iodure (PI) by flow cytometry, 4 h after RMF exposure (Figure 3b, supplementary Figures S4-S8). As shown in Figure 3b, RMF application caused the cells having accumulated MNP@Gastrin to die at most amplitudes and frequencies. Interestingly, the maximum effect was observed with the low frequency 1 Hz and the low amplitude 40 mT, leading to the death of $17.9 \pm 3.0\%$ and $33.8 \pm 2.8\%$ of CAF1-CCK2 cells incubated with 8 or 16 $\mu\text{g Fe / ml}$ of MNP@Gastrin, respectively. This corresponds to a 3.0 ± 0.9 - and 5.6 ± 1.7 -fold increase in cell mortality ($p < 0.05$ and $P < 0.001$, Figure 3c, supplementary Figure S4). Similarly, the 1 Hz / 40 mT RMF increases the cell mortality of CAF2-CCK2 cells incubated with 8 or 16 $\mu\text{g Fe / ml}$ of MNP@Gastrin by 2.2 ± 0.4 - or 2.5 ± 0.2 -fold respectively (dead cells: 14.0 ± 1.7 or $16.5 \pm 0.4\%$ of CAF2-CCK2 cells incubated with 8 or 16 $\mu\text{g Fe / ml}$ of MNP@Gastrin vs $6.5 \pm 0.6 \%$ CAF2-CCK2 cells lacking nanoparticles, $p < 0.001$, Figure 3c).

These results show that experimental data of RMF impact on cell death are in good agreement with the simulations of the magnetic torques (Figure 2a). No significant effect was observed on CAF1-CCK2 and CAF2-CCK2 cells lacking MNP@Gastrin and exposed to RMF whatever the amplitude and frequency used, as well as on CAF1-CCK2 and CAF2-CCK2 cells incubated with MNP@Gastrin but not exposed to RMF.

To compare the impact of different types of magnetic field, we decided to focus on CAF1-CCK2 cell line, which presents a better response to RMF exposure. CAF1-CCK2 cells having accumulated MNP@Gastrin in their lysosome were exposed to a 40 mT static (SMF), a 40 mT / 1 Hz rotating (RMF) or a 40 mT / 1 Hz alternating (AMF) magnetic field. After magnetic field exposure, the cells were cultured under standard conditions for recovery. The impact of treatment was determined by counting cells labeled with FITC-tagged annexin V (AnnV) and/or propidium iodide (PI) by flow cytometry, 4 h after magnetic field exposure. As shown in Figures 3d, a significant increase of cell death is observed when MNP@Gastrin are submitted to a 40 mT / 1 Hz RMF or AMF, whereas no significant effect was observed upon a 40 mT SMF. Moreover, we demonstrate that RMF is the most efficient way to cause the death of cells having accumulated MNP@Gastrin. Indeed, RMF caused the death of $17.9 \pm 3.0\%$ and $33.8 \pm 2.8\%$ of CAF1-CCK2 cells incubated respectively with 8 or 16 $\mu\text{g Fe / ml}$ of MNP@Gastrin, whereas AMF killed only CAF1-CCK2 cells incubated with 16 $\mu\text{g Fe / ml}$ of MNP@Gastrin (dead cells: $14.7 \pm 0.3\%$, $p < 0.001$). Of note, SMF, AMF or RMF did not affect the viability of cells devoid of MNP@Gastrin.

Internalized MNP@Gastrin induce lysosome membrane permeabilization upon RMF

Since a study with conjugated IONP with antibodies targeting the lysosomal protein LAMP1 reported that a RMF (30 mT / 20 Hz) caused lysosome membrane permeabilization, we determined whether it was also the case with MNP@Gastrin nanoparticles [Zhang, 2014 #481]. CAF1-CCK2 cells were incubated with MNP@Gastrin for 24 h, washed to eliminate non-internalized nanoparticles and exposed to RMF for 2 h. The lysotracker uptake method was used to determine lysosome rupture. The lysotracker is a lysomotropic dye permeable to the cell membrane that fluoresces inside the lysosomes where it accumulates. Ruptured lysosomes do not contribute to lysotracker uptake resulting in a population of cells with reduced fluorescence (pale cells). The capability of RMF treatment to disrupt lysosome compartment was evaluated by assessing changes in lysotracker Green fluorescence by flow cytometry. As shown in Figure 4a and b, cells treated with MNP@Gastrin and exposed to RMF show a significant 5.1 ± 0.9 -fold increase of the number of pale cells ($26.0 \pm 4.5\%$, $p < 0.001$), as

compared to control cells lacking nanoparticles ($5.1 \pm 2.7\%$). No significant effect was observed on CAF1-CCK2 cells lacking MNP@Gastrin and exposed to RMF ($5.0 \pm 2.3\%$ of pale cells), as well as on CAF1-CCK2 cells incubated with MNP@Gastrin but not exposed to RMF (11.1 ± 3.7 of pale cells). These results indicated that RMF exposure associated with lysosomal MNP@Gastrin induce the permeabilization of lysosomes containing MNP@Gastrin.

CAFs death induced by MNP@Gastrin torque is dependent on lysosomal CathB activity

According to current knowledge, lysosome membrane permeabilization is followed by the leakage of lysosomal enzymes including Cathepsin family enzyme leading eventually to cell death. Herein, we investigated the type of Cathepsin(s) that could be involved in cell death upon RMF exposure. RMF experiments were performed in presence or in absence of the selective inhibitor of CathB CA-074-Me or of Pepstatin A inhibiting aspartate Cathepsins including CathD. After RMF exposure, the cells were cultured under standard conditions for recovery. The impact of treatment was determined by counting cells labeled with FITC-tagged annexin V (AnnV) and/or propidium iodure (PI) by flow cytometry, 4 h after RMF exposure (Figure 5a-b). As shown in figure 5a, the inhibitor CA-074-Me prevented cell death following RMF with MNP@Gastrin exposure (dead cells: $7.6 \pm 0.7\%$ vs $27.5 \pm 1.0\%$ in MNP@Gastrin-loaded CAF1-CCK2 cells treated in presence or in absence of CA-074 Me). In contrast, the Pepstatin A inhibitor do not impact cell death induced by RMF with MNP@Gastrin, reaching $24.4 \pm 3.7\%$ comparatively $22.3 \pm 2.0\%$ in MNP@Gastrin-loaded CAF1-CCK2 cells treated in presence or in absence of Pepstatin A respectively (Figure 5b). These results indicate that CAFs death induced by RMF and MNP@Gastrin association is dependent on CathB activity.

a

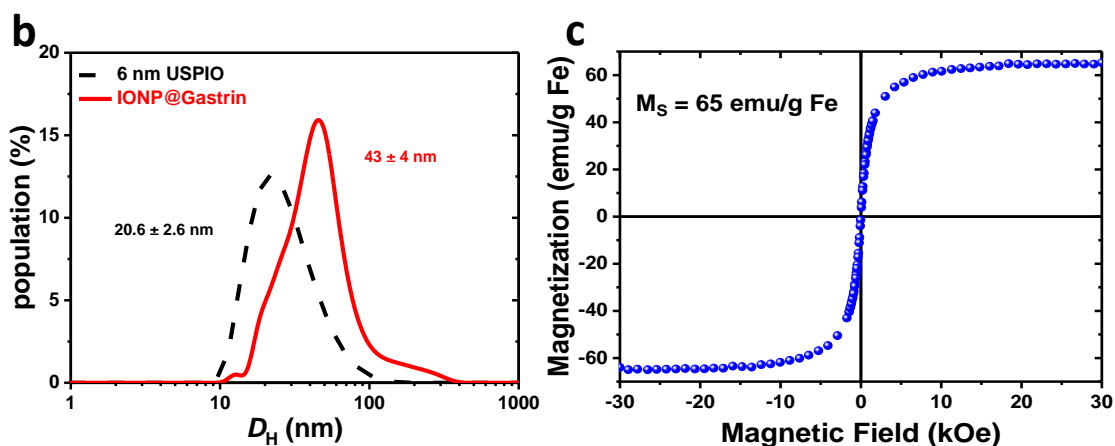
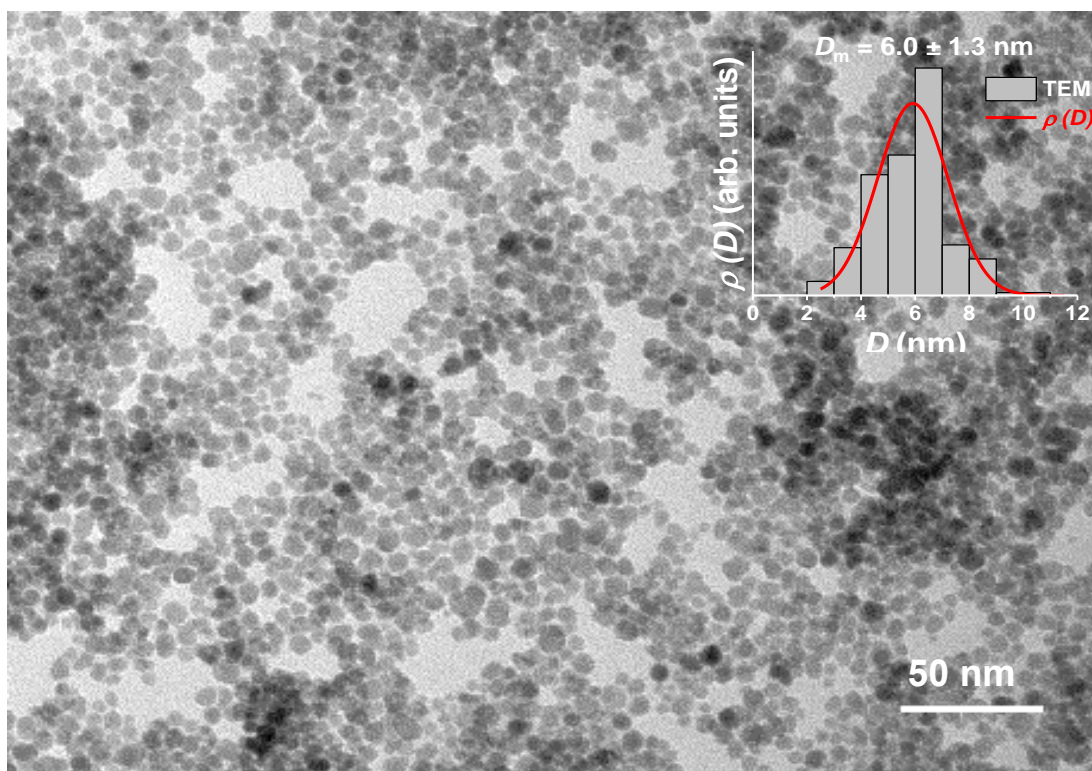


Figure 1: a) TEM picture of NPs accumulated in a lysosome ; inset) Particle size distribution deduced from TEM observations (bars), fit of the size distribution (line) ; b) Hydrodynamic particle size distribution before (dashed) and after coupling(full) ; c) Hysteresis loop of the NPs measured at 300 K.

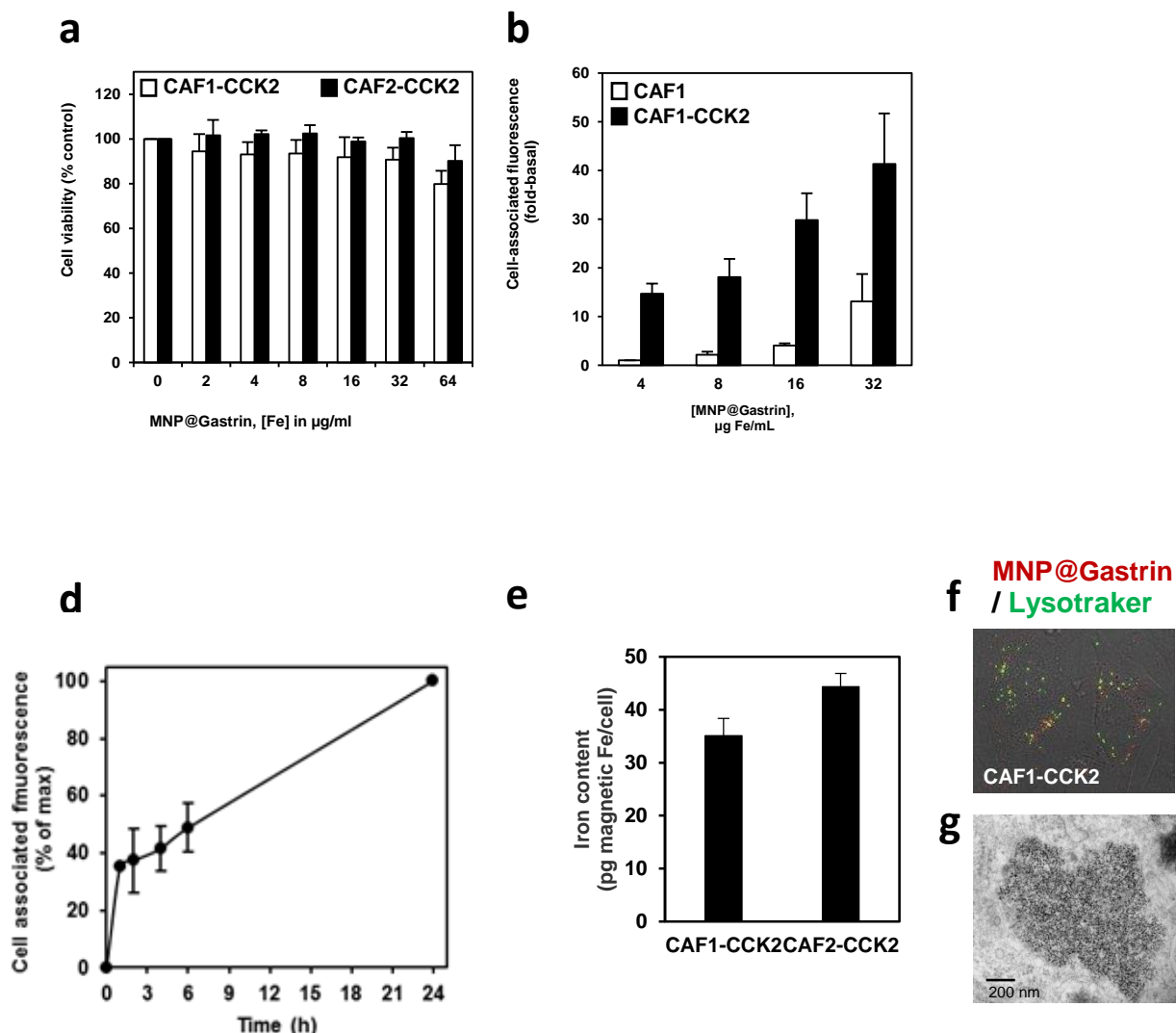


Figure 2: MNP@Gastrin are internalized specifically into CAFs expressing RCK2 within a few hours while generating little cytotoxic side effects. (a) MTT assay evaluating CAF1-CCK2 and CAF2-CCK2 viability with MNP@Gastrin (b) Specific binding of MNP@Gastrin for CAF1 expressing or not expressing the CCK2 receptor (d) Quantification of Gastrin-MNPs internalization into CAF1-CCK2R at 2, 4, 6 and 24h incubation (e) Iron content attesting to the amount of MNP@Gastrin into CAF1-CCK2R and CAF2-CCK2R (f) Confocal microscopy of MNP@Gastrin sublocalization into CAF1-CCK2 and CAF2-CCK2 lysosomes (g) TEM of MNP@Gastrin sublocalization into CAF1-CCK2 lysosomes

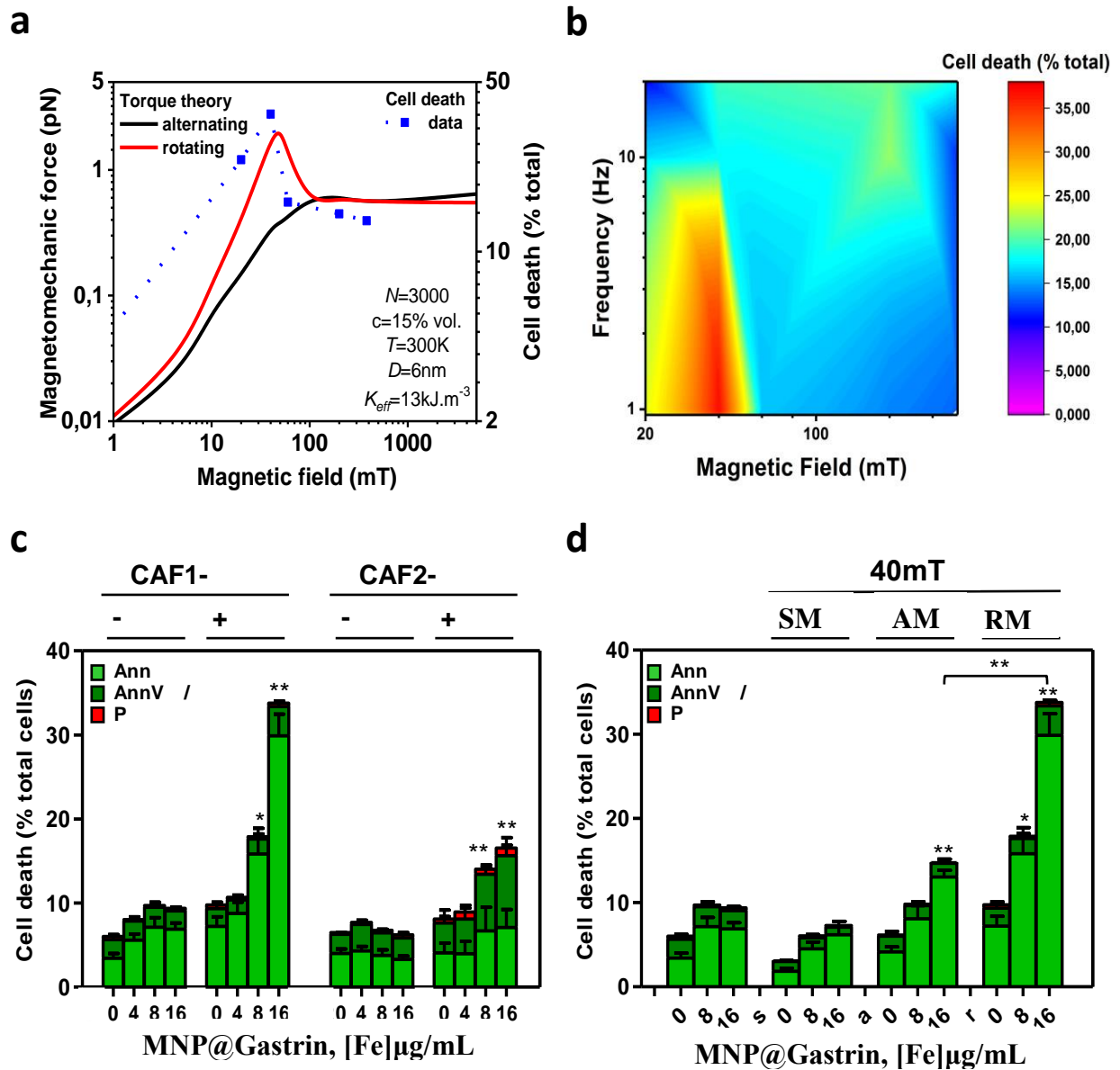


Figure 3: *MNP@Gastrin generate a torque inducing CAFs death upon low frequency rotating magnetic field. (a) Theoretical force generated by an assembly of $N = 3000$ interacting superparamagnetic particles under AMF or RMF (line), compared to the evolution of CAF1-CCK2R death (scatter) after RMF exposure experimentally obtained, for different amplitude of magnetic field assembly. The anisotropy axes are randomly oriented. Cell death rate at 20, 40, 60, 200, and 380 mT, dashed line is a guide for the eyes; (b) Quantification of CAF1-CCK2R cell death labeled with Annexin V/PI according to RMF amplitude (mT) and frequency (Hz) for [MNP@Gastrin]= 16 $\mu\text{g/mL}$ (c) Quantification of CAF1-CCK2 cell death labeled with Annexin V/PI without magnetic field, upon static magnetic field (SMF), alternating magnetic field (AMF; 1 Hz, 40 mT) and rotating magnetic field (RMF; 1 Hz, 40 mT) for 0, 4, 8 and 16 $\mu\text{g/mL}$ MNP@Gastrin (d) Quantification of CAF2-CCK2 cell death labeled with Annexin V/PI without magnetic field, upon static magnetic field (SMF), alternating magnetic field (AMF; 1 Hz, 40 mT) and rotating magnetic field (RMF; 1 Hz, 40 mT) for 0, 4, 8 and 16 $\mu\text{g/mL}$ MNP@Gastrin.*

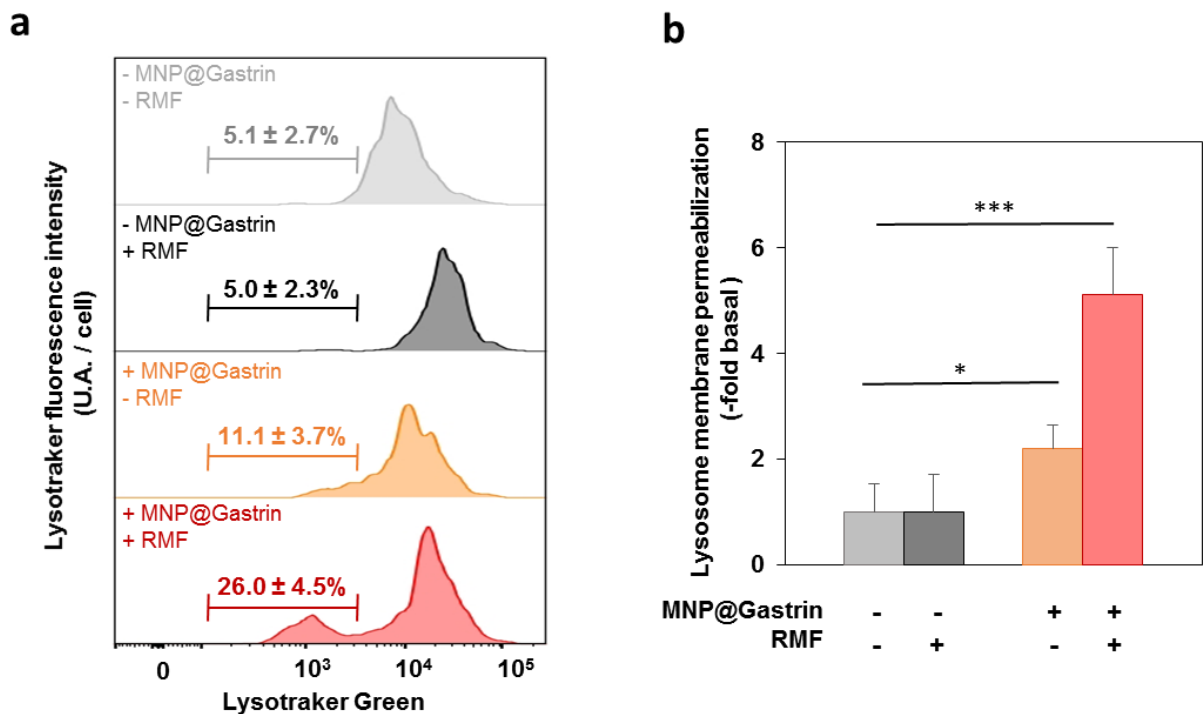


Figure 4: The torque generated by MNP@Gastrin (16 $\mu\text{g/mL}$) internalized into lysosomes at [1 Hz, 40 mT] RMF beget a lysosomal membrane permeabilization (LMP) into CAF1-CCK2. (a) Fluorescence of LysoTracker Green determined by flow cytometry for cells without nanoparticles which underwent RMF (black) or not (grey), and for those with nanoparticles which underwent RMF (red) or not (orange). Bars represent the region where cells lose LysoTracker Green fluorescence (mean \pm SEM of total cells). Peak diagrams are from one representative independent experiment. (b) Relative fluorescence of LysoTracker Green determined by Flow cytometry for cells without nanoparticles which underwent RMF (black) or not (grey), and for those with nanoparticles which underwent [1Hz, 40mT] RMF (red) or not (orange) (c) Confocal microscopy illustrating the decrease of LysoTracker Green fluorescence with MNPs@Gastrin and RMF compared to control. (d) Quantification of relative lysotracker fluorescence per cell observed with confocal microscopy.

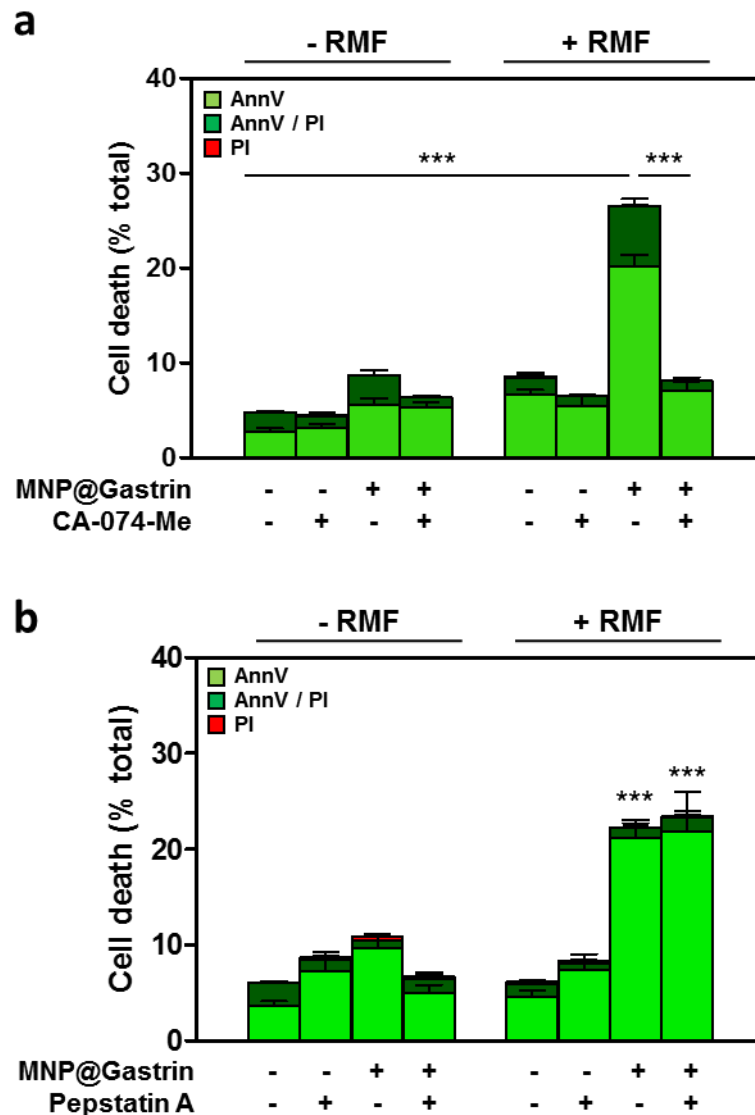


Figure 5: Cathepsin B activity is necessary to CAF1-CCK2R death occurring after [1 Hz, 40 mT] RMF exposure with MNP@Gastrin (16 µg/mL). (a) Annexin V/PI cell death labeling in flow cytometry with a cathepsin B specific inhibitor (CA-074-Me) (b) Annexin V/PI cell death labeling in flow cytometry with a cathepsin D specific inhibitor (Pepstatine A).

1. Hilger, I.; Kaiser, W. A., Iron oxide-based nanostructures for MRI and magnetic hyperthermia. *Nanomedicine (Lond)* **2012**, 7 (9), 1443-59.

2. (a) Wang, Y. X.; Hussain, S. M.; Krestin, G. P., Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *European radiology* **2001**, *11* (11), 2319-31; (b) Schwenk, M. H., Ferumoxytol: a new intravenous iron preparation for the treatment of iron deficiency anemia in patients with chronic kidney disease. *Pharmacotherapy* **2010**, *30* (1), 70-9.
3. Hilger, I., In vivo applications of magnetic nanoparticle hyperthermia. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* **2013**, *29* (8), 828-34.
4. Guardia, P.; Di Corato, R.; Lartigue, L.; Wilhelm, C.; Espinosa, A.; Garcia-Hernandez, M.; Gazeau, F.; Manna, L.; Pellegrino, T., Water-soluble iron oxide nanocubes with high values of specific absorption rate for cancer cell hyperthermia treatment. *ACS nano* **2012**, *6* (4), 3080-91.
5. (a) Perigo, E. A.; Hemery, G.; Sandre, O.; Ortega, D.; Garaio, E.; Plazaola, F.; Teran, F. J., Fundamentals and advances in magnetic hyperthermia. *Appl Phys Rev* **2015**, *2* (4); (b) Clerc, P.; Jeanjean, P.; Hallalli, N.; Gougeon, M.; Pipy, B.; Carrey, J.; Fourmy, D.; Gigoux, V., Targeted Magnetic Intra-Lysosomal Hyperthermia produces lysosomal reactive oxygen species and causes Caspase-1 dependent cell death. *Journal of Controlled Release* **2018**, *270*, 120-134; (c) Creixell, M.; Bohorquez, A. C.; Torres-Lugo, M.; Rinaldi, C., EGFR-targeted magnetic nanoparticle heaters kill cancer cells without a perceptible temperature rise. *ACS nano* **2011**, *5* (9), 7124-9; (d) Domenech, M.; Marrero-Berrios, I.; Torres-Lugo, M.; Rinaldi, C., Lysosomal membrane permeabilization by targeted magnetic nanoparticles in alternating magnetic fields. *ACS nano* **2013**, *7* (6), 5091-101; (e) Sanchez, C.; El Hajj Diab, D.; Connord, V.; Clerc, P.; Meunier, E.; Pipy, B.; Payre, B.; Tan, R. P.; Gougeon, M.; Carrey, J.; Gigoux, V.; Fourmy, D., Targeting a G-protein-coupled receptor overexpressed in endocrine tumors by magnetic nanoparticles to induce cell death. *ACS nano* **2014**, *8* (2), 1350-63.
6. Carregal-Romero, S.; Guardia, P.; Yu, X.; Hartmann, R.; Pellegrino, T.; Parak, W. J., Magnetically triggered release of molecular cargo from iron oxide nanoparticle loaded microcapsules. *Nanoscale* **2015**, *7* (2), 570-576.
7. Huang, H.; Delikanli, S.; Zeng, H.; Ferkey, D. M.; Pralle, A., Remote control of ion channels and neurons through magnetic-field heating of nanoparticles. *Nature nanotechnology* **2010**, *5* (8), 602-6.
8. Yamaguchi, M.; Ito, A.; Ono, A.; Kawabe, Y.; Kamihira, M., Heat-Inducible Gene Expression System by Applying Alternating Magnetic Field to Magnetic Nanoparticles. *Acs Synth Biol* **2014**, *3* (5), 273-279.
9. (a) Kolosnjaj-Tabi, J.; Di Corato, R.; Lartigue, L.; Marangon, I.; Guardia, P.; Silva, A. K. A.; Luciani, N.; Clement, O.; Flaud, P.; Singh, J. V.; Decuzzi, P.; Pellegrino, T.; Wilhelm, C.; Gazeau, F., Heat-Generating Iron Oxide Nanocubes: Subtle "Destructurators" of the Tumoral Microenvironment. *ACS nano* **2014**, *8* (5), 4268-4283; (b) Kolosnjaj-Tabi, J.; Marangon, I.; Nicolas-Boluda, A.; Silva, A. K. A.; Gazeau, F., Nanoparticle-based hyperthermia, a local treatment modulating the tumor extracellular matrix. *Pharmacol Res* **2017**, *126*, 123-137.
10. Dutz, S.; Hergt, R., Magnetic particle hyperthermia--a promising tumour therapy? *Nanotechnology* **2014**, *25* (45), 452001.
11. (a) Johannsen, M.; Thiesen, B.; Wust, P.; Jordan, A., Magnetic nanoparticle hyperthermia for prostate cancer. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* **2010**, *26* (8), 790-5; (b) Maier-Hauff, K.; Ulrich, F.; Nestler, D.; Niehoff, H.; Wust, P.; Thiesen, B.; Orawa, H.; Budach, V.; Jordan, A., Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *Journal of neuro-oncology* **2011**, *103* (2), 317-24.
12. (a) Mannix, R. J.; Kumar, S.; Cassiola, F.; Montoya-Zavala, M.; Feinstein, E.; Prentiss, M.; Ingber, D. E., Nanomagnetic actuation of receptor-mediated signal transduction. *Nature nanotechnology* **2008**, *3* (1), 36-40; (b) Tay, A.; Kunze, A.; Murray, C.; Di Carlo, D., Induction of Calcium Influx in Cortical Neural Networks by Nanomagnetic Forces. *ACS nano* **2016**, *10* (2), 2331-2341; (c) Kilinc, D.; Dennis, C. L.; Lee, G. U., Bio-Nano-Magnetic Materials for Localized Mechanochemical Stimulation of Cell Growth and Death. *Advanced Materials* **2016**, *28* (27), 5672-5680; (d) Forbes, Z. G.; Yellen, B. B.; Halverson, D. S.; Fridman, G.; Barbee, K. A.; Friedman, G., Validation of high gradient magnetic field based drug

delivery to magnetizable implants under flow. *Ieee T Bio-Med Eng* **2008**, *55* (2), 643-649; (e) Mizuki, T.; Watanabe, N.; Nagaoka, Y.; Fukushima, T.; Morimoto, H.; Usami, R.; Maekawa, T., Activity of an enzyme immobilized on superparamagnetic particles in a rotational magnetic field. *Biochem Biophys Res Commun* **2010**, *393* (4), 779-82.

13. (a) Kim, D. H.; Rozhkova, E. A.; Ulasov, I. V.; Bader, S. D.; Rajh, T.; Lesniak, M. S.; Novosad, V., Biofunctionalized magnetic-vortex microdiscs for targeted cancer-cell destruction. *Nat Mater* **2010**, *9* (2), 165-171; (b) Contreras, M. F.; Sougrat, R.; Zaher, A.; Ravasi, T.; Kosel, J., Non-chemotoxic induction of cancer cell death using magnetic nanowires. *Int J Nanomedicine* **2015**, *10*, 2141-53; (c) Chen, Y.; Han, P.; Wu, Y.; Zhang, Z.; Yue, Y.; Li, W.; Chu, M., Hedgehog-Like Gold-Coated Magnetic Microspheres that Strongly Inhibit Tumor Growth through Magnetomechanical Force and Photothermal Effects. *Small* **2018**, *14* (45), e1802799; (d) Cheng, Y.; Muroski, M. E.; Petit, D.; Mansell, R.; Vemulkar, T.; Morshed, R. A.; Han, Y.; Balyasnikova, I. V.; Horbinski, C. M.; Huang, X.; Zhang, L.; Cowburn, R. P.; Lesniak, M. S., Rotating magnetic field induced oscillation of magnetic particles for in vivo mechanical destruction of malignant glioma. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2016**, *223*, 75-84.

14. (a) Cheng, D.; Li, X.; Zhang, G.; Shi, H., Morphological effect of oscillating magnetic nanoparticles in killing tumor cells. *Nanoscale research letters* **2014**, *9* (1), 195; (b) Zhang, E. M.; Kircher, M. F.; Koch, M.; Eliasson, L.; Goldberg, S. N.; Renstrom, E., Dynamic Magnetic Fields Remote-Control Apoptosis via Nanoparticle Rotation. *ACS nano* **2014**, *8* (4), 3192-3201.

15. Erkan, M., Understanding the stroma of pancreatic cancer: co-evolution of the microenvironment with epithelial carcinogenesis. *The Journal of pathology* **2013**, *231* (1), 4-7.

16. (a) Hwang, R. F.; Moore, T.; Arumugam, T.; Ramachandran, V.; Amos, K. D.; Rivera, A.; Ji, B.; Evans, D. B.; Logsdon, C. D., Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression. *Cancer research* **2008**, *68* (3), 918-26; (b) Duluc, C.; Moatassim-Billah, S.; Chalabi-Dchar, M.; Perraud, A.; Samain, R.; Breibach, F.; Gayral, M.; Cordelier, P.; Delisle, M. B.; Bousquet-Dubouch, M. P.; Tomasini, R.; Schmid, H.; Mathonnet, M.; Pyronnet, S.; Martineau, Y.; Bousquet, C., Pharmacological targeting of the protein synthesis mTOR/4E-BP1 pathway in cancer-associated fibroblasts abrogates pancreatic tumour chemoresistance. *EMBO molecular medicine* **2015**, *7* (6), 735-53.

17. Zhou, Z. H.; Ji, C. D.; Xiao, H. L.; Zhao, H. B.; Cui, Y. H.; Bian, X. W., Reorganized Collagen in the Tumor Microenvironment of Gastric Cancer and Its Association with Prognosis. *Journal of Cancer* **2017**, *8* (8), 1466-1476.

18. Richard, S.; Eder, V.; Caputo, G.; Journe, C.; Ou, P.; Bolley, J.; Louedec, L.; Guenin, E.; Motte, L.; Pinna, N.; Lalatonne, Y., USPIO size control through microwave nonaqueous sol-gel method for neoangiogenesis T-2 MRI contrast agent. *Nanomedicine-Uk* **2016**, *11* (21), 2769-2779.

19. (a) Berna, M. J.; Seiz, O.; Nast, J. F.; Bente, D.; Blaker, M.; Koch, J.; Lohse, A. W.; Pace, A., CCK1 and CCK2 receptors are expressed on pancreatic stellate cells and induce collagen production. *The Journal of biological chemistry* **2010**, *285* (50), 38905-14; (b) Smith, J. P.; Cooper, T. K.; McGovern, C. O.; Gilius, E. L.; Zhong, Q.; Liao, J.; Molinolo, A. A.; Gutkind, J. S.; Matterns, G. L., Cholecystokinin receptor antagonist halts progression of pancreatic cancer precursor lesions and fibrosis in mice. *Pancreas* **2014**, *43* (7), 1050-9.

SUPPLEMENTARY DATA

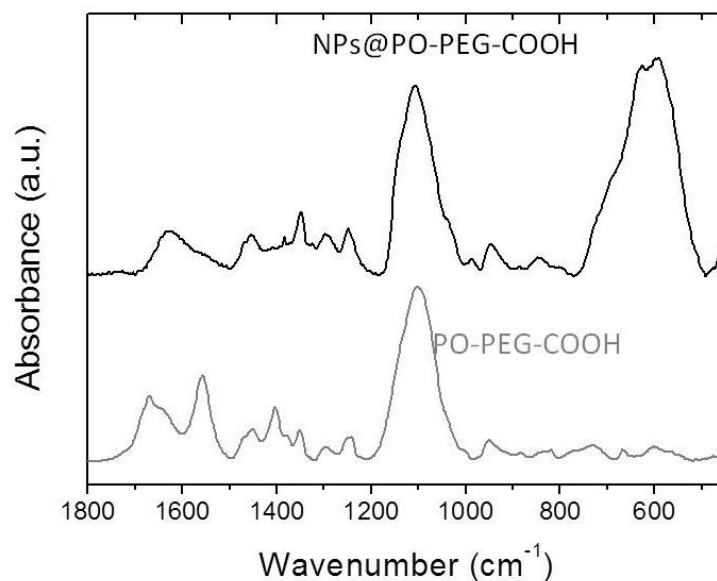


Figure S1: Evaluation of the average number of PO-PEG-COOH per nanoparticle was evaluated, using total X-ray fluorescence (TXRF) analysis

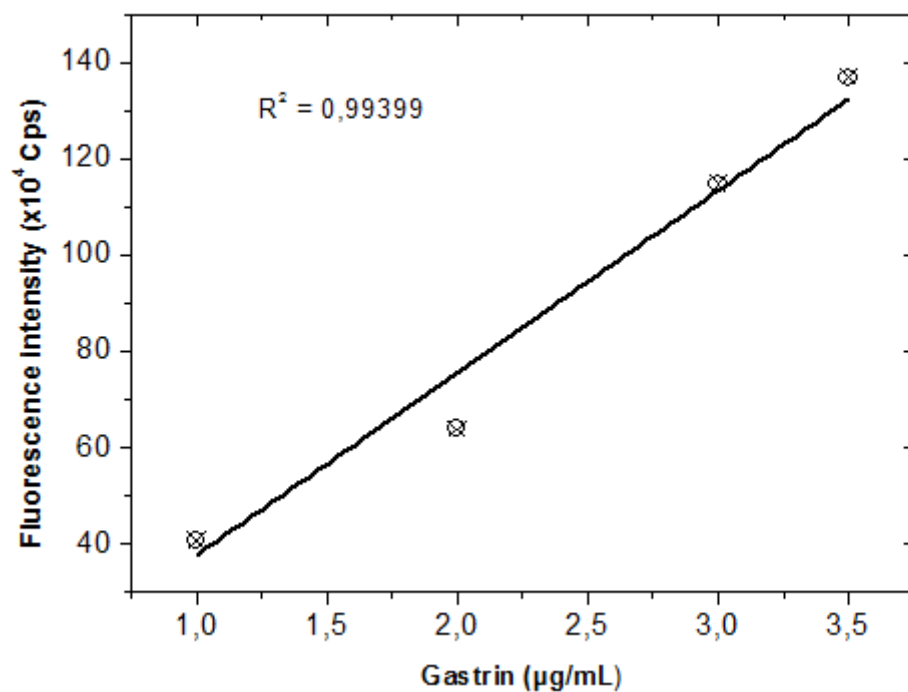


Figure S2: Calibration curve obtained by the OPA method to calculate the average number of gastrin derivatives on MNP@Gastrin

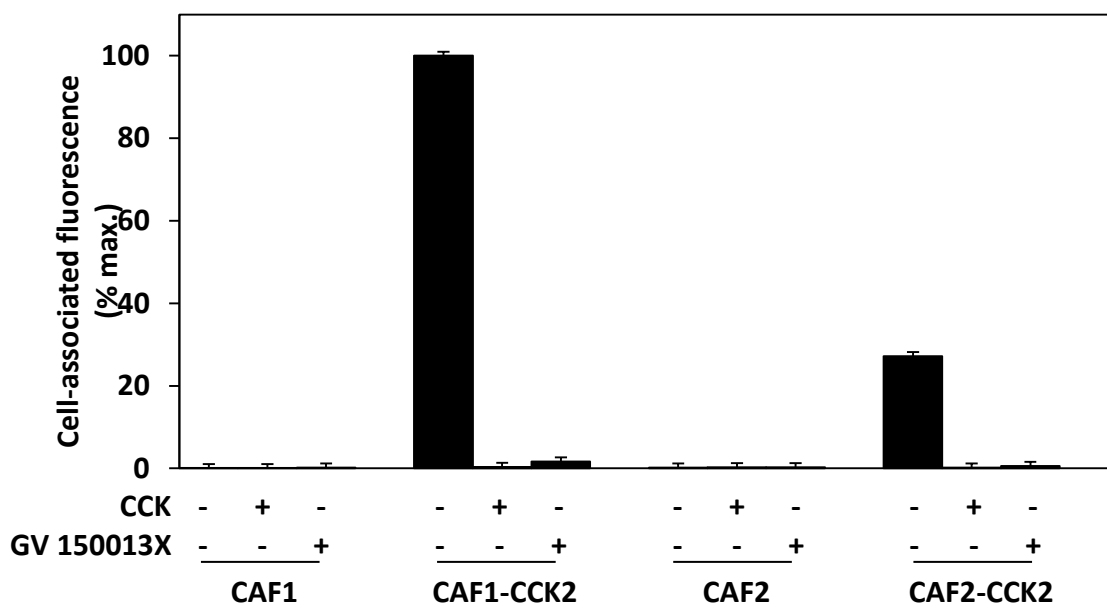


Figure S3: CCK2R expression in CAF1, CAF1-CCK2R, CAF2 and CAF2-CCK2R determined with the binding of CCK-DY647 ($10^{-8}M$), a fluorescent agonist of CCKR. We used GV150013X, a specific antagonist of CCK2R put in excess ($10^{-5}M$), in order to check CCK-DY647 binding on CCK2R.

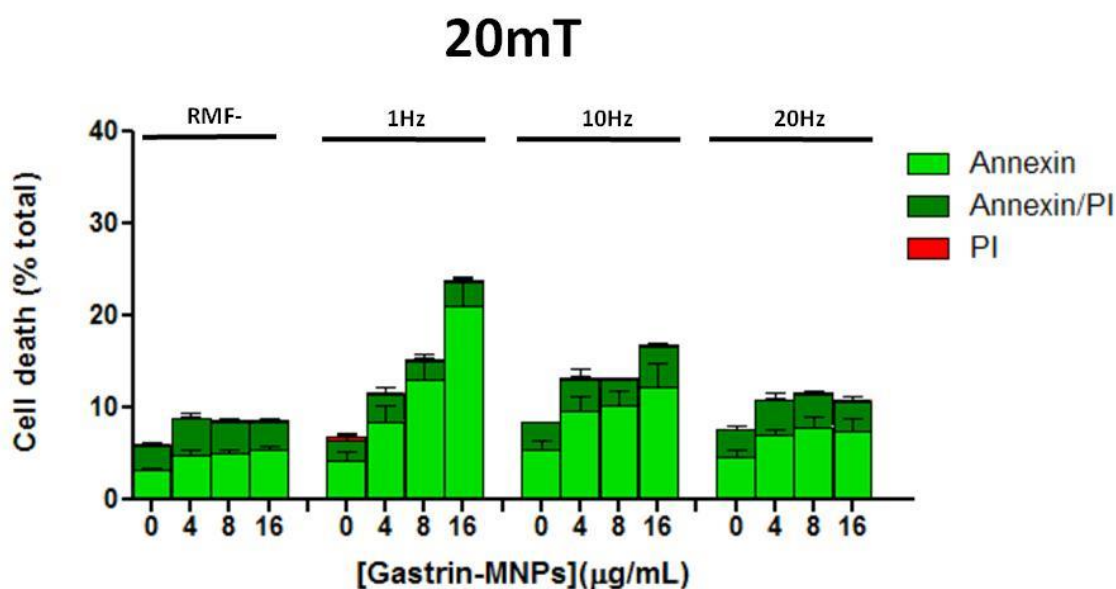


Figure S4- Quantification of CAF1-CCK2 cell death labeled with AnnexinV/PI without magnetic field, with 1, 10 or 20Hz rotating magnetic field (RMF; 20mT) for 0, 4, 8 and 16 $\mu g/mL$ MNP@Gastrin

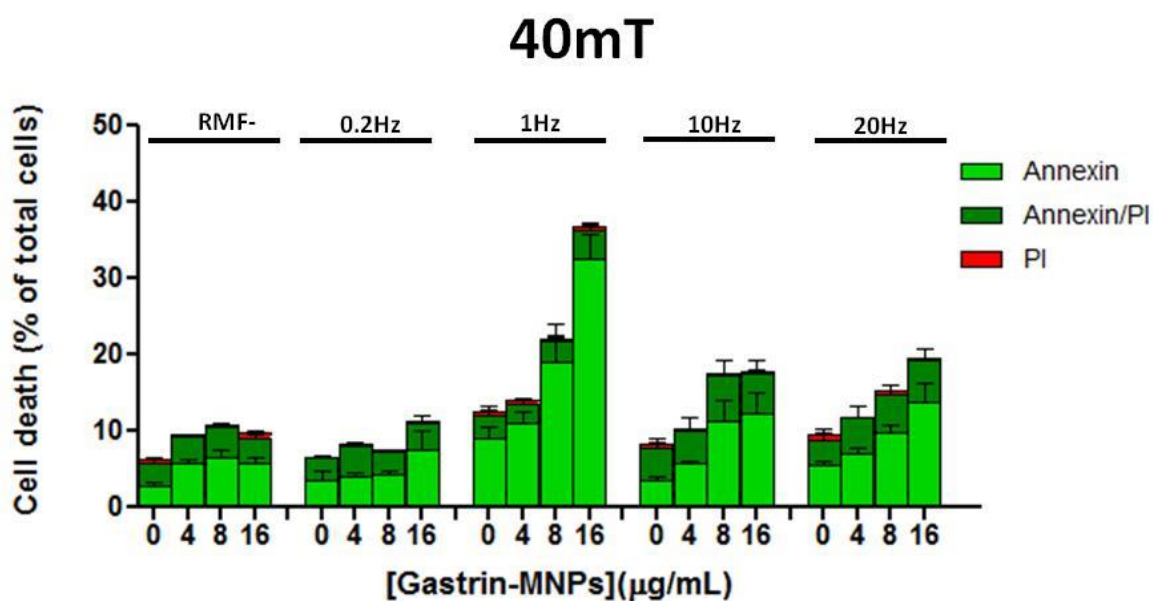


Figure S5- Quantification of CAF1-CCK2 cell death labeled with AnnexinV/PI without magnetic field, with 1, 10 or 20Hz rotating magnetic field (RMF; 40mT) for 0, 4, 8 and 16 μg/mL MNP@Gastrin

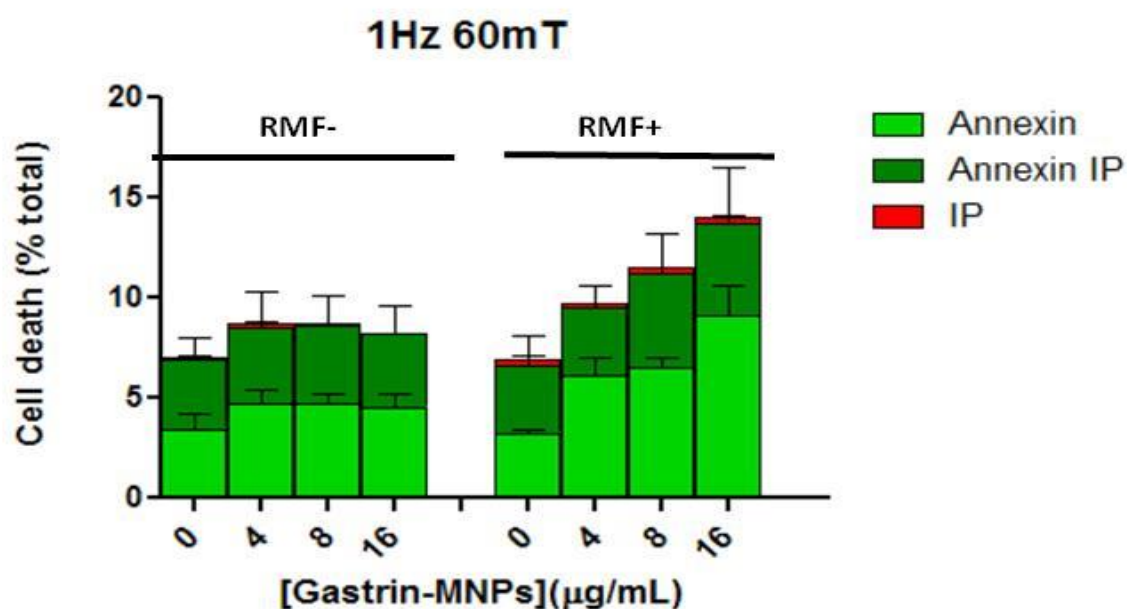


Figure S6- Quantification of CAF1-CCK2 cell death labeled with AnnexinV/PI without magnetic field, with 1, 10 or 20Hz rotating magnetic field (RMF; 60mT) for 0, 4, 8 and 16 μg/mL MNP@Gastrin

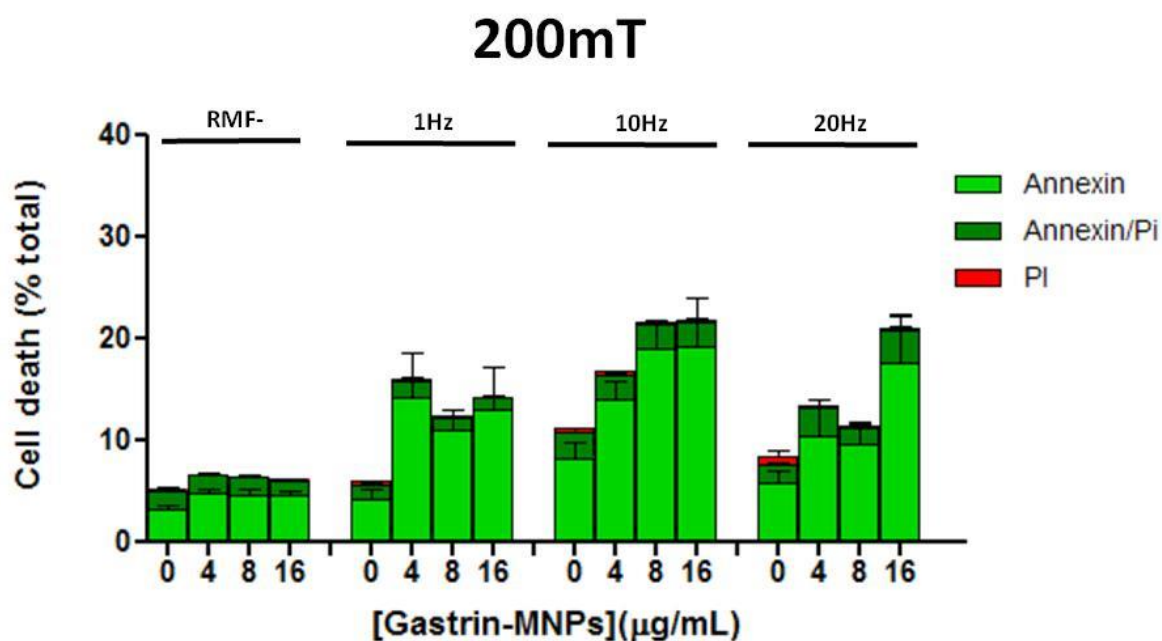


Figure S7- Quantification of CAF1-CCK2 cell death labeled with AnnexinV/PI without magnetic field, with 1, 10 or 20Hz rotating magnetic field (RMF; 200mT) for 0, 4, 8 and 16 µg/mL MNP@Gastrin

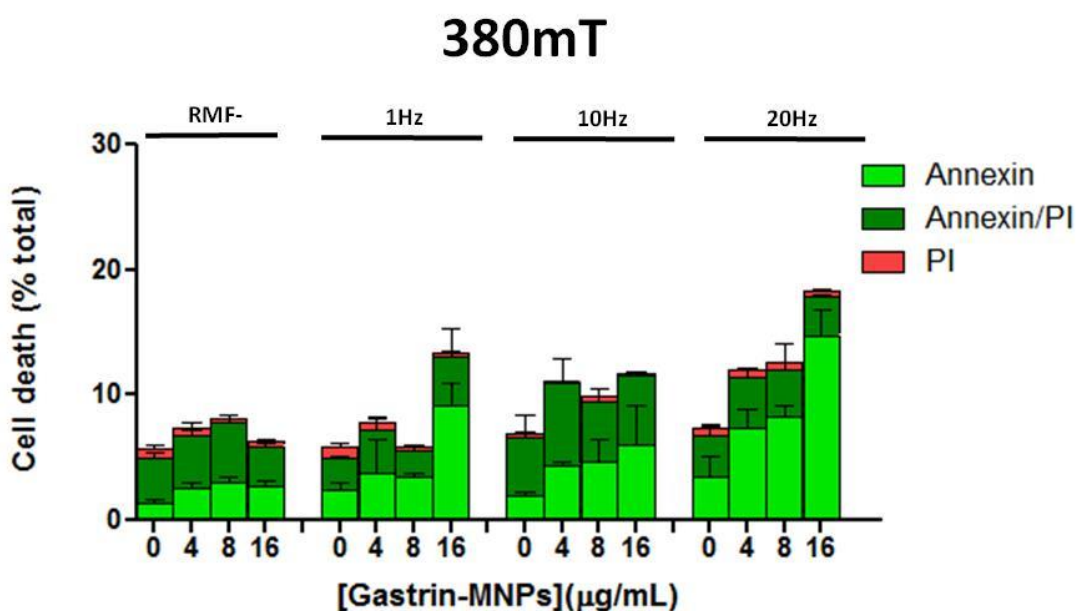


Figure S8- Quantification of CAF1-CCK2 cell death labeled with AnnexinV/PI without magnetic field, with 1, 10 or 20Hz rotating magnetic field (RMF; 380mT) for 0, 4, 8 and 16 µg/mL MNP@Gastrin

DISCUSSION

Nous avons démontré que les CMEM rotatifs induisent une plus forte mort cellulaire des CAFs comparativement aux CMEM alternatifs et statiques. D'autres auteurs ont obtenu le même résultat sur les cellules cancéreuses [287], [290].

Dans cette étude, nous avons montré qu'il est possible d'induire la mort cellulaire des CAFs en appliquant des forces mécaniques grâce à la combinaison de NPM et CMEM. D'autres auteurs se sont quant à eux intéressés à la mort de fibroblastes sains. Fung et al. [312] ont travaillé sur des fibroblastes 3T3 ayant internalisé des microfils de 200nm de diamètre et de 4µm de longueur. Après exposition à un CMEM rotatif (1Hz, 240mT), la viabilité cellulaire a diminué de 89%. Seongbom Jeon et al. [238] ont testé un CMEM statique (100mT) sur des fibroblastes NIH3T3 ayant internalisé des NPMs de diamètre de 10nm non enrobées. A une concentration en NPM de 16µg/mL et après 24h d'exposition au CMEM, ils ont observé une diminution de 30% de la viabilité des fibroblastes [238]. Les premiers ont utilisé des particules magnétiques de dimensions bien supérieures à celles que nous utilisons, ce qui explique certainement l'importante diminution de viabilité obtenue. Les seconds obtiennent des résultats du même ordre de grandeur que ceux que nous avons obtenus. Compte tenu du fait que les CMEM rotatifs semblent avoir une plus grande efficacité que les CMEM statiques, il est possible que le temps d'exposition au CMEM statique, de 24h, ait permis au CMEM statique d'obtenir un effet similaire.

Nous avons mis en évidence que la combinaison de fréquence 1Hz et de l'amplitude 40mT induisait la plus forte augmentation de mort cellulaire chez les CAFs.

D'après la littérature sur les CMEM rotatifs, les auteurs démontrent que l'augmentation de l'amplitude augmente les effets délétères sur les cellules cancéreuses [287], [296]. Les amplitudes testées ne vont pas au-delà de 200mT. Nos résultats sont en contradiction avec ces travaux, alors que beaucoup de nos paramètres d'études sont similaires. Ceci peut s'expliquer par le fait que les auteurs utilisent des NPMs d'oxyde de fer de dimensions supérieures à celles permettant d'atteindre un état superparamagnétique, et que celles-ci n'ont probablement pas la même anisotropie que les NPM que nous avons utilisées. En effet l'amplitude optimale pour des NPM superparamagnétiques ou non varie en fonction de l'anisotropie de ces NPM. Cette amplitude varie également en fonction de la taille pour des NPM non superparamagnétiques. Les NPM utilisées par ces auteurs ont certainement des anisotropies plus élevées que celles que nous avons utilisées, et l'amplitude induisant un couple maximal se situe probablement au-delà de 200mT.

Seules deux études ont fait varier la fréquence de CMEM rotatifs, et ne permettent pas de dégager une fréquence considérée comme optimale ; l'une des publications concluant que la

fréquence 1Hz permettait une diminution de la survie cellulaire (comparativement à 3 et 5Hz), tandis que la deuxième obtenait la plus forte diminution de survie cellulaire à 50Hz (sur une gamme de fréquence allant de 20 à 100Hz) [290], [305]. Il se peut que l'effet délétère de la fréquence soit dépendant du type de cellules ciblé, ce qui expliquerait ces différences. En effet, la publication de Subramanian et al. compare deux types cellulaires et montre que la diminution de viabilité n'est pas la même pour des fréquences identiques [304].

Dans les publications étudiant les CMEM, les forces appliquées par des NPMs internalisées dans les lysosomes induisent des perturbations cellulaires, comme la rupture de la membrane plasmique [300], [301], la perméabilisation des lysosomes [301], ou encore la rupture du cytosquelette [282]. Différents mécanismes de mort cellulaire impliqués ont été décrits, tels que la nécrose [301], l'apoptose [286], [301], ou encore l'autophagie [286].

A l'aide d'un marquage à l'AnnexinV/PI nous avons déterminé que 4h après application du CMEM rotatif, le marquage AnnexinV et le double marquage AnnexinV/PI étaient fortement augmentés, représentant la grande majorité des cellules mortes comparativement au marquage PI seul. Ainsi, l'application du CMEM rotatif ne semble pas induire de mort nécrotique, mais plutôt une mort cellulaire programmée.

Nous avons également montré que les forces exercées par les NPMs engendrent une perméabilisation de la membrane des lysosomes, ce qui permet la libération dans le cytoplasme des cathepsines B participant au déclenchement de la mort des CAFs.

Shen et al. [301] ont montré la perméabilisation des lysosomes d'une lignée de glioblastome suite à l'application d'un CMEM rotatif (40mT, 15Hz, 30minutes) en présence de NPM de 62nm (cube, 100 µg/mL) ciblant le récepteur à l'EGF. Ils ont également réalisé un marquage à l'AnnexinV/PI, montrant 22,3% des cellules marquées positivement. Ils ont également observé une perméabilisation lysosomale. Ces résultats ainsi que les paramètres de l'expérience se rapprochent grandement des résultats que nous avons obtenus.

La force exercée par les NPM de nos expériences a été calculée par simulation physique, et est inférieure aux 100pN nécessaires à la rupture de membranes [273], ce qui pourrait indiquer qu'un autre mécanisme que la rupture directe de la membrane lysosomale par les NPM@Gastrine est responsable de la LMP. Ce processus pourrait notamment impliquer une catalyse de réaction chimique dans le lysosome conduisant à la LMP. En effet, les forces mécaniques peuvent provoquer le dépliement de protéines, enclencher le mouvement de moteur moléculaires, ou provoquer des réactions enzymatiques (nécessitant de quelques piconewton à

plusieurs centaines selon les phénomènes) [308], [313]–[316]. La catalyse d'une réaction chimique a notamment été décrite dans l'hyperthermie magnétique. En effet, les NPMs peuvent être utilisées en combinaison avec des champs magnétiques induisant une élévation de température, causant une hyperthermie magnétique. Cette technique a été largement étudiée dans le cadre de traitement anticancéreux. Notre équipe a montré que l'hyperthermie magnétique régule positivement la catalyse de la production de ROS par le biais de la réaction de Fenton au sein de lysosomes, entraînant la LMP et la mort des cellules [317].

Cependant l'hypothèse d'une perméabilisation mécanique n'est pas à exclure pour autant, la force théoriquement exercée par les NPM@Gastrine n'étant pas nécessaire pour conclure. En effet, un matériau soumis à une force répétée un grand nombre de fois subit des détériorations répétées au cours du temps, pouvant mener à sa rupture, même s'il avait été conçu pour supporter une force plus intense appliquée en une seule fois. C'est ce que l'on appelle la fatigue d'un matériau. Il est possible que ce principe puisse s'appliquer aux cellules vivantes, comme le montre une publication sur des globules rouges [318]. Néanmoins il s'agit d'un champ d'étude encore largement inexploré. Ainsi, les forces appliquées par les NPM@Gastrine étant répétées un grand nombre de fois pendant l'application du CMEM, l'intensité de ces forces est peut être suffisante pour induire la rupture des membranes lysosomales.

Dans le présent article, nous avons montré que les forces exercées par les NPM magnétiques induisent une LMP et que la mort lysosomale est dépendante de la Cathepsine B. Les mêmes acteurs ont été identifiés dans le mécanisme de mort cellulaire induit par l'hyperthermie magnétique [317]. Il serait donc intéressant de compléter les expériences actuelles afin de mettre en évidence une potentielle voie de mort cellulaire commune entre l'hyperthermie magnétique et les CMEM. Pour cela, l'étude de l'activation de la caspase 1 serait essentielle, car il a été prouvé qu'elle est impliquée dans le processus de mort cellulaire de l'hyperthermie magnétique.

Egalement, une LMP partielle est connue pour entraîner une mort apoptotique activant la caspase 3 [319], [320], il s'agit donc d'une autre hypothèse à vérifier.

Pour conclure, la littérature montre que les forces mécaniques exercées par les NPM en présence de CMEM sont délétères pour les cellules cancéreuses. Nous avons prouvé que ces mêmes forces mécaniques peuvent également induire la mort des CAFs. Les NPMs étant des

outils modulables, il serait possible d'utiliser la combinaison de CMEM et de NPM pour mettre au point de nouvelles thérapies basées sur l'application de forces mécaniques ciblant à la fois les CAFs du microenvironnement et les cellules tumorales.

RESULTATS COMPLEMENTAIRES

Implication des caspases 1 et 3 dans la mort cellulaire induite par les forces mécaniques exercées par les NPM@Gastrine

Un marquage AnnexinV et AnnexinV/PI des CAFs ayant été mis en évidence 4h après application du CMEM rotatif, les forces mécaniques exercées par les NPMs semblent induire une mort cellulaire programmée. Deux voies de mort cellulaires programmées principales sont connues pour entraîner un marquage positif d'AnnexinV/PI : l'apoptose dépendante de l'activation de la caspase 3 et une voie de mort non apoptotique dépendante de la caspase 1 (apparentée à la pyroptose). C'est pourquoi nous avons cherché à déterminer si la caspase 1, ou les caspases 3/7 étaient nécessaires à la mort des CAFs suite à l'application du CMEM rotatif.

Pour cela, nous avons utilisé des inhibiteurs de l'activation de l'une ou l'autre de ces caspases que nous avons incubés 1h en présence des cellules avant application du CMEM (inhibiteur de caspase 1 à 2.5 μ M (*Santa Cruz Biotechnologies*)/ inhibiteur des caspases 3/7 à 10 μ M (*Apexbio*)). Nous avons ensuite mesuré les pourcentages de marquage à l'AnnexinV/PI 4h après application du CMEM (Figure C1).

Nous avons montré que les forces exercées par les NPMs engendraient une mort cellulaire dépendante de l'activation de la caspase 1 et des caspases 3/7.

En effet, les NPM@Gastrine soumises aux CMEM rotatifs ont entraîné une augmentation de la mort cellulaire totale jusqu'à $29.6 \pm 1.8\%$, et l'incubation avec un inhibiteur de caspase 1 empêche l'induction de mort cellulaire ($10.4 \pm 1.8\%$) (RMF-NPM+ : $8.66\% \pm 0.5\%$).

De la même manière, l'application du CMEM en présence de NPM@Gastrine a entraîné une augmentation de la mort cellulaire totale jusqu'à $19.7 \pm 0.6\%$, et l'incubation avec un inhibiteur des caspases 3/7 empêche l'induction de la mort cellulaire ($6.8 \pm 1.3\%$), (RMF-NPM+ : $10.4\% \pm 0.75\%$).

L'activation de la caspase 1 et celle de la caspase 3 et/ou de la caspase 7 sont nécessaires à l'augmentation de la mort cellulaire engendrée par l'application de forces mécaniques par les NPM@Gastrine.

Implication des ROS dans la mort cellulaire induite par les forces mécaniques exercées par les NPM@Gastrine

Nous avons pu mettre en évidence l'implication des ROS (Reactive Oxygen Species) dans la mort cellulaire observée après application de RMF sur des CAF-RCCK2 ayant internalisés les NPM@Gastrine.

Les forces mécaniques exercées par les NPM@Gastrine sous l'action du RMF augmentent le pourcentage de cellules marquées à l'AnnexinV et à l'iodure de propidium pour atteindre un pourcentage de mort cellulaire totale de $22.7 \pm 2.1\%$ (**Figure C2**).

La pré-incubation de N-acétylcystéine (NAC) ramène ce pourcentage de mort cellulaire à un niveau comparable à celui des contrôles ($10.9 \pm 0.8\%$). La NAC étant un piègeur des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), ce résultat indique que la production de ROS joue un rôle essentiel dans la mort cellulaire engendrée par les forces mécaniques.

Les forces mécaniques exercées par les NPM@Gastrine soumises à un RMF induisent donc la production de ROS qui participent à la mort cellulaire des CAF-RCCK2.

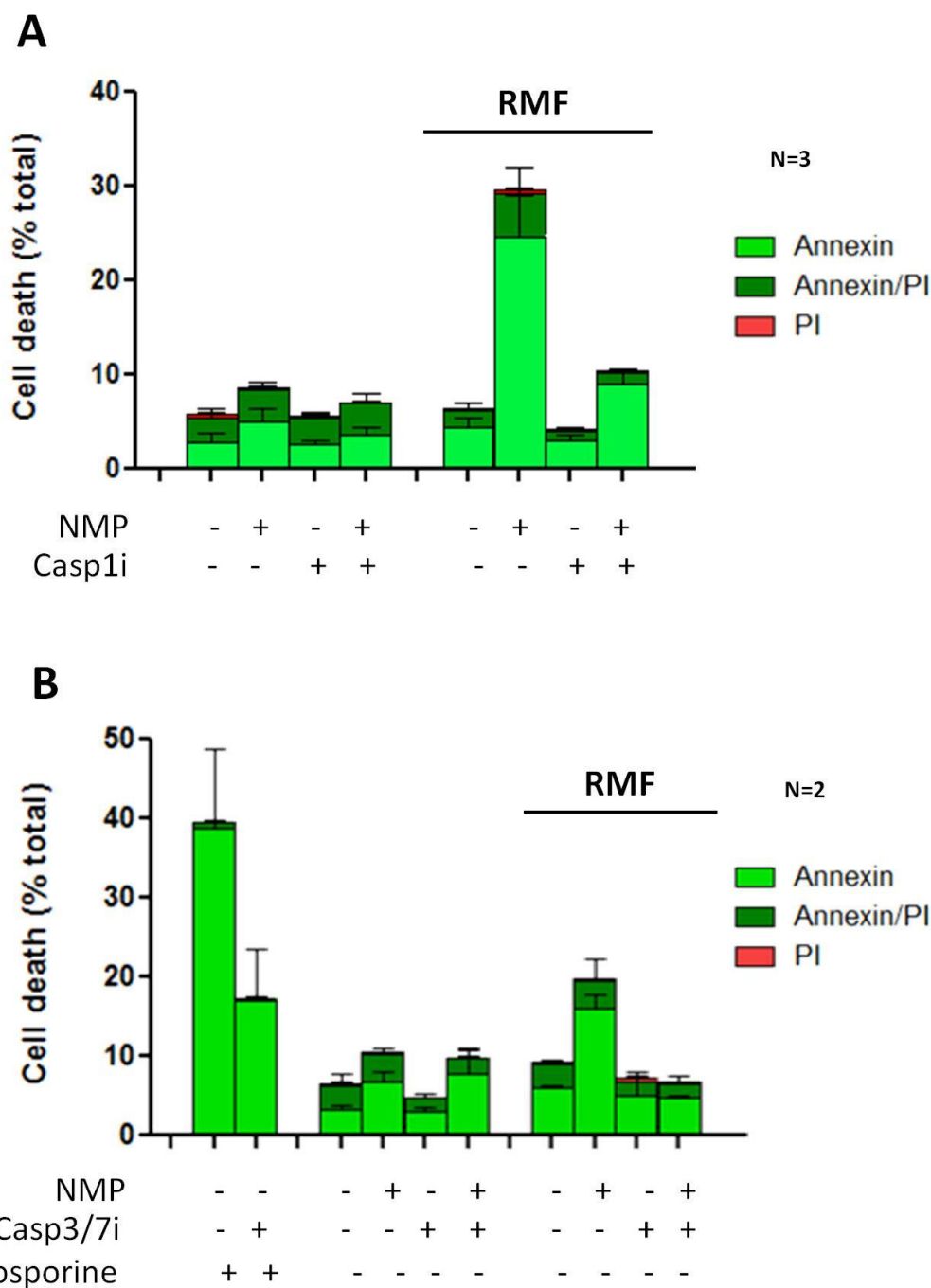


Figure C1 - L'activation des caspases 1 et 3/7 est nécessaire pour engendrer la mort cellulaire des CAF-RCCK2 après application d'un CMEM rotatif de 1Hz et 40mT en présence de NPM@Gastrine (16µg/mL). A) Marquage à l'AnnexinV/PI analysé par cytométrie en flux avec un inhibiteur de la caspase 1 B) Marquage à l'AnnexinV/PI analysé par cytométrie en flux avec un inhibiteur des caspases 3/7

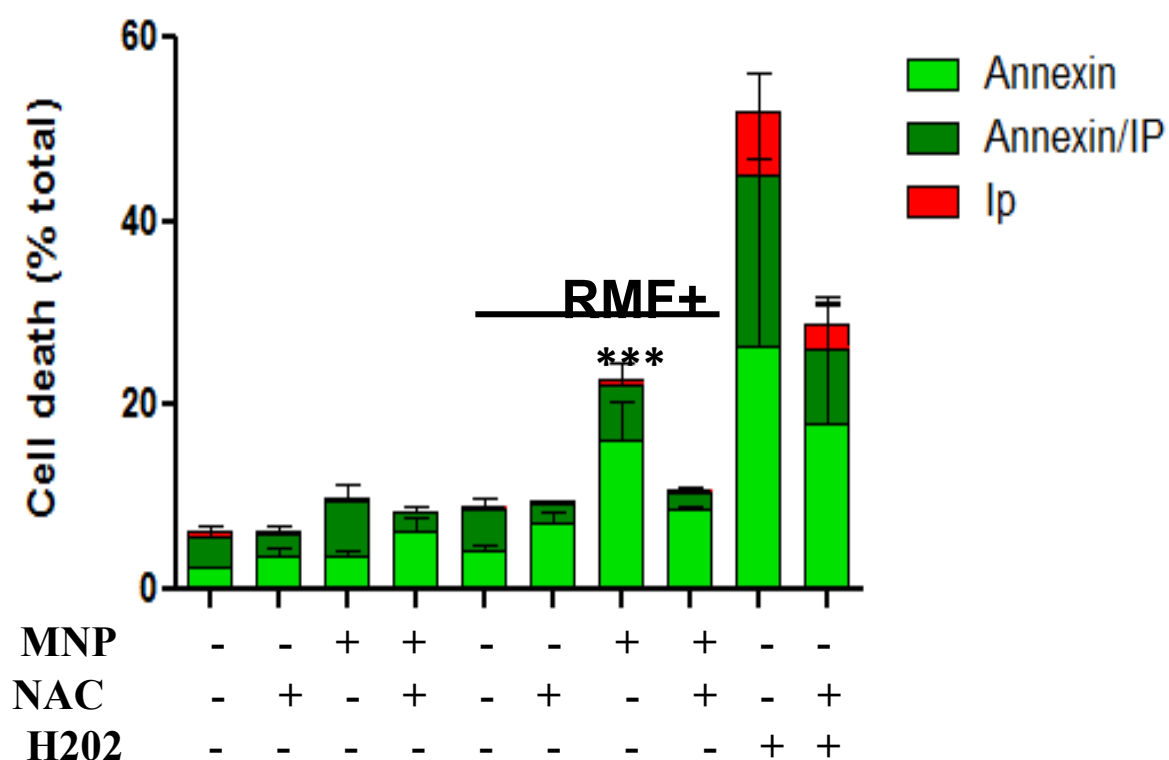


Figure C2 – La production de ROS est nécessaire pour engendrer la mort cellulaire des CAF-RCK2 après application d'un CMEM rotatif de 1Hz et 40mT en présence de NPM@Gastrine (16µg/mL). Marquage à l'AnnexinV/PI analysé par cytométrie en flux en présence de N-acétylcystéine (NAC), un piègeur de ROS

DISCUSSION

En ce qui concerne la signalisation de mort cellulaire enclenchée, nous avons montré que celle-ci est dépendante de l'activation de plusieurs caspases : la caspase 1 et des caspases 3/7. Il a été notamment montré que les caspases 3 et 7 peuvent être activées par la caspase 1 [321], [322], [323]. Egalement, ces caspases pourraient induire deux voies de mort différentes en parallèle, l'une apoptotique et l'autre dépendante de la caspase 1. Cependant l'inhibition totale de la mort cellulaire par l'un et l'autre des inhibiteurs de caspase fait plutôt pencher en faveur d'activations co-dépendantes des caspases. Des expériences supplémentaires seraient nécessaires, afin de déterminer la cinétique d'activation de ces caspases. Ceci permettrait de déterminer si deux mécanismes de mort cellulaire distincts sont impliqués, ou si les activations des caspases sont dépendantes l'une de l'autre (Figure C3). Pour cela, il faudrait par exemple tester si l'inhibition de la caspase 1 inhibe l'activation de la caspase 3.

Egalement, l'implication de la caspase-1 et de la production de ROS dans la mort cellulaire n'est pas sans rappeler l'implication de ces mêmes acteurs dans le mécanisme de mort cellulaire induit par l'application d'Hyperthermie Magnétique médiée par des NPM@Gastrine [317] que notre équipe a mis en évidence. Précédemment nous avons également mis en évidence une perméabilisation de la membrane lysosomale (LMP) ainsi qu'une implication de la cathepsine B dans la mort cellulaire induite par les CMEM, deux phénomènes également nécessaires à la mort cellulaire induite par Hyperthermie Magnétique. Néanmoins, les effets délétères causés par l'Hyperthermie Magnétiques sur les cellules cancéreuses ne dépendent pas de l'activation de la caspase 3/7 comme nous l'avons montré pour l'utilisation de CMEM sur les CAFs. Ceci peut être le témoin du fait que l'Hyperthermie Magnétique et les CMEM déclenchent des voies de signalisations différentes et sont issus d'événements déclencheurs différents, ou bien que la même voie de mort est déclenchée par ces deux techniques mais implique des acteurs parfois différents selon le type cellulaire visé.

III.2. Deuxième partie des résultats : Observation en temps réel des phénomènes engendrés les forces mécaniques exercées par des NPM en présence de CMEM

Nous avons vu précédemment que les NPM@Gastrine couplées au CMEM induisaient un mécanisme de mort cellulaire impliquant une perméabilisation lysosomale (LMP), l'action des cathepsines B et des ROS, l'activation de la caspase 1 et des caspases 3/7.

Nous avons alors conclu qu'il serait pertinent de réaliser une cinétique d'apparition de ces phénomènes, afin de préciser davantage le mécanisme de mort cellulaire à l'œuvre.

Nous avons choisi de nous intéresser dans un premier temps à la détermination de la cinétique des événements précoces de ce mécanisme ayant lieu pendant l'application du CMEM. Pour cela, nous avons utilisé un nouveau générateur de champs magnétiques, permettant de générer des CMEM rotatifs sous l'objectif d'un microscope confocal.

INTRODUCTION

Actuellement, l'utilisation des nanotechnologies dans la mise en œuvre de stratégies thérapeutique innovantes est en plein essor. En outre, les nanoparticules magnétiques (NPMs) sont des outils polyvalents, aux propriétés uniques, qui ouvrent de nouveaux horizons pour les thérapies anticancéreuses. Outre leur capacité à chauffer leur environnement en présence de champs magnétiques haute fréquence, utilisée dans le cadre de traitement d'hyperthermie magnétique [262], les NPMs peuvent se mettre en mouvement sous l'action de champs magnétiques basse fréquence. Cette propriété permet aux NPMs d'exercer des forces mécaniques sur leur environnement. Ces dix dernières années des études ont montré qu'il était possible d'induire la mort cellulaire, en particulier de cellules cancéreuses, *via* le mouvement des NPMs.

Ces NPMs peuvent entre autre s'accumuler dans les lysosomes, et des publications utilisant des champs magnétiques basse fréquence à effets mécaniques (CMEM) ont déjà montré que les forces appliquées par ces NPMs lysosomales induisent des perturbations cellulaires, comme la rupture de la membrane plasmique [300], [301], la perméabilisation des lysosomes [301], ou encore la rupture du cytosquelette [282].

Nous avons déjà montré dans un précédent article que les NPM vectorisées avec de la Gastrine (NPM@Gastrine) permettent de cibler les CAFs exprimant le récepteur à la cholécystokinine de type 2 (CAF-RCCK2) et s'accumulent dans leurs lysosomes. Nous avons également montré que l'application d'un couple mécanique par les NPM@Gastrine en présence de champ magnétique rotatif basse fréquence (RMF) induit la mort des CAF-RCCK2 via une perméabilisation lysosomale, l'action de cathepsines, des ROS et l'activation des caspases 1 et 3/7.

Dans le présent article nous avons utilisé un nouveau générateur de champs magnétiques permettant d'étudier les effets du RMF combiné au NPM@Gastrine en temps réel. Nous avons montré qu'en plus de la perméabilisation précoce des lysosomes et la fuite de leur contenu, les forces mécaniques induisent un mouvement lysosomal et cellulaire.

MATERIELS ET METHODES

Lignée cellulaire

Les expériences ont été menées sur une lignée humaine immortalisée de fibroblastes associés au cancer (CAF). Cette lignée a été immortalisée par l'introduction de l'antigène T du virus SV40 et de la transcriptase inverse de la télomérase humaine (hTERT) dans des fibroblastes pancréatiques humains. Ces fibroblastes ont été isolés du tissu pancréatique réséqué d'un patient soumis à une opération du cancer du pancréas, et obtenu par le Dr A. Masamune (*Division de gastroentérologie, École supérieure de médecine de l'Université de Tohoku, Japon*). Cette lignée a ensuite été transfectée à l'aide de plasmides codant pour le cDNA du récepteur RCCK2 humain (*vecteur pcDNA3 (BD Biosciences Clontech)*) et d'un agent de transfection (*Lipofectamine 2000 (Invitrogen)*). Des clones ont été obtenus après sélection à la généticine à 400 $\mu\text{g} / \text{ml}$ (Sigma-Aldrich). Les cellules ont été cultivées dans du milieu DMEM/ F-12 (*DMEM/F-12 GlutaMAX™, Thermofisher Scientific*) contenant 10% de sérum de veau foetal (BSA) et 100 UI / ml de pénicilline / streptomycine (*Penicilline-Streptomycine P4333; Sigma-Aldrich*). Ces CAF-RCCK2 étaient mises en culture à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Elles étaient incubées avec 400 $\mu\text{g} / \text{ml}$ de généticine (*Sigma-Aldrich*) une fois par semaine.

Générateurs de champs magnétiques

Le premier générateur de champ magnétique, utilisé pour les expériences en temps réel sous microscope confocal, est composé de 4 pointes de fer pur ARMCO® reliées entre elles par une couronne, et de 4 bobines [voir ci-dessous]. Le fer permet d'acheminer le flux magnétique généré par les bobines jusqu'au bout des pointes. La surface délimitée par le bout de chaque pointe est appelée entrefer, mesure environ 1 mm² et correspond à l'endroit où le champ magnétique rotatif (RMF) est généré. Les deux courants alternatifs traversant chaque couple de bobine sont de même amplitude, de même fréquence mais déphasés de 90°, de sorte à générer un RMF au niveau de l'entrefer. Les cellules exposées au RMF se situent au niveau de l'entrefer

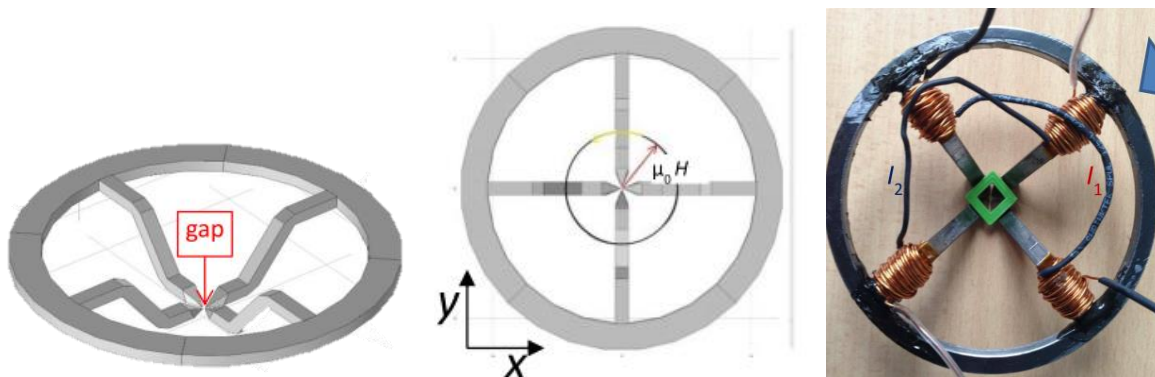


Illustration - Générateur de champs magnétiques. Images issues du manuscrit de thèse de Nicolas Hallali (2016) [324]

Traitement par RMF sous microscope confocal

100 000 cellules CAF-RCCK2 ont étéensemencées dans une boîte Cellview à compartiment unique (*Greiner Bio-One*). Le lendemain, les cellules ont été incubées avec des NPM@Gastrin (16 µg magnetic Fe/ml) pendant 24h à 37°C dans du milieu DMEM/F-12 contenant 0,5% de BSA (*Bovine Serum Albumin, Eurobio*), 10 mM d'HEPES pH=7.4, et 100 UI / ml de pénicilline / streptomycine (*Penicilline-Streptomycine P4333; Sigma-Aldrich*).

L'exposition à un champ magnétique basse fréquence rotatif (RMF) a été réalisée sous l'objectif d'un microscope confocal à une fréquence de 1Hz et une amplitude de 40mT. Lors la mise en œuvre des expériences, l'environnement de la Cellview a été maintenu à $37,0 \pm 0,2^{\circ}$ C durant toute la durée de l'exposition au champ magnétique et approvisionné en CO₂.

Perméabilisation de la membrane lysosomale et localisation des NPM@Gastrin

Du LysoTracker Green DND-26 à 10 nM (*Invitrogen, excitation : 488 nm*) a été ajouté dans le milieu de culture des CAF-RCCK2 et incubé pendant 15 minutes. Le milieu a ensuite été retiré, remplacé par du milieu DMEM/F-12 à 0.5% BSA sans LysoTracker et les cellules ont été exposées à un RMF pendant 45 minutes sous l'objectif d'un microscope confocal (*LSM780 confocal microscope, Zeiss*). Des prises de vue ont été réalisées toutes les minutes pendant toute la durée du champ pour évaluer la variation de fluorescence du lysotracker au cours du temps. L'intégrité des lysosomes a été déterminée en mesurant la fluorescence totale par cellule. Les conditions au temps 0 minute ont été fixées à 100%.

Afin d'évaluer la localisation des NPM@Gastrine (*excitation : 633nm*) et leur colocalisation avec le lysotracker, les clichés pris aux temps 0, 15, 30 et 45 minutes d'exposition au RMF ont été analysés sur le logiciel ImageJ à l'aide du plugin Jacop donnant les valeurs du coefficient de Pearson et des coefficients de Manders M1 et M2.

Le coefficient de Pearson permet de déterminer si les deux fluorophores se trouvent au même endroit : on considère qu'il y a colocalisation lorsque le coefficient est supérieur à 0.5.

Les coefficients de Mander M1 et M2 ont également été calculés. Dans nos expériences, correspondent aux rapports suivants :

$$M1 = \frac{\text{Somme des intensité des pixels rouges pour lesquels l'intensité du vert est différente de zero}}{\text{Intensité totale des pixels rouge}}$$

$$M2 = \frac{\text{Somme des intensité des pixels verts pour lesquels l'intensité du rouge est différente de zero}}{\text{Intensité totale des pixels verts}}$$

Le vert correspond à la fluorescence de LysoTracker Green et le rouge à la fluorescence des NPM@Gastrine. Ils permettent de déterminer le pourcentage de NPM@Gastrine colocalisées

avec le LysoTracker Green (M1) ainsi que le pourcentage de LysoTracker Green colocalisé avec les NPM@Gastrine (M2)

Adhésion cellulaire

Les cellules CAF-RCCCK2 ont été placées sous l'objectif d'un microscope confocal pendant 10 minutes (*LSM780 confocal microscope, Zeiss*) puis les cellules ont été exposées à un RMF pendant 20 minutes et enfin après arrêt du RMF les cellules ont été laissées sous l'objectif pendant 10 minutes supplémentaires. Des prises de vue ont été réalisées toutes les minutes pendant toute la durée de l'expérience.

Le détournage des cellules a été réalisé sur le logiciel ImageJ qui a permis de calculer la surface cellulaire correspondante.

Déplacement des lysosomes

Du LysoTracker Green DND-26 à 10 nM (*Invitrogen, excitation : 488 nm*) a été ajouté dans le milieu de culture des CAF-RCCCK2 et incubé pendant 15 minutes. En même temps, du colorant Hoechst 33342 (*excitation : 350nm, Immunochemistry Technologies*) a été incubé 20 minutes à 0.2µg/ml. Le milieu a ensuite été retiré, remplacé par du milieu DMEM-F12 medium 0.5% FBS sans Hoechst ni LysoTracker. Les cellules CAF-CCK2R ont ensuite été placées sous l'objectif d'un microscope confocal pendant 10 minutes (*LSM780 confocal microscope, Zeiss*) puis les cellules ont été exposées à un RMF pendant 20 minutes et enfin après arrêt du RMF les cellules ont été laissées sous l'objectif pendant 10 minutes supplémentaires. Des prises de vue ont été réalisées toutes les minutes pendant toute la durée de l'expérience.

Les déplacements des lysosomes pendant l'expérience ont été analysés à l'aide du logiciel Imaris (*Oxford Instruments*) en réalisant un suivi des lysosomes, ce qui a permis de visualiser leurs déplacements et de calculer les distances parcourues et les vitesses de déplacement. La distance et vitesse de déplacement du noyau a été soustrait aux distances et vitesses obtenues pour les lysosomes afin de s'affranchir d'un mouvement global de la cellule.

RESULTATS

Perméabilisation lysosomale médiée de façon précoce par les NPM@Gastrine durant l'application du RMF

Nous avons voulu valider l'utilisation du nouveau générateur de RMF permettant de visualiser en temps réel les effets du champ magnétique en microscopie confocale.

Dans un premier temps nous avons observé la colocalisation des NPM@Gastrine avec le Lysotracker Green afin d'attester de la localisation des NPM pendant l'application du RMF.

Les NPM@Gastrine s'accumulent dans les lysosomes des cellules CAF-CCK2, comme le montre l'observation des profils de colocalisation des fluorescences des NPM@Gastrine (rouge) et du Lysotracker Green (vertes) (**Figure 1B**) montrant que les deux intensités de fluorescence se situent au même endroit. Egalement, le calcul du coefficient de corrélation de Pearson (0.76 ± 0.045 ou 0.68 ± 0.024) confirme la colocalisation (**Figure 1A**). L'application du champ magnétique (RMF+, NPM+) induit une diminution significative du coefficient de Pearson, contrairement aux cellules non exposées au champ magnétique (après 30 et 45 minutes d'exposition au champ magnétique : 0.46 ± 0.034 et 0.31 ± 0.033 vs 0.75 ± 0.054 et 0.73 ± 0.055) (**Figure 1A**). Ceci indique une perte de colocalisation des NPM et du Lysotracker Green.

Davantage de précisions sont données par les coefficients de Manders M1 et M2 que nous avons calculé pour les temps 0, 15, 30 et 45 minutes d'application de RMF.

Sans champ magnétique, M1 ne varie pas (0.63 ± 0.064 à 0.064 ± 0.15 pour $t=0$ et $t=45$ minutes respectivement). En présence de champ magnétique le coefficient M1 diminue de 0.65 ± 0.14 au démarrage du RMF à 0.08 ± 0.08 après 45 minutes d'application (**Figure 1C**). Cela signifie qu'au départ dans les conditions avec et sans RMF, 63 et 65% des NPM@Gastrine sont colocalisées avec le Lysotracker Green. Puis, après application du RMF moins de nanoparticules (8%) se retrouvent colocalisées avec du Lysotracker Green.

De plus, que ce soit en présence ou en absence de RMF, le coefficient M2 ne varie pas (**Figure 1C**). Ceci indique que la même proportion de Lysotracker Green, à savoir environ 60%, est colocalisée avec des NPM@Gastrine tout au long de l'expérience.

Ces coefficients attestent donc d'une perte de colocalisation, due à une diminution de la fluorescence verte du Lysotracker Green, ce qui diminue le pourcentage de NPM@Gastrine colocalisées avec le Lysotracker Green (M1). En effet, une perte de la fluorescence du Lysotracker Green, témoin d'une perméabilisation de la membrane lysosomale, a lieu en présence de RMF. Au temps 0, 15, 30 et 45 minutes, cette fluorescence diminue (Figure 2A)

Nous avons étudié la cinétique d'apparition de cette LMP en mesurant l'intensité de fluorescence du LysoTracker Green.

La fluorescence totale par cellule du LysoTracker Green fluorescent a été mesurée toutes les minutes pendant les 45 minutes d'application du RMF (**Figure 2B**). Pendant les 4 premières minutes, aucune différence n'est visible entre les conditions. Pour la condition en présence de RMF et de NPM, l'écart se creuse de façon significative avec les autres conditions dès la cinquième minute.

Ainsi pour comparaison, le pourcentage de fluorescence à la fin de l'expérience pour les différentes conditions est de $51,3 \pm 10$ et $54,6 \pm 14.7\%$ pour les deux conditions sans NPM@Gastrine, et de $39.5 \pm 0.3\%$ et $9.4 \pm 6.2\%$ pour les conditions avec NPM@Gastrine sans et avec exposition au RMF respectivement. Il est à noter que la baisse de fluorescence pour la condition avec NPM@Gastrine sans exposition au RMF n'est pas significative comparativement à la condition contrôle sans RMF et NPM@Gastrine. La diminution de fluorescence est significative et beaucoup plus prononcée pour la condition avec RMF et NPM@Gastrine, ce qui atteste d'une perméabilisation de la membrane lysosomale provoquée par les forces mécaniques.

La combinaison de RMF et de NPMs entraîne donc une perméabilisation de la membrane lysosomale (LMP), comme nous l'avons démontré dans notre précédent article. Cette LMP est un événement précoce, car il débute dès 5 minutes d'exposition au RMF.

Etude du mouvement des lysosomes en réponse aux forces mécaniques exercées par les NPM@Gastrine

Les NPM@Gastrine étant majoritairement accumulées dans les lysosomes des CAFs, nous avons cherché à déterminer si la génération des forces mécaniques exercées par les NPM en réponse à l'exposition au RMF pouvait engendrer le mouvement des lysosomes. Pour cela, les CAF-RCCK2 ayant ou non internalisé des NPM@Gastrine ont été exposés ou non au RMF et observés en temps réel par microscopie confocale. Les résultats montrent que l'application du RMF induit une augmentation significative de la vitesse de déplacement des mouvements lysosomaux contenant des NPM@Gastrine (Figure 3A), comparativement aux lysosomes dépourvus de NPM@Gastrine et non exposés au RMF. Cette augmentation de vitesse de déplacement des lysosomes présentant des NPM@Gastrine est significative dès la première minute d'exposition au RMF et s'incrémente tout au long de l'application du champ

magnétique. Au temps $t=1800$ secondes, ils atteignent une vitesse de $73,45 \pm 7 \mu^2/\text{minutes}$ (comparativement à $21,5 \pm 3,4$ et $25,8 \pm 8,3 \mu^2/\text{minutes}$ dans les conditions (RMF-, NPM+) et (RMF+NPM-)). Il est à noter que la vitesse de déplacement des lysosomes reste faible en l'absence d'exposition au RMF.

La distance moyenne parcourue par les lysosomes et leur sens de déplacement ont également été mesurés (Figure 3B). Les résultats montrent que les lysosomes contenant des NPM@Gastrine parcourent une plus grande distance et se déplacent vers le noyau cellulaire. En effet, lors de l'application de RMF, la distance moyenne parcourue par les lysosomes présentant des NPM@Gastrine est de $2,62 \pm 0,41 \mu\text{m}$, tandis que celle des lysosomes dépourvus de NPM@Gastrine est de $0,29 \pm 0,25 \mu\text{m}$ (Figure 3B). De plus, $76,6 \pm 6,1\%$ des lysosomes contenant des NPM@Gastrine se déplacent vers le noyau, alors que le déplacement des lysosomes dépourvus de NPM@Gastrine est aléatoire avec $48,7 \pm 5,9\%$ d'entre eux se dirigeant vers le noyau tandis que $51,3 \pm 5,9\%$ s'en éloignent.

Cet ensemble de résultats montre que le mouvement des NPM@Gastrine entraîne un déplacement anormal des lysosomes. Ceux-ci accélèrent et se déplacent vers le noyau et le centre de la cellule (Figure 3C).

Diminution de l'adhésion et rétractation cellulaire provoquées par les NPM@Gastrine en présence de RMF

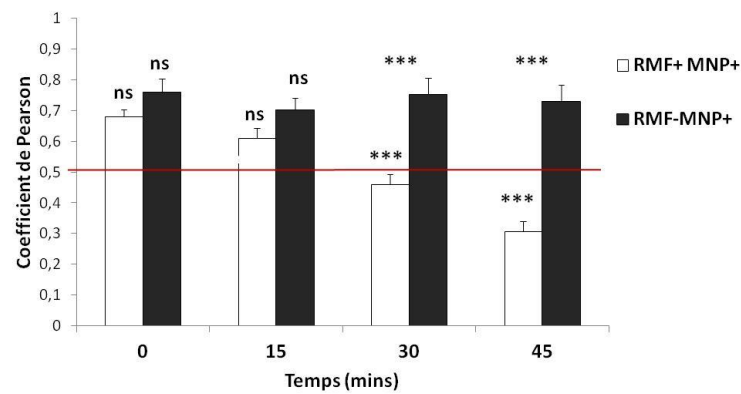
Suite aux observations réalisées sur le déplacement des lysosomes vers le centre de la cellule, nous avons cherché à déterminer si ce déplacement pouvait être associé à réaction cellulaire globale en réponse aux forces mécaniques exercées par les NPM exposées au RMF. En effet, les lysosomes sont des organelles étroitement liés au cytosquelette cellulaire et leur déplacement s'effectue généralement le long de ces fibres ; un déplacement forcé de ces lysosomes pourrait engendrer des mouvements du cytosquelette, entraînant des modifications de l'adhésion des cellules, de leur forme... Pour cela, les CAF-RCCK2 ayant ou non accumulé des NPM@Gastrine dans leurs lysosomes ont été exposées au RMF. Puis la surface d'adhésion des cellules a été analysée par microscopie confocale. Les résultats montrent que les CAF-RCCK2 ayant internalisé les NPM@Gastrine présentent une adhésion cellulaire réduite suite à l'exposition au RMF (**Figure 4A**). Cet effet est significatif dès la 10ème minute d'application du RMF. Après 20 minutes d'application du RMF, la surface d'adhésion des cellules contenant des NPM@Gastrine est diminué de $30,8 \pm 8,85\%$ par rapport à la surface d'adhésion initiale,

tandis que celle des cellules contrôles dépourvues de NPM@Gastrine ne varie pas significativement (9.8 ± 2.6 % est observée par rapport à la surface d'adhésion initiale).

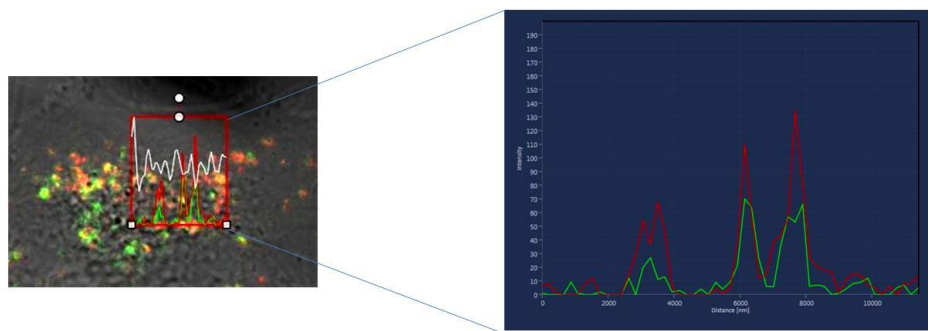
La Figure 4B montre une image représentative de la perte de surface d'adhésion et de la rétraction des cellules contenant des NPM@Gastrine, mesurée en temps réel lors de l'exposition au RMF. Durant les 10 premières minutes de l'expérimentation, les cellules ne sont pas exposées au RMF et leur surface d'adhésion reste stable (ligne bleu comparativement à la ligne jaune représentant l'adhésion basale de la cellule). Le champ RMF est ensuite appliqué pendant 20 minutes entraînant une perte de la surface d'adhésion de la cellule contenant des NPM@Gastrine (ligne rouge).

Ainsi, les forces mécaniques exercées par les NPM@Gastrine engendrent une rétractation des cellules et diminuent l'adhérence cellulaire.

A



B



C

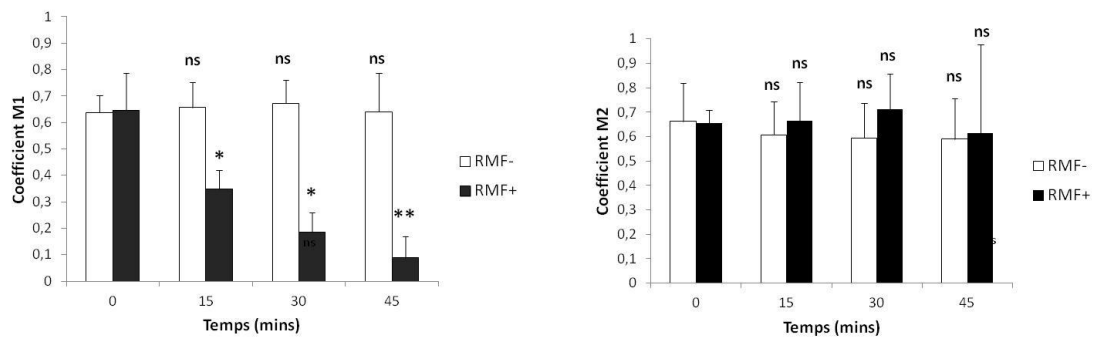
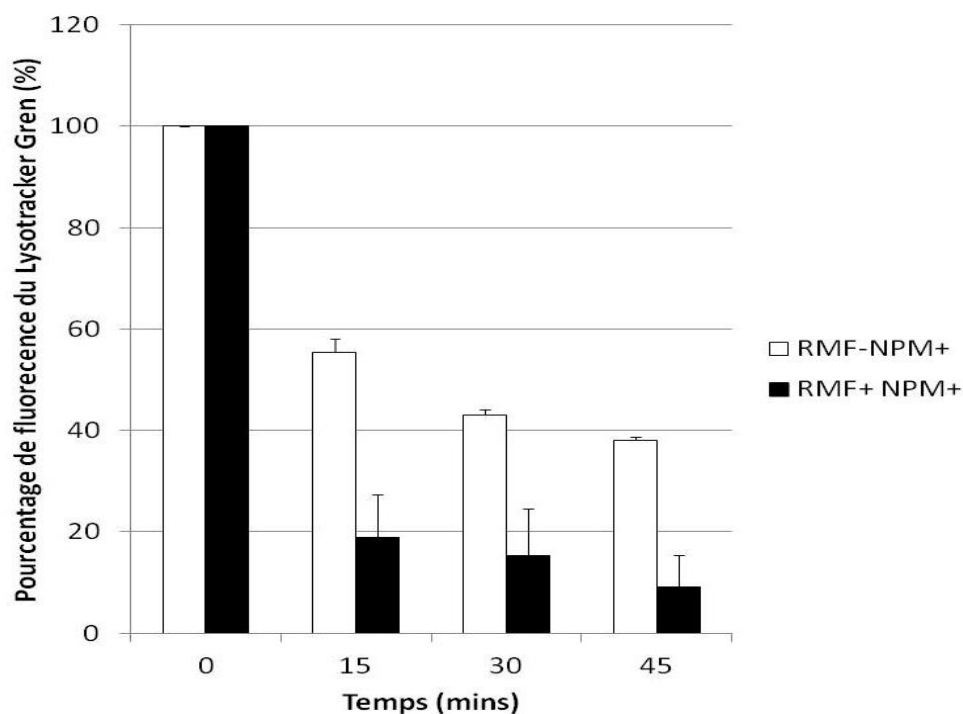


Figure 1 – Les forces exercées par les NPM@Gastrine en présence de RMF engendrent une perte de colocalisation des NPM@Gastrine et du LysoTracker Green marquant les lysosomes
A) Coefficient de corrélation de Pearson après 0, 15, 30 et 45 minutes d'application du RMF en présence ou non de NPM@Gastrine B) Image de microscopie confocale d'un CAF-RCCK2 et profil de colocalisation des fluorescences des NPM@Gastrine (rouge) et du LysoTracker Green (vert) associé C) Coefficients de Manders M1 et M2 après 0, 15, 30 et 45 minutes d'application du RMF ou sans RMF en présence de NPM@Gastrine.

A



B

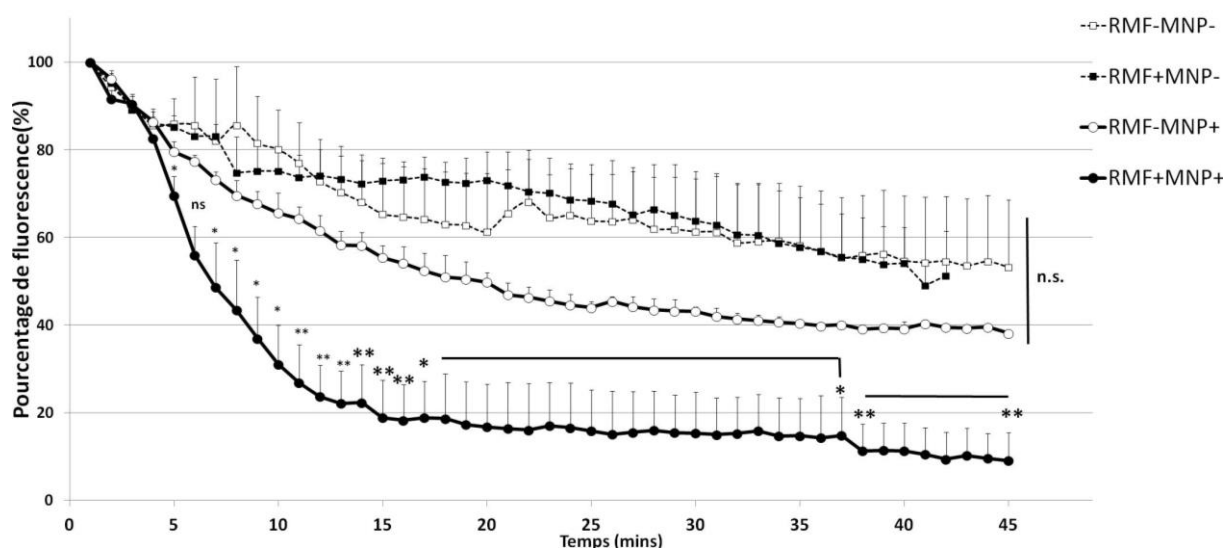


Figure 2– Les forces exercées par les NPM@Gastrine en présence de RMF engendrent une perméabilisation lysosomale précoce. A) Pourcentage de Fluorescence du Lysotracker Green en présence de NPM@Gastrine à 0, 15, 30 et 45 minutes d'expérience avec et sans RMF B) Cinétique d'évolution du pourcentage de fluorescence du Lysotracker Green en présence ou non de RMF et de NPM@Gastrine. Les conditions de départ sont fixées à 100% de fluorescence.

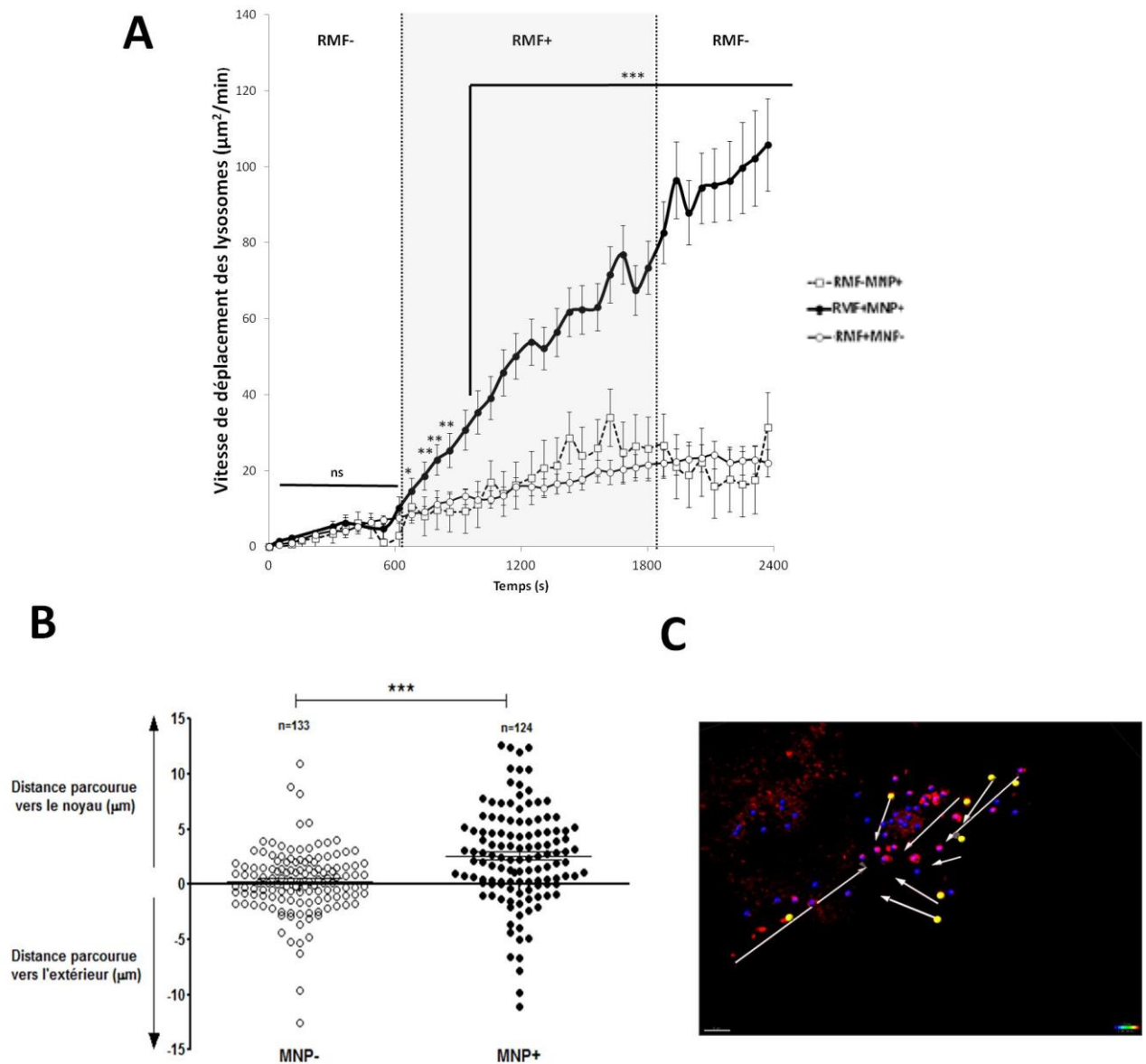


Figure 3— La vitesse de déplacement des lysosomes augmente et ceux-ci se dirigent préférentiellement vers le noyau cellulaire en réponse aux forces mécaniques exercées par les NPM@Gastrine. A) Vitesse de déplacement des lysosomes en présence ou non de NPM@Gastrine et de RMF B) Distance parcourue et direction des déplacements des lysosomes pendant l'application de RMF en absence ou en présence de NPM@Gastrine C) Illustration issue du logiciel Imaris montrant le déplacement des lysosomes vers le noyau.

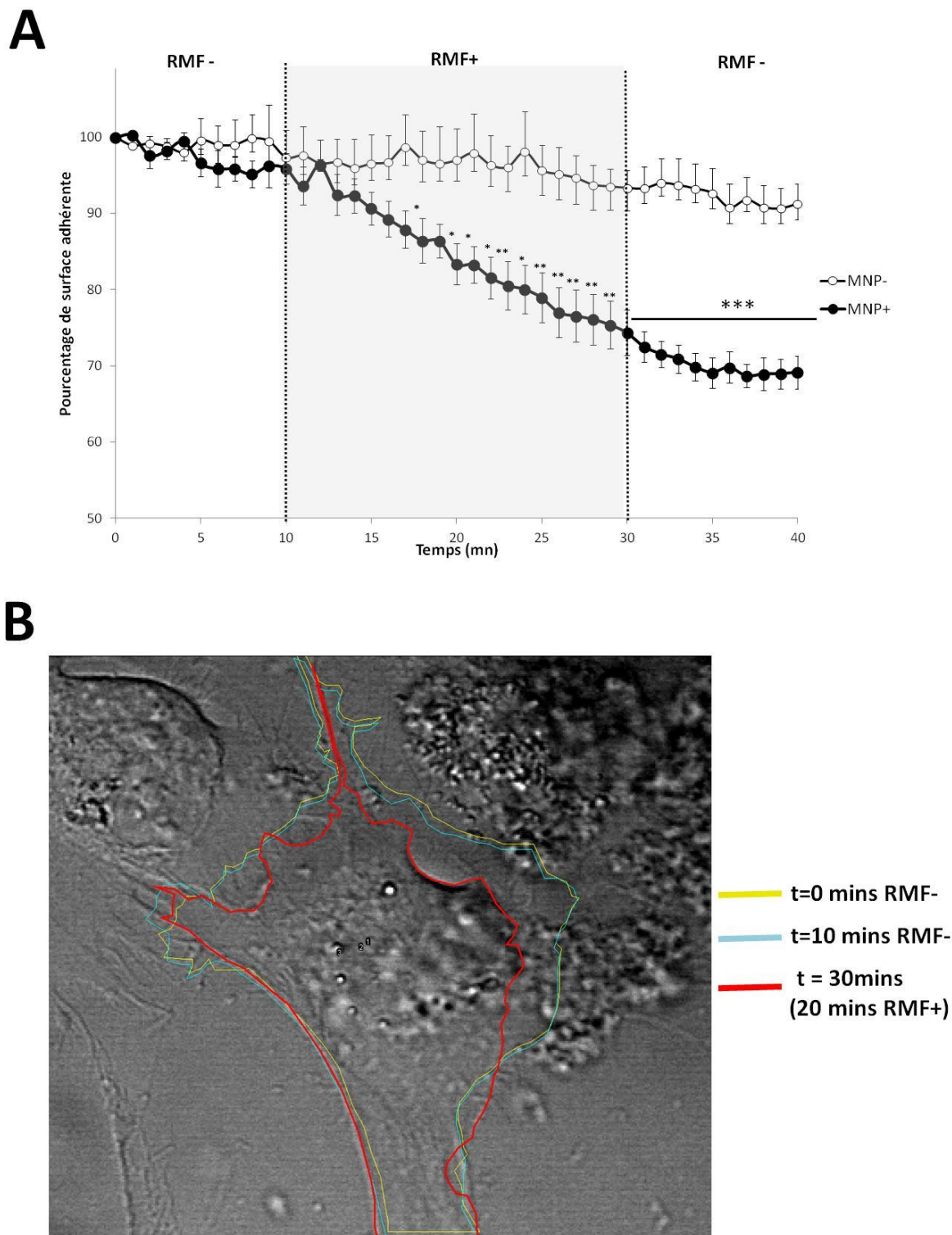


Figure 4 – Les forces exercées par les NPM@Gastrine font diminuer la surface d'adhésion cellulaire et augmenter la rétraction cellulaire A) Pourcentage de surface adhérente des cellules en présence ou non de NPM@Gastrine et de RMF B) Image de microscopie confocale d'un CAF-RCCK2 ayant internalisé des NPM@Gastrine. Le contour de la cellule au début de l'expérience est montré en jaune. Le contour de la cellule après 10 minutes sans RMF est en bleu. Le contour de la cellule après 20 minutes d'application de RMF est en rouge.

DISCUSSION

Nos travaux ont permis de démontrer une nouvelle fois la perméabilisation lysosomale médiée par l'application d'un RMF combiné à des NPM internalisées dans des CAFs. Ceci nous a permis de valider l'utilisation d'un nouveau générateur de champs magnétiques permettant des analyses en temps réel pendant l'application du RMF.

Nous avons notamment observé des événements très précoces à savoir : la perméabilisation lysosomale (LMP), les mouvements des lysosomes, et la diminution de l'adhésion cellulaire.

L'effet des forces mécaniques sur l'adhésion cellulaire a aussi été étudié par Seongbom Jeon et al. [238]. Ces auteurs ont observé des fibroblastes NIH3T3 ayant internalisé des NPMs (10-120nm) après leur exposition à un CMEM statique. Ce CMEM était généré par un aimant placé sous la boîte de culture des cellules. Ils ont observé un changement de morphologie des cellules : la hauteur de celles-ci était diminuée et leur surface d'adhésion augmentée après traitement. Ces résultats sont à l'opposé de ceux que nous avons obtenus dans notre expérience. Ceci peut s'expliquer grâce à l'hypothèse formulée par les auteurs qui expliquent l'augmentation de la surface d'adhésion des fibroblastes par le mouvement des NPM internalisées et en membrane : celles-ci sont attirées vers l'aimant et forcent la cellule à s'abaisser et s'étirer. Ainsi, dans notre cas, les mouvements des NPM, soumises à un CMEM rotatifs, ne sont pas les mêmes que ceux de la publication de Seongbeom Jeon, ce qui explique que la réaction cellulaire globale soit différente.

A notre connaissance, aucune publication étudiant les CMEM combinés aux NPM n'a mis en évidence le déplacement des lysosomes comme dans nos travaux.

Nous pouvons nous demander dans quel ordre apparaissent les trois phénomènes observés, et quelles sont les liens de causalité entre eux.

En se basant seulement sur les cinétiques obtenues, et l'apparition de significativité des résultats comparativement aux conditions contrôles, il semblerait que le mouvement/l'augmentation de la vitesse de déplacement des lysosomes débute en premier (2 minutes de RMF), suivi de la perméabilisation des lysosomes (5 minutes de RMF) et de la perte d'adhésion cellulaire (7 minutes de RMF). Ceci n'est néanmoins pas suffisant pour pouvoir conclure de manière certaine.

Nous pouvons notamment nous demander quelle est la cause du mouvement des lysosomes.

Il semble que la fuite lysosomale n'est pas la cause entraînant le déplacement des lysosomes. En effet, l'acidification du cytoplasme est connue pour entraîner la dispersion des lysosomes péri-nucléaires, tandis que l'alcalinisation du cytoplasme cause le mouvement des lysosomes vers le noyau [325]. Or, les lysosomes sont des compartiments cellulaires à pH acide et leur perméabilisation acidifie le cytoplasme [326]. Dans nos expériences nous observons que les lysosomes se dirigent préférentiellement vers le noyau alors qu'une perméabilisation lysosomale a lieu. Ce n'est donc pas la perméabilisation lysosomale qui entraîne ce mouvement.

Les mouvements des lysosomes pourraient être induits directement par les forces mécaniques exercées par les NPMs et entraîner à leur tour le mouvement du cytosquelette menant à la rétraction cellulaire. En effet a été démontré que les fibres d'actine du cytosquelette sont nécessaires à la rétraction des fibroblastes et à leur adhésion [327]. Ainsi il serait théoriquement possible que les forces exercées par les NPMs dans les lysosomes entraînent la contraction ou tirent sur les fibres du cytosquelette, entraînant la contraction des CAF-RCCK2.

A l'inverse, une seconde hypothèse est que le mouvement des lysosomes est entraîné par la rétraction de la cellule.

Selon la cinétique détaillée en début de discussion, le mouvement des lysosomes devient significatif avant la diminution de la surface d'adhésion, ce qui est en faveur de la première hypothèse. Pour ce qui est du mécanisme d'action permettant aux NPMs d'entraîner le mouvement des lysosomes, ceci pourrait être dû à une action forces mécaniques sur les kinésines responsables du déplacement des lysosomes et de leur liaison au cytosquelette. En effet il a été montré que pour inverser le mouvement d'une kinésine, une force de 3 à 7pN est nécessaire [313]. Egalement, il a été montré qu'après l'internalisation de NPM de 8nm, l'application de champs magnétiques permettait de contrôler les endosomes, de les aligner et d'entraîner leur déplacement le long des microtubules avec une force moyenne de 26pN [328].

Des expériences complémentaires seraient néanmoins nécessaires pour déterminer si la le mouvement des lysosomes est responsable de la rétraction cellulaire ou inversement.

Dans une publication étudiant les CMEM alternatifs (60 ou 125mT;50Hz) combinés à des NPMs (Fe_3O_4 , cœur de 7nm) internalisées dans les lysosomes de cellules cancéreuses, les auteurs ont mis en évidence l'action des forces mécaniques sur les fibres du cytosquelette. En effet, après application du traitement, l'observation des cellules en microscopie confocale a montré la rupture de fibres d'actine du cytosquelette [282]. L'étude des mouvements et de la

rupture du cytosquelette possiblement engendrés lors de l'application du RMF dans notre expérience permettrait de faire le lien entre mouvement des lysosomes et rétractation cellulaire, et peut être de trouver le lien de causalité entre ces évènements.

Pour conclure, le transport des lysosomes vers l'extérieur de la cellule est essentiel pour l'exocytose des lysosomes. Ce phénomène d'exocytose contribue notamment à la sécrétion d'hydrolases permettant de dégrader la matrice extracellulaire (MEC) et facilitant la migration et l'invasion cellulaire, ou encore pour la sécrétion des métalloprotéinases matricielles, connues pour des actions identiques [325]. Les CAFs sécrètent ces molécules et leurs sécrétomes sont impliqués dans de nombreux processus participant à la tumorigenèse et aux résistances des cellules cancéreuses aux traitements

Le contrôle de la position et du mouvement cellulaires des lysosomes pourrait donc être une stratégie thérapeutique intéressante dans le cadre de thérapies dirigées contre les CAFs [63], [68].

IV-CONCLUSION ET PERSPECTIVES

1-Optimisation du taux de mort cellulaire des Fibroblastes Associés au Cancer (CAFs)

Nous avons réussi à induire l'internalisation de NPMs vectorisées avec l'agoniste du récepteur à la cholécystokinine 2 (RCCK2) dans les lysosomes de CAFs exprimant ce récepteur. Nous avons ensuite établi la preuve de concept de l'induction de mort cellulaire des fibroblastes associés au cancer (CAFs) par l'intermédiaire de forces mécaniques exercées par des nanoparticules magnétiques (NPM). Aucune autre étude ne s'était penchée sur le sujet jusqu'à ce jour ; la très grande majorité des auteurs étudiant les effets des champs magnétiques à effet mécanique (CMEM) combinés au NPM l'ont fait sur des cellules cancéreuses, et seulement deux se sont intéressés à des fibroblastes murins sains (*cf. Tableau B-Annexes*). Nous sommes donc les premiers à utiliser cette stratégie pour détruire un élément du microenvironnement tumoral dans un but thérapeutique. Ces résultats sont précurseurs de futures études pour mettre en œuvre une nouvelle application thérapeutique anticancéreuse.

Cependant, nous avons étudié la mort cellulaire sur des CAFs en monoculture *in vitro*. La prochaine étape serait de tester les effets du champ magnétique sur une coculture cellulaire (2D ou 3D) avec des cellules cancéreuses pancréatiques (MiaPaca2). Nous pourrions ainsi vérifier si l'éradication des CAF-RCCK2 par application de forces mécaniques entraîne une sensibilisation des cellules cancéreuses à un traitement chimiothérapeutique (Gemcitabine). Les résultats de ces manip conditionneraient la suite du développement et déterminerait si une étude sur modèle murin doit être menée.

De plus, nous avons cherché à déterminer l'amplitude permettant de maximiser le torque appliqué par les NPM superparamagnétiques soumises à un CMEM rotatif ou alternatif en utilisant des simulations physiques calculées par ordinateur. Nous avons établi que le couple maximal se situait aux alentours de 40mT pour les CMEM rotatifs, et à partir d'environ 100 mT pour des CMEM alternatifs. Ces informations pourraient contribuer aux futures études des auteurs travaillant sur les CMEM, car toutes les NPM superparamagnétiques de même anisotropie exerceront un couple maximisé aux alentours de 40mT sous l'action d'un CMEM. Néanmoins, les simulations que nous avons utilisées ne permettent pas de déterminer la fréquence optimale des CMEM, celle-ci devra donc être déterminée expérimentalement. Egalement, les auteurs utilisant des NPMs non superparamagnétiques ne pourront pas se baser sur cette simulation pour déterminer l'amplitude optimale à appliquer dans leurs expériences.

Nous avons mis en évidence une correspondance entre la force maximale théoriquement appliquée par les NPM et l'augmentation de mort maximale obtenue expérimentalement. D'autres études ont fait varier ou criblé les amplitudes de CMEM, mais aucune ne s'est basée sur une simulation préalable pour déterminer la gamme de criblage. Les auteurs ont donc pu passer à côté d'un effet délétère potentiellement plus élevé que ceux qu'ils ont observés.

De plus la simulation du couple exercé par les NPM montre que les CMEM rotatifs peuvent appliquer un torque plus élevé que les CMEM alternatifs, particulièrement entre 10 et 100mT. Ceci correspond à ce que nous avons démontré expérimentalement, à savoir qu'à 1Hz et 40mT le CMEM rotatif induit une de mort cellulaire des CAFs plus élevé que le CMEM alternatifs. Nous avons mis en évidence une plus grande efficacité du CMEM rotatif comparativement aux CMEM alternatif et statique sur les CAFs, ce qui avait été démontré par d'autres auteurs sur cellules cancéreuses (*cf. partie II.3.3*). L'efficacité relative des types de CMEM entre eux ne semble donc pas dépendant du type cellulaire.

Cependant, l'optimisation des effets délétères que nous avons réalisée n'est pas parfaite. Tout d'abord le criblage des conditions que nous avons réalisé n'est pas complet : le générateur de champs magnétiques que nous avons utilisé était composé d'aimants permanents dont les amplitudes étaient définies au préalable, ce qui ne nous a pas permis de resserrer davantage les tests d'amplitude autour de 40mT. Notre équipe s'est récemment dotée d'un nouveau générateur qui pourra permettre de tester davantage d'amplitudes autour de 40mT. De plus nous n'avons pas testé toutes les fréquences à disposition, mais seulement les fréquences 0.2, 1, 10 et 20Hz. Nous n'avons pas non plus testé tous les types de champs (intermittent, non uniforme,...). La mort cellulaire des CAFs pourrait potentiellement être encore augmentée.

Nous avons également réussi à déclencher une mort cellulaire avec des nanoparticules de dimensions très réduites par rapport à la majorité des autres études. Nos travaux montrent qu'il n'est pas nécessaire d'utiliser des objets de plus grande dimension pour causer suffisamment de dommages cellulaires et provoquer la mort cellulaire. De plus, ces NPM pourront être injectées par voie intraveineuse pour des études in vivo.

Les NPM@Gastrine de nos travaux se trouvent dans les lysosomes. Dans la littérature, les NPM peuvent se trouver dans les lysosomes ou à la membrane. Il serait intéressant de comparer, pour la condition optimale 1Hz et 40mT, laquelle de ces localisations est la plus efficace pour engendrer la mort des CAFs, et quels sont les dommages cellulaires provoqués par les NPM membranaires comparativement ou NPM lysosomales. En effet aucune

publication n'a directement comparé les deux localisations des NPM et leurs efficacités relatives. Pour cela, il serait possible de cibler les récepteurs à la cholécystokinine 1 ou 2 en utilisant des NPM vectorisées avec un antagoniste (respectivement le JMV179 ou le GV1500013X) ne provoquant pas l'internalisation.

2-Etude des phénomènes et cascades de signalisation engendrés par les forces mécaniques sur les CAFs

Nos travaux avaient également pour but de préciser le mécanisme conduisant à la mort des CAFs ayant internalisés les NPM@Gastrine et soumis au CMEM rotatif (1Hz, 40mT).

Nous nous sommes penchés sur la cascade d'événements précoces induits par les forces mécaniques exercées par les NPM@Gastrine pendant l'application du CMEM rotatif. Pour cela nous avons utilisé un générateur de champs magnétiques conçu pour permettre une observation en temps réel des cellules soumises au champ sous l'objectif d'un microscope confocal. Nous avons mis en évidence une perméabilisation de la membrane lysosomale, une rétraction cellulaire associée à une diminution de la surface d'adhésion cellulaire, ainsi qu'un déplacement des lysosomes vers le noyau associé à une augmentation de leur vitesse de déplacement. La perméabilisation de la membrane lysosomale a été observée par d'autres auteurs étudiant les CMEM (*cf. partie II.3.4*), tout comme d'autres publications ont décrit des différences dans la surface d'adhésion cellulaire ou des changements morphologiques cellulaires suite au traitement (*cf. partie II.3.4*). Néanmoins, aucune autre publication n'a étudié les cinétiques précises de ces événements que nous nous sommes attachés à la décrire dans notre étude. Dans le cadre d'application de CMEM afin d'induire la mort cellulaire, nous sommes à notre connaissance les premiers à décrire et quantifier le mouvement des lysosomes. Cependant, nous n'avons pas pu déterminer de façon certaine l'ordre d'apparition de ces différents phénomènes, ainsi que leurs relations de causalité entre eux et lesquels sont directement ou indirectement déclenchés par les forces mécaniques (**Fig.19**). Pour cela, des expériences complémentaires devront être réalisées, notamment des études sur le cytosquelette, qui pourraient permettre de préciser le lien entre le mouvement des lysosomes et le changement de morphologie des cellules.

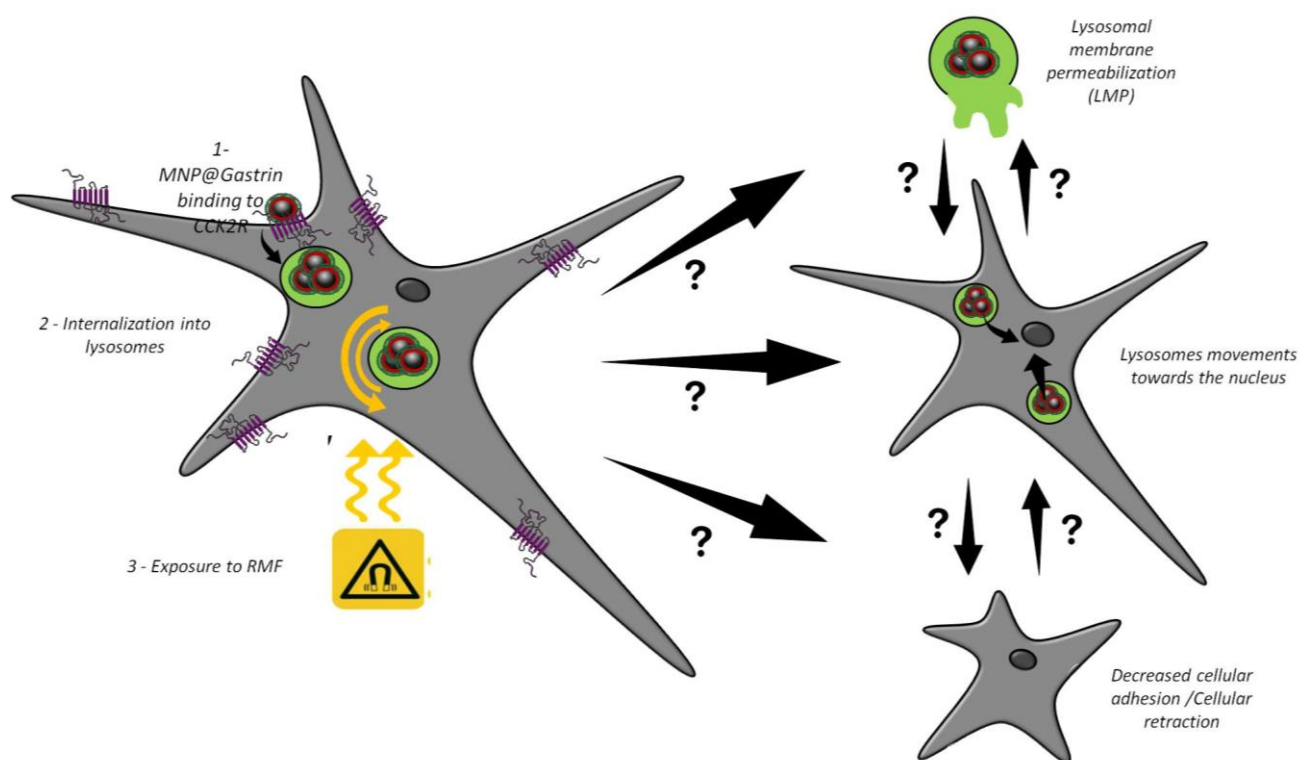


Figure 19 - Illustration schématique des phénomènes précoces observés pendant l'application du CMEM rotatif. Ces phénomènes peuvent être directement ou indirectement déclenchés par à l'application des forces mécaniques exercées par les NPM@Gastrine. Les liens de causalités entre ces phénomènes ne sont pas encore déterminés.

De plus, nous nous sommes intéressés aux étapes initiatrices au niveau lysosomal, mais aussi à la cascade de signalisation menant à la mort des CAFs.

Nous avons démontré l'implication des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) et des Cathepsines B dans la mort cellulaire, tout en écartant une possible implication des Cathepsines D. Une autre publication étudiant les CMEM et utilisant des NPM internalisées dans les lysosomes a mis en évidence une production de ROS plus élevée après traitement, mais aucune autre équipe ne s'est intéressée à l'implication des Cathepsines. Cependant, le rôle de ces deux acteurs doit être précisé, afin de déterminer s'ils participent à la perméabilisation des lysosomes, ou s'ils interviennent plus tard dans le mécanisme de mort cellulaire.

Nous avons mis en évidence que l'application du traitement combinant CMEM et NPM@Gastrine provoque une mort programmée. En effet après application du CMEM, les CAFs montraient une augmentation des marquages AnnexinV et AnnexinV/IP, mais pas du marquage IP seul. La mort cellulaire provoquée n'est donc pas nécrotique mais issue d'une mort cellulaire programmée. Pour ce qui est de la signalisation intracellulaire déclenchée, nous nous

sommes penchés sur l'implication de la caspase 1 et des caspases 3/7, et avons montré qu'elles jouent un rôle dans la mort cellulaire.

Le marquage à l'Annexin/IP et l'activation des caspases 3/7 ont été étudiés et démontrés dans d'autres travaux sur les CMEM (cf. *Tableau C - Annexes*). Notre étude est cependant la seule à avoir mis en évidence une implication de la caspase 1 dans la signalisation de mort cellulaire induit par les CMEM. Cette caspase est le témoin d'une voie de mort cellulaire atypique. Il reste à déterminer si la caspase 1 et les caspases 3/7 sont impliquées dans un même mécanisme de mort cellulaire, ou dans deux mécanismes déclenchés séparément (**Fig.20**).

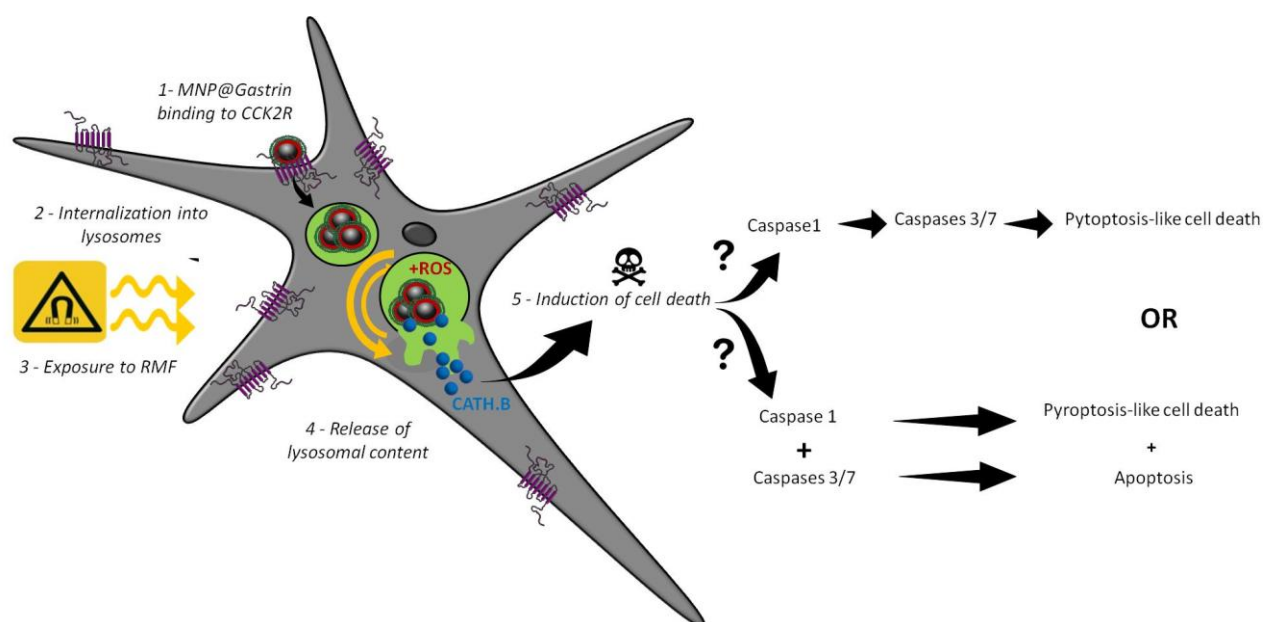


Figure 20 - Illustration schématiques des acteurs impliqués dans la mort cellulaire engendrée par les forces mécaniques exercées par les NPM@Gastrine, ainsi que les mécanismes de mort programmée possibles

En plus du mécanisme de mort des CAFs engendré par les CMEM, il serait intéressant d'étudier d'autres conséquences possibles de l'application des forces mécaniques. Par exemple, il a été démontré que les forces mécaniques exercées sur des fibroblastes sains peuvent augmenter ou diminuer leur production de collagène [329], [330]. La production de collagène par les CAFs comptant parmi leurs actions protumorales, il serait intéressant de vérifier l'effet des forces mécanique sur cette sécrétion.

Les CMEM étant capables d'induire la mort des cellules cancéreuses mais aussi des CAFs, les destructions de ces deux types cellulaires pourraient être menées conjointement en vectorisant des NPMs pour les cibler spécifiquement. Egalement, le ciblage du collagène

pourrait être envisagé afin de détruire les fibres de collagène. Cette déplétion/modification du microenvironnement, combinée à la destruction des cellules cancéreuses, pourrait permettre de surmonter les difficultés associées au traitement du cancer et notamment du cancer du pancréas.

ANNEXES

Tableau A

Nanoparticules							
Publication	Composition	Forme	Enrobage	Ciblage /Vectorisation	Dimensions	Temps d'incubation	Concentration
Kim et al.[294]	Permalloy (20% Fe, 80% Ni)	Disque	Or (5nm) : Au/NiFe/Au	Anticorps anti-IL13 α 2R (récepteur membranaire)	ϕ : 1 μ m / h : 70nm	1 h (sur glace)	10 NPMs/cellule
Dun Liu et al.[296]	Carbone (5% impuretés métalliques)	Tube	-	-	ϕ moyen: 100nm/ L :> 100nm	-	20 μ g/mL
Cho et al.[281]	Fe ₃ O ₄	Sphère	Zinc	Anticorps anti-DR4 (death receptor 4)	ϕ 15nm	30 minutes	1pM
Wang et al.[297]	Fe	Aiguille	Si	-	L=580nm l=80nm	4h	Ratios massiques : 0.01- 0.05 - 0.1 wt% dans 1mL de milieu
Contreras et al. (2014)[298]	Ni	Fil	Or (10nm-couche non continue/spot)	Anticorps anti-EGFR	L=36nm l=2,5nm	1h	150 NPM/cellules
Wen et al.[293]	Fe ₃ O ₄	Sphère irrégulière	Acide folique	-	ϕ 20nm	24h	0.125- 0.25- 0.5- 1.0 - 2.0 mg/mL
Zhang et al.[280]	Fe ₃ O ₄	Sphère	-	Anticorps anti-LAMP1 (membrane lysosomale)	ϕ 100nm	40 minutes	10mg/mL
Contreras et al. (2015)[289]	Ni	Fil	-	-	ϕ 35nm L=4 μ m	1h	2.4-12 μ g/mL
Leulmi S. et al.[299]	Permalloy (20% Fe, 80% Ni)	Disque	Or	Anticorps anti-hCA9 (biomarqueur d'hypoxie tumorale)	l=60nm ϕ 1,3-2 μ m	24h	30NPMs/cellules
Vegerhof A. et al.[248]	Fe ₃ O ₄	Sphère	-	Cetuximab (anti-EGFR utilisé en chimiothérapie)	ϕ 50,100,200	2h	2 mg/mL–10 mg/mL (in vitro) 30 mg/mL soit 300 mg par kilo de souris (in vivo)
Ju et al.[295]	Fe ₃ O ₄	Sphère	-	Anticorps anti-AFP (alpha fetal protein)	ϕ 40m	/	500 μ g/mL
Cheng Y. et al.[300]	Permalloy (20% Fe, 80% Ni)	Disque	Or (5nm) : Au / permalloy / Au	-	ϕ 2 μ m l=70nm	1h ou 24h	50 NPMs/ cellules (in vitro) 5 000 000 NPMs / souris (in vivo)
Master A.-M. et al.[282]	Fe ₃ O ₄	Sphère	Polymère (PAA-P85)	-	ϕ 7-8nm	24h	0.05 - 0,1 - 0,25 mg/mL
Martinez-Banderas A.-I. et al.[288]	Fe@Fe ₂ O ₃	Fil	BSA et APTES	- et Doxorubicine	L=7 μ m ϕ 30-40nm	24h	APTES-NPM-DOX : (8.7 μ g Fe/mL 0.44 μ M of DOX) et (26 μ g Fe/mL 1.3 μ M of DOX) BSA-NPM-DOX : (9.3 μ g Fe/mL, 0.25 μ M of DOX) et (28 μ g Fe/mL, 0.73 μ M of DOX).

Nanoparticules							
Publication	Composition	Forme	Enrobage	Ciblage /Vectorisation	Dimensions	Temps d'incubation	Concentration
Zamay et al.[292]	Ni	Disque	Or : Au/Ni/Au	AS-9 et AS-14 (aptamer)	e=50nm ø500nm	30 minutes (avec agitation)	1-2-4 ou 6 NPMs/cell (in vitro) 2·10 ⁷ NPMs/mL (in vivo)
Brossel et al.[284]	Fe	Sphère	-	-	ø100nm	18 jours (in vivo)	5mg/souris (in vivo)
M.Muroski and al[291].	SAF [Ta (2 nm) / Pt (2 nm) / CoFeB (0.9 nm) / Pt (0.4 nm) / Ru (0.9 nm) / Pt (0.4 nm) / CoFeB (0.9 nm) / Pt (2 nm)] 12	Disque	Or (5nm): Au/SAF/Au	-	e=60nm ø2µm	24h	10-20-50 NPMs/cellules neurale souches
Li W. et al.[283]	Fe304	Sphère	DMSA	-	cœur :7nm; 30nm	8h	10 µg/mL (in vitro) 100 µg/g de souris (in vivo)
Shen Y. et al.[301]	Zn _{0.4} Fe _{2.6} O ₄	Cube	PEG	Anticorps anti-EGFR	62nm	24h	100 µg/mL
Mazuel F. et al[302].	Fe304	Bâtonnet	Matrice de polymère : Poly(maleic anhydride alt-1 octadecene)	-	L=1,1µm l=110nm	2h	10 ⁶ NPMs / mL (10 ³ NPMs / cellules)
Belyanina I.V. et al.[285]	Fe203	Sphère	Or (30-40nm)	AS14 (aptamer)	ø50nm total	30 minutes	100NPMs / cell (in vitro) 1,6 µg/kg de souris (in vivo)
Mansell et al.[303]	NiFe	Disque	Or (Au/NiFe/Au)	-	ø2µm l=70nm	24h	50 NPMs/cellules
Du S. et al.[286]	Fe304	Sphère (ou légèrement elliptique)	-	-	cœur : ø12-21nm, moyenne :18nm	48h	50, 100 et 200µg/mL
Seongbeom Jeon et al.[281]	Fe3O4	Sphère	/, PGLA, arginate	-	ø10,91,127nm	24h	16,32,64,128,256,512,1024 µg/mL
Spyridopoulou K. et al.[287]	Fe3O4	Sphère	PEG	-	100nm (cœur 85nm)	48h	100 µg/ml
Chiriact et al.[290]	Fe-Cr-Nb-B	Rectangulaire	-	-	Lmajoritaire : 10-55nm (s'étale entre 10 et 200)	/	0.5-1-2-3-5mg/mL

Tableau A - Caractéristiques des nanoparticules utilisées dans les études sur les champs magnétiques basse fréquence -
Dans certains papiers (Mansel et al., Wang et al), seules les particules correspondant à la définition d'une nanoparticule ont été prises en compte dans le tableau. Une exception a été faite pour Vegerhoff et al. car les particules de plus grand diamètre (200nm) étaient comparées à des nanoparticules similaires mais plus petites, ce qui présente un intérêt. Le symbole "-" signifie que l'objet de la colonne n'existe pas dans la publication. Le symbole "/" indique que l'information n'est pas précisée par les auteurs, ou bien qu'elle n'a pas été rendue suffisamment visible pour être trouvée. Les dimensions donnée en absence de précision correspondent au diamètre du cœur et non pas au diamètre hydrodynamique, qui est plus élevé et non mesuré dans une partie des publications

Tableau B

Paramètres biologiques					
Auteurs	Date	Lignée Cellulaire	Type cellulaire	Test de localisation	Localisation des nanoparticules
Kim et al.[294]	2009	N10 (humaine)	Glioblastome (cerveau)	Microscopie haute résolution	Membrane
Dun Liu et al.[296]	2012	MCF-7 (humaine)	Tumeur mammaire (sein)	Membrane	-
Cho et al.[281]	2012	DLD-1 (humaine)	Adénocarcinome colorectal (colon)	Confocal + MEB+TEM	Membrane (70% des nanoparticules)
Wang et al.[297]	2013	Hep-G2 (humaine)	Carcinome hépatocellulaire (foie)	Microscopie	Surface des cellules
Contreras et al.[298]	2014	HCT116	Carcinome colorectal (colon)	-	-
Wen et al.[293]	2014	BEL-7402 HL7702	Carcinome hépatocellulaire Cellules saines du foie (attention: contaminées, Dérivée HeLa)	Augmentation du SS en cytométrie + Spectrométrie d'émission atomique de plasma induit par laser	Internalisation
Zhang et al.[280]	2014	INS-1 (rat) Cellules primaires d'îlots pancréatiques humains	Insulinome - pancréas	Colocalisation avec LysoTracker + Colocalisation avec LAMP1 détecté by indirect immunocytochemistry using a Cy2-tagged secondary antibody+TEM	Lysosome
Contreras et al.[289]	2015	HCT116	Carcinome colorectal (colon)	TEM	Endosome précoce, et à la membrane
Leulmi S. et al.[299]	2015	SKRC-59	Carcinome renal (rein)	Microscopie (image flou et petite d'une seule cellule)	Membrane
Vegerhof A. et al.[248]	2016	A431	Carcinome épidermoïde de la tête et du cou	-	-
Ju et al.[295]	2016	HL-7702 Bel-7402 ; HepG2	Cellules hépatiques saines Carcinome hépatocellulaire (foie)	Mesure du side scatter (SS)	Membrane: 35.6±8.3% (Bel-7402), 34.5±6.2%, (Hep-G2) 4.2±5.6% (HL-7702) (décrochage d'une partie des NPMs après le CMEM)
Cheng Y. et al.[300]	2015	U87	Glioblastome (cerveau)	TEM	Internalisées
Master A.-M. et al.[282]	2016	MDA-MB-231 BT474 MCF10A	Adénocarcinome de glande mammaire Carcinome canalaire du sein Cellules épithéliales mammaires saines	ICP-MS + Colocalisation LysoTracker+TEM	Lysosomes
Martinez-Banderas A.-I. et al.[288]	2016	MDA-MB-231	Adénocarcinome de glande mammaire	Coloration bleu de prusse + Fluorescence des NPMs en microscopie confocale	Internalisation
Zamay et al.[292]	2016	Ehrlich ascites Hépatocytes de souris Ascites de souris	Adénocarcinome Cellules saines (foie)	Image de microscopie confocale	Membrane

Paramètres biologiques					
Auteurs	Date	Lignée Cellulaire	Type cellulaire	Test de localisation	Localisation des nanoparticules
Brossel et al.[284]	2016	MDA MB 231	Adénocarcinome de glande mammaire	Coupe histologique : coloration de Perls (in vivo)	Stroma/MEC autour de la tumeur
M.Muroski and al.[291]	2016	HB1.F3.CD U87-GFP-Luc cells	Cellules souches neurales Glioblastome	Microscopie confocale	Internalisation
Li W. et al.[283]	2017	MCF-7	Adénocarcinome mammaire (sein)	-	-
Shen Y. et al.[301]	2017	U87	Glioblastome	TEM + ICP-OES +Microscopie confocale (colocalisation lysotracker)	Lysosomes
Mazuel F. et al.[302]	2017	PC3	Cancer de la prostate	SEM+TEM	Membrane
Belyanina I.V. et al.[285]	2017	Ehrlich ascites	Adénocarcinome	-	Membrane
Mansell et al.[303]	2017	U87	Glioblastome	Microscopie de contraste interférentiel	Internalisation
Du S. et al.[286]	2017	U2OS SAOS2 (humain)	Ostéosarcome (os)	TEM	Lysosomes
Seongbeom Jeon et al.[238]	2017	NIH3T3	Fibroblastes murins	Dosage chimique du fer	Internalisation ?
Spyridopoulou K. et al.[287]	2018	HT29	Cancer du colon	ICP-OES + Fluorescence des nanoparticules en microscopie confocale	Lysosome
Chiriac et al.[290]	2018	MG-63 NHDF	Osteosarcome (HOS) normal human dermal fibroblast	TEM et MEB sur les HOS seulement	Membrane et Lysosomes

Tableau B - Lignées cellulaires et localisation subcellulaire des nanoparticules utilisées dans les études sur les champs magnétiques basse fréquence

Tableau C

Champs magnétiques					
Auteurs	Date	Type	Amplitude (mT)	Fréquence (Hz)	Durée d'application (min)
Kim. et al.[294]	2009	Alternatif Uniforme	3,6,9,13	10,20,40,50,60	10
Dun Liu et al.[296]	2012	Rotatif	20,40,75	~17Hz	20
Cho et al.[281]	2012	Statique Gradient (léger)	~200 (centre)- 250(bord)	0	120
Wang et al.[297]	2013	Statique et Alternatif Gradient	200	0,2,5,10Hz	20;40;60
Contreras et al.[298]	2014	Alternatif	12;20	20	10
Wen et al.[293]	2014	Alternatif	0,7	100	150 total (ON :30 (x5) OFF:60(x4))
Zhang et al.[280]	2014	/	30	20	20
Contreras et al.[289]	2015	Alternatif	0,5	1 ou 1000	10;30
Leulmi S. et al.[299]	2015	Alternatif	30	20	60
Vegerhof A. et al.[248]	2016	Alternatif Gradient	0,62	4	In vitro:5 In vivo :30
Ju et al.[295]	2016	Alternatif	0,7	100	/
Cheng Y. et al.[300]	2015	Rotatif	1000	20	in vitro : 30 In vivo : 60
Master A.-M. et al.[282]	2016	Alternatif	62.8 ou 125.6	50	30 ou (ON:10;OFF:5) x5
Martinez-Banderas A.-I. et al.[288]	2016	Alternatif	1	10	10
Zamay et al.[292]	2016	Alternatif	10	100	10
Li W. et al.[283]	2017	Alternatif	0.1, 5, 10, 15, 20	2, 5, 10, 15, 20	60
Muroski and al.[291]	2016	Rotatif	1000	20	30
Brossel et al.[284]	2016	Statique Gradient	660	0	120
Shen Y. et al.[301]	2017	Rotatif	40	15	30 ou 30*3jours
Mazuel F. et al.[302]	2017	Statique et Rotatif	130 180	0 1	30
Belyanina et al.[285]	2017	Alternatif	10	50	10
Mansell et al.[303]	2017	Rotatif	1000	20	1
Du S. et al.[286]	2017	Rotatif	10	5	in vitro : 180 in vivo : 180 / 2jours - sur 30 jours
Seongbeom Jeon et al.[238]	2017	Statique	100	-	24h
Spyridopoulou K. et al.[287]	2018	Statique ou Alternatif ou Rotatif Gradient	40,50,60,100,150,200	0 ou 2 ou 4,8Hz	30
Chiriac et al.[290]	2018	Statique à gradient Rotatif	1	0,20,70,100	5,10,15,20

Tableau C - Paramètres d'application des champs magnétiques basse fréquence Si la configuration du champ magnétique (gradient, uniforme) n'est pas précisée, c'est que la publication n'a pas permis de la déterminer

Tableau D

Mort/survie cellulaire in vitro								
Auteurs	Dates	Tests (temps après exposition)	Résultats					
			MF-NPM-	MF-NPM+	MF+NPM-	MF+NPM+	Autre contrôle	Différence
Kim et al.[294]	2009	LDH (4h)	-	10%	-	9mT (amplitude avec effet maximal comparativement à 13,6 et 3mT): <u>10Hz</u> : 90% ; <u>20Hz</u> : 90% ; <u>40Hz</u> :75% ; <u>50Hz</u> : 25% ; <u>60Hz</u> :0%	NPM lié à anticorps non spé : <u>10Hz</u> :22% <u>20Hz</u> :20% ; <u>40Hz</u> : 0% ; <u>50Hz</u> : 5% , <u>60Hz</u> : 0%	<u>10Hz</u> : 80% ; <u>20Hz</u> :80% ; <u>40Hz</u> :65% ; <u>50Hz</u> : 15% ; <u>60Hz</u> :0%
Liu et al.[296]	2012	Bleu de Trypan (24h)	Référence	1%	-	<u>20mT</u> :+8% ; <u>40mT</u> : +17% ; <u>75mT</u> :+30%	-	<u>20mT</u> :+7% ; <u>40mT</u> : +16% ; <u>75mT</u> :+29%
Cho et al.[281]	2012	CCK8 assay (24h)	0%	5%	-	52%	TRAIL (ligand du DR-4 initiant l'apoptose) : contrôle +	47%
Wang et al.[297]	2013	Bleu de Trypan (30min)	-	-	-	<u>SME</u> : 5% ; <u>2Hz-10Hz</u> : entre 25 et 35%	—	-
Contreras et al.[298]	2014	MTT	0%	0%	-	12mT et 20mT :7,5%	NPM avec Anticorps isotope d'EGFR : <u>12mT</u> :3%, <u>20mT</u> :5%	<u>12mT</u> :4.5%, <u>20mT</u> :2.5%
Wen et al.[293]	2014	CCK8 (NPM=0,25ug/mL)	<u>BEL-7402</u> : 0,12 <u>HL7702</u> : 0,25	BEL-7402 : 0,31 HL7702 :0,45	BEL-7402 : 2,5 HL7702 :1,13	<u>BEL-7402</u> : 13,64 <u>HL7702</u> :4,65	—	<u>BEL-7402</u> : 11,14 <u>HL7702</u> :3,52
Zhang et al.[280]	2014	Annexin V 7AAD (0h)	<u>Annexin</u> : 4,5% <u>7AAD</u> : 0,6%	—	<u>Annexin</u> : 4,5% <u>7AAD</u> : 0,7%	<u>Annexin</u> : 12,5% <u>7AAD</u> : 1,7%	NPM sans anticorps anti-LAMP1 + MF : Annexin 4,5% 7AAD: 0,8%	<u>Annexin</u> : 8,5% <u>7AAD</u> : 0.9%
		Comptage de cellules : une exposition/j	5ème jour : 30*10 ⁵ cellules/mL	—	-	5ème jour : 17*10 ⁵ cellules/mL	NPM sans anticorps anti-LAMP1 +MF , 5ème jour : 28*10 ⁵ cellules/mL	Diminution du nombre de cellules de 11*10 ⁵

Mort/survie cellulaire in vitro

Auteurs	Dates	Tests (temps après exposition)	Résultats					
			MF-NPM-	MF-NPM+	MF+NPM-	MF+NPM+	Autre contrôle	Différence
		our pendant 5 Jours						
Contreras. et al. [289]	2015	MTT(0h)	0% (référence)	2,4µg/mL :7.5% 12µg/mL :11%	1Hz : 10mins:2%; 30mins :5% 1000Hz : 10mins :0%, 30mins :2%	1Hz : 2,4µg/mL 10mins : 24%, 12µg/mL 10 mins : 32% 1000Hz : 1000Hz : <u>2,4µg/mL 10mins</u> : 24% <u>12µg/mL 10mins</u> :38%	-	NB : effet similaire à 10 et 30 mins 1Hz : <u>2,4µg/mL</u> : 16.5%, <u>12µg/mL</u> : 21% 1000Hz : <u>2,4µg/mL</u> : 16.5% <u>12µg/mL</u> : 27%
Leulmi S. et al. [299]	2015	Bleu de Trypan (6h)	0% (référence)	-	-	Environ 83%	-	-
Vegerhof A. et al. [248]	2016	Bleu de trypan	-	-	-	(øNPM non précisé) <u>2mg/mL</u> : 30% <u>5mg/mL</u> :32% <u>7mg/mL</u> :41% <u>10mg/mL</u> : 51%	-	-
Ju et al. [295]	2016	Annexin V/Iodure de Propidium	0%	environ 0%	HepG2 cells :7.26±3.8% Bel-7402 cells : 4.65±1.2% HL-7702 cells : 1.05±0.5%	Bel-7402 : 18.64±5.7% HepG2 : 22.34±6.2% HL-7702 : 3.34±1.5%,	-	Bel-7402 : 11,3% HepG2 : 17,7% HL-7702 : 2,3%,
Cheng Y. et al. [300]	2015	MTT(24h)	0% (référence)	1h et 24h : RMF-NPM+=15%	RMF+NPM- =0%	1h :40% 24h :60%	-	1h :25% 24h :45%
Master A.-M. et al. [282]	2016	MTT	0% (référence)	Tout type cellulaire/concentration/champ : entre 0 et 7%	Tout type cellulaire/concentration/champ : entre 0 et 10%	MDA-MB-M1 : [MF ininterrompu, ≤0,1mg/mL, toutes amplitudes] =0%, [MF ininterrompu,0,25mg/mL, toute amplitude]=50%, [MF intermittent, toutes concentrations, toutes amplitudes]=40% BT474 : [MF ininterrompu, toutes concentrations, toutes amplitudes] =50-55% , [MF intermittent, toute concentrations, toutes amplitudes]= 75% MCF10A : [toutes concentrations, toutes amplitudes, tous temps d'exposition] = entre 0 et 20%	-	N.C.

Mort/survie cellulaire in vitro								
Auteurs	Dates	Tests (temps après exposition)	Résultats					
			MF-NPM-	MF-NPM+	MF+NPM-	MF+NPM+	Autre contrôle	Différence
						(effet non significatif)		
Martinez-Banderas et al.[288]	2016	Resazurin (72h)	0% (référence)	8,7 et 26 μFe/mL APTES-NPM : 2 et 5% APTES-NPM-DOX : 35 et 60% BSA-NPM : 2 et 9% BSA-NPM-DOX : 35 et 65%	0%	8,7 et 26 μFe/mL APTES-NPM : 16 et 29% APTES-NPM-DOX : 45 et 70% BSA-NPM : 23 et 37% BSA-NPM-DOX : 50 et 75%	Doxorubicine libre à 0,5 et 1 μ M : 85 et 85%	8,7 et 26 μFe/mL APTES-NPM : 14 et 23% APTES-NPM-DOX : 10 et 10% BSA-NPM : 21 et 28% BSA-NPM-DOX : 15 et 10%
Zamay et al.[292]	2016	Bleu de trypan	DPBS : Ascites = 30% ; Hépatocytes = 20%	-	-	Ascites : 90,95% de mort pour chaque concentration de chaque AS9NPM et AS14NPM Hépatocytes : 25%	Ascites : AS9 et AS14 : 50% de mort ; NPM = 50 à 65 % de mort pour toutes les concentrations Hépatocytes : AS9 AS14 = 20%; NPM=40%	-
M.Muroski and al.[291]	2016	MTT(24h)	0% (référence)	10 NPM/Neural stem cell : 20% 20NPM/Neural stem cell : 25% 50NPM/Neural stem cell : 40%	-	10 NPM/Neural stem cell : 28% 20NPM/Neural stem cell : 30% 50NPM/Neural stem cell : 75%	-	10 NPM/Neural stem cell : 8% 20NPM/Neural stem cell : 5% 50NPM/Neural stem cell : 35%

Mort/survie cellulaire in vitro

Auteurs	Dates	Tests (temps après exposition)	Résultats					
			MF-NPM-	MF-NPM+	MF+NPM-	MF+NPM+	Autre contrôle	Différence
Li W. et al.[283]	2017	MTT (24h)	0-10%	-	0-5% (toutes fréquences et amplitudes)	Légère augmentation de la mort avec la fréquence pour une même amplitude - Augmentation de la mort pour une fréquence donnée avec l'amplitude. Exemple fréquence 20Hz : passage de 10% pour 5mT à 25% pour 20mT (effet maximal observé)	-	N.C.
Shen Y. et al.[301]	2017	CCK8	0%	JOUR1 : 0% JOUR2 :40% JOUR3 :60%	-	JOUR 1 :55% JOUR 2 : 73% JOUR 3 :92%	-	JOUR 1 :55% JOUR 2 : 33% JOUR 3 :32%
Mazuel F. et al.[302]	2017	Resazurine (24 h post traitement)	0% (référence)	-	-	0%	-	0%
Belyanina . et al.[285]	2017	-	-	-	-	-	-	-
Mansell et al.[303]	2017	Bleu de trypan	0%	1%	-	12 ± 2%	-	11%
Du S. et al.[286]	2017	CCK8	0%	U2OS : <u>50µg/mL</u> : 10% ; <u>100µg/mL</u> : 40% ; 200µg/mL :45% SAOS2 : <u>0µg/mL</u> : 10% ; <u>100µg/mL</u> : 35% <u>200µg/mL</u> :50%	0%	U2OS : <u>50µg/mL</u> : 10% ; <u>100µg/mL</u> : 45% ; <u>200µg/mL</u> :70% SAOS2 : <u>50µg/mL</u> : 0% ; <u>100µg/mL</u> : 50% ; 200µg/mL :70%	-	U2OS : <u>50µg/mL</u> : 0%; <u>100µg/mL</u> : 10% ; <u>200µg/mL</u> :25% SAOS2 : <u>50µg/mL</u> : 0%; <u>100µg/mL</u> : 15% ; <u>200µg/mL</u> :25%

Mort/survie cellulaire in vitro								
Auteurs	Dates	Tests (temps après exposition)	Résultats					
			MF-NPM-	MF-NPM+	MF+NPM-	MF+NPM+	Autre contrôle	Différence
Seongbeom Jeon et al.[238]	2017	CCK8	0%	NPM 16 µg/mL : 5% 128 µg/mL : 35% 1024 µg/mL:55% PLGA NPM: 16 µg/mL : 5% 128 µg/mL : 25% 256 µg/mL :25% 1024 µg/mL:40% Alginate NPM: 16 µg/mL : 10% 128 µg/mL : 35% 256 µg/mL :40% 1024 µg/mL:65%	-	NPM 16 µg/mL : 35% 128 µg/mL : 50% 1024 µg/mL : 85% PLGA NPM: 16 µg/mL : 10% 128 µg/mL : 25% 256 µg/mL :32% 1024 µg/mL: 40% Alginate NPM: 16 µg/mL : 20% 128 µg/mL : 32%, 256 µg/mL :50% 1024 µg/mL:70%	-	NPM 16 µg/mL : 30% 128 µg/mL : 15% 1024 µg/mL : 30% PLGA NPM: 16 µg/mL : 5% 128 µg/mL : 0% 256 :8% 1024 µg/mL: 0% Alginate NPM: 16 µg/mL : 10% 128 µg/mL : 0% 256 µg/mL :10% 1024 µg/mL : 5%
Spyridopoulos K. et al.[287]	2018	Sulforhodamine B (SRB)	0% (référence)	0 à 10%	STATIQUE <100mT :2à15%; 100mT : 20% ;200mT :35% ALTERNATIF : croissance cellulaire plus élevée par rapport à MF-NP- ROTATIF : 5 à 15% de mort	STATIQUE <100mT :2à18%; <u>100mT</u> : 37%; <u>200mT</u> :53% ALTERNATIF (par rapport à NPM-MF-) : croissance cellulaire plus élevée ROTATIF : < <u>200mT</u> : de 5 à 25%; <u>200mT</u> : 50%	-	STATIQUE <100mT :0à3%; <u>100mT</u> : 17%; <u>200mT</u> :18% ALTERNATIF (par rapport à NPM-MF+) : <u>(4Hz,70mT)</u> = -30% ; <u>(8Hz70mT)</u> = -15% ; <u>(4Hz,100mT)</u> = -15% ; <u>(8Hz100mT)</u> =-32% ROTATIF : < <u>150mT</u> : de 0 à 15%; <u>200mT</u> : 30%

Mort/survie cellulaire in vitro								
Auteurs	Dates	Tests (temps après exposition)	Résultats					
			MF-NPM-	MF-NPM+	MF+NPM-	MF+NPM+	Autre contrôle	Différence
Chiriac et al.[290]	2018	MTT(24h)	0% (référence)	0-2%	-	STATIQUE (HOS) : entraîne environ 5-10% de mort en moins comparativement au rotatif ROTATIF (HOS) : [20Hz, 10 minutes]: <u>0,5mg/mL</u> :12%; <u>1mg/mL</u> :23%; <u>2mg/mL</u> : 25%; <u>3mg/mL</u> : 52%; <u>5mg/mL</u> : 88% [20Hz,2mg/mL]: <u>5 mins</u> :15%; <u>10mins</u> :22%; <u>15mins</u> :30%; <u>20mins</u> :46%; [10mins,2mg/mL]= 20Hz :22%; <u>50Hz</u> : 32%; <u>70Hz</u> :22%; <u>100Hz</u> :20% ROTATIF (NHDS) <u>[20Hz,10mins,2mg/mL]</u> : 0%	-	-

Tableau D - Quantification de l'effet délétère sur les cellules pour les traitements associant des nanoparticules et des champs magnétiques basse fréquence. Pour plus de simplicité les valeurs du tableau correspondent à la diminution de la survie cellulaire/taux de mortalité cellulaire. Le symbole "-" signifie que l'objet de la colonne n'existe pas dans la publication (ou que l'information n'est pas précisée par les auteurs, ou bien qu'elle n'a pas été rendue suffisamment visible pour être trouvée.). La colonne Différence représente l'effet MF+ NPM+ diminué de la valeur de mort cellulaire la plus élevée provoquée par l'un des contrôles (N.C. signifie que la valeur n'a pas été calculée pour ce tableau). Souvent les valeurs n'ont pas été tiré du texte de l'article, mais d'une observation des graphes. Il se peut que des erreurs dans les valeurs exactes se soient donc glissées ici et là.

Tableau E

Mécanismes in vitro						
Auteurs	Hypothèse	Test (temps après exposition)	MF-NPM-	MF-NPM+	MF+NPM-	MF+NPM+
Kim. et al.[294]	Les microdisques n'exercent pas une force suffisante pour détruire la membrane (d'après calcul) donc la mort n'est pas seulement due à une perméabilisation de la membrane, mais également à une apoptose induite	TUNEL (4h)	"contrôle négatif" : Entre 5 et 10%	-	-	20Hz ; 3mT :20% ; 6mT : 30% 9mT: 60% ,13mT : 35%
Dun Liu et al.[296]	Création de pores dans la membrane plasmique entraînant la mort	Iodure de Propidium (0h)	-	+	+	Augmentation du marquage par rapport aux contrôle RMF+NP- ET RMF-NP+
		LDH (24h)	x (référence)	0,9x	-	40mT :1,8x 75mT: 1,6x
		AFM	+	+	+	Pores membranaires observés, augmentation de la rugosité de la membrane
Cho et al.[281]	Le récepteur en se trimérisant est connu pour déclencher l'apoptose. Le traitement MF+NP+ crée des clusters de récepteurs et de NPs, ce qui déclenche l'apoptose.	Activation caspase 8 et3 (images)	-	Test 5,10,20,50,100,200, 640mT	-	Augmentation de la mort avec augmentation de l'amplitude. A partir de 200 mT : stagnation (force entre 30 et 35 fN)
		AnnexinV/Pi (images)	-	+	-	Augmentation du marquage par rapport au contrôle RMF- NP-, RMF-NP+,RMF+NP-, Anticorps seul, Anticorps-NPM non magnétique RMF+et-, Anticorps non spé-NPM RMF+ et RMF-
Wen et al[293]	Apoptose	Annexin/PI (0h)	BEL-7402 : 0,1% et HL7702 : 0,2%	BEL-7402 : 0,3% et HL7702 : 0,4%	BEL-7402 : 2.5% et HL7702 : 1%	BEL-7402 : NPM=0,125µg/mL : 5% NPM=0,25µg/m:13% NPM=0,5µg/m:22% NPM=1µg/m:27% NPM=2µg/m:28% HL7702 : NPM=0,125µg/mL : 1% NPM=0,25µg/m:2,5% NPM=0,5µg/m:4% NPM=1µg/m:5% NPM=2µg/m:5%
Zhang et al.[280]	LMP suivi d'une apoptose	Mesure fluorescence lysotracker 7AAD et Annexin 5	-	Référence	-	75% de diminution de fluorescence du lysotracker Marquage +8% Annexin, +1% 7AAD
Contreras al.(2015)[289]	Ouverture de canaux mécanosensibles qui provoquent la perméabilisation membranaire et la réorganisation du cytosquelette OU rupture de la	LDH (30mins)	-	10%	-	2,4 et 12µg/mL : 32 % (référence 100% : cellules lysées)

Mécanismes in vitro						
Auteurs	Hypothèse	Test (temps après exposition)	MF-NPM-	MF-NPM+	MF+NPM-	MF+NPM+
	membrane (0.2pN/nanoparticule)					
Leulmi S. et al.	Perturbation en membrane qui se transmet via un signal induisant l'apoptose	Caspase 3/7 (images) Marquage Annexin V/ IP(image)	Référence	-	-	Augmentation du marquage
Ju et al.[295]	Perturbation des échanges ioniques par les NPMs à la membrane plasmique : la présence des NPMs augmente l'effet du champ, menant à l'apoptose.	Immunoblot de BAX et Bcl2 (Ratio Bcl2/BAC)	Pas de ratios quantifiés, image du blot	Pas de ratios quantifiés, image du blot	<u>Bel-7402</u> =0,93; <u>HepG2</u> =0,91; <u>HL-7702</u> =0,99 (Augmentation visuelle de l'expression des Bcl2 et BAX pour RMF+NPM- par rapport aux autres contrôles)	<u>Bel-7402</u> =0.84 ; <u>HepG2</u> =0,82; <u>HL-7702</u> =0,98 (+augmentation visuelle sur le blot de l'expression des deux protéines par rapport aux contrôles)
		Annexin	+	+	<u>HepG2</u> : 7.26±3.8% Bel-7402 4.65±1.2% HL-7702 1.05±0.5% of	<u>HepG2</u> : 22.34±6.2%, Bel-7402 18.64±5.7%, HL-7702 3.34±1.5%
		influx d'anions	Bel-7402=2,1, HepG2=2,2 and HL-7702=1,2pA (références)	-	<u>Bel-7402</u> = -42.9% ; <u>HepG2</u> =-40.0% ; <u>HL-7702</u> =-25.0% (diminution de l'influx d'anion)	<u>Bel-7402</u> =-57.1% ; <u>HepG2</u> =-54.5% ; <u>HL-7702</u> = -25.7%
Cheng Y. et al.[300]	Perméabilisation de la membrane plasmique menant à une mort cellulaire programmée	7-AAD (in vitro) + Caspase 3/TUNEL (in vivo)	-	Référence	-	5mins : 89,3% de cellules marquées 30mins : 87% de cellules marquées + 20% de cellules apoptotiques
Master A.-M. et al.[282]	Les NPMs s'accumulent puis tournent dans les lysosomes, générant un stress mécanique sur le cytosquelette et ne provoquant pas de LMP.	Lysotracker/Acridine orange (MF discontinus 62mT) -images	+	+	-	Pas de LMP (comparaison également à un contrôle positif traité à l'H2O2)
		Co-traitement à la Cytochalasine D	+	+	-	Permet l' augmentation de la mort des MCF10A insensibles au champ : [<u>MF 60mT, continu/discontinus, 0,1mg/ml</u>]=75%
Zamay et al.[292]	Apoptose/inhibition de canaux ioniques	Niveau de potassium and sodium mesuré par PBFI et SBFI	+	-	-	Diminution de 33.4% (AS9) et 7.1% (AS14) du sodium intracellulaire
		Annexin V-Cy3 et 6-carboxyfluorescei	-	-	-	Augmentation du marquage Annexin

Mécanismes in vitro						
Auteurs	Hypothèse	Test (temps après exposition)	MF-NPM-	MF-NPM+	MF+NPM-	MF+NPM+
		ndiacetate (6-CFDA) (image de confocal)				
Muroski and al[291].	Perméabilisation de la membrane plasmique	7 AAD	-	+	-	NSC et U87 : augmentation du marquage
		Fluorescence Luciférase (U87)				0,5NSC/U87 : 28% 1NSC/U87 :50% 5NSC/U87 :65%
Shen Y. et al.[301]	Rupture de la membrane lysosomale et de la membrane plasmique par les NPMs, ce qui provoque deux mécanismes distincts : à la fois la nécrose et l'apoptose.	Galactine 3 fluorescente (image de microscopie confocale)	Diffuse	Diffuse	-	Ponctiforme
		Observation des membranes lysosomales et de la membrane plasmique (TEM)	-	-	-	Membranes plasmique et lysosomales endommagées
		Calcéine AM/PI (image de microscopie confocale)	+	+	-	Diminution marquage vert calcéine, augmentation marquage rouge PI
		PI (0h)	1.7%	2%	-	57%
		Annexin/PI (24h)	9,2%((Annexin :2,7%;Annexin/PI :5,5%;PI :1%)	7,1%(Annexin :2,8%;Annexin/PI :3,5%;PI :0,8%)	-	22,3% (Annexin :3,8%, AnnexinPI :16,9%;PI :5,5%)
Mazuel. et al.[302]	Le premier champ statique empêche l'internalisation et provoque l'aggrégation des NPMs. Le deuxième champ fait tourner les agrégats : la cellule absorbe le torque induit et n'est pas endommagée.	Microscopie	-	-	-	Rotation des agrégats observés dans le sens inverse du champ après arrêt de l'exposition. La membrane est imbriquée dans les NPMS après champ tournant ce qui explique la rotation en sens inverse.
Belyanina et al.[285]	Apoptose induite par les oscillations des nanoparticules via leur action sur les intégrines +Nécrose.	Caspase 3/7 (3h)	11%	-	-	35%
		Iodure de Propidium (2h)	référence	-	-	Augmentation du marquage (pas de quantification)
		Annexin V-Cy3/CFDA	+	-	-	Augmentation du marquage Annexin et diminution du CFDA . La majorité des cellules annexin+ sont CFDA- (mais pas toutes, nécrose?)

Mécanismes in vitro						
Auteurs	Hypothèse	Test (temps après exposition)	MF-NPM-	MF-NPM+	MF+NPM-	MF+NPM+
		sodium-sensitive dye, SBF1	+	-	-	Augmentation du sodium intracellulaire : nécrose
Du S. et al.[286]	Déclenchement de mort par autophagie et par apoptose	LDH	0%	50µg/mL : 0%(U2OS et SAOS2) ; 100µg/mL : 30% (U2OS) 25%(SAOS2) ; 200µg/mL :45% (U2OS) 40% (SAOS2)	0%	50µg/mL : 0% (U2OS et SAOS2) ; 100µg/mL : 40% (U2OS) 35%(SAOS2) ; 200µg/mL :60% (U2OS et SAOS2)
		Annexin V/7-AAD	9-10%	100µg/mL : 14% (U2OS) 15%(SAOS2) ; 200µg/mL :18% (U2OS) 19% (SAOS2)	8-10%	100µg/mL : 29% (U2OS) 27%(SAOS2) ; 200µg/mL :35% (U2OS) 34% SAOS2
		Bax/Bcl2 (ratio)	0,2	100µg/mL : 1,5 (U2OS) 2,2(SAOS2) ; 200µg/mL :5,5(U2OS) 7 (SAOS2)	0,2	100µg/mL : 3(U2OS) 3,4(SAOS2) ; 200µg/mL :7,2(U2OS) 11 (SAOS2)
		Potentiel de la membrane mitochondriale (JC-1)	0,2	100µg/mL : 25 (U2OS) 15(SAOS2)	0,2	100µg/mL : 70(U2OS) 45(SAOS2)
		Autophagy (LC3) - images de microscopie confocale	+	U2OS et SAOS2 : faible augmentation de la fluorescence	+	U2OS et SAOS2 : forte augmentation de la fluorescence
		Production de ROS (fold par rapport à RMF-NPM-)	x	1,5x et 1,25 x (US2OS et SAOS2)	1x	4,2 x et 3,8 x(U2OS et SAOS2)
		Activation caspase 3/7 Caspase 8	x	Environ 1x	6 et 8(U2OS et SAOS2) 5 et 8(U2OS et SAOS2)	12 et 13(U2OS et SAOS2) 8 et 10(U2OS et SAOS2)
Chiriatic et al.[290]	Rupture de la membrane plasmique	LIVE/DEAD assay (microscopie confocale)	-	+	-	Augmentation du nombre de cellules rouges (mortes) par rapport aux cellules vertes (vivantes)

Tableau E- Mécanismes de mort étudiés in vitro des traitements associant des nanoparticules et des champs magnétiques basse fréquence. Le symbole "-" signifie que le contrôle n'existe pas dans la publication (ou que l'information n'est pas précisée par les auteurs, ou bien qu'elle n'a pas été rendue suffisamment visible pour être trouvée.) tandis que le symbole "+" signifie que le contrôle a été réalisé. La colonne Hypothèse rapporte l'hypothèse évoquée par les auteurs de la publication. Parfois les valeurs n'ont pas été tirées du texte de l'article, mais d'une observation des graphes, il se peut donc que des erreurs dans les valeurs exactes se soient glissées ici et là

BIBLIOGRAPHIE

- [1] D. Hanahan et R. A. Weinberg, « Hallmarks of cancer: the next generation », *Cell*, vol. 144, n° 5, p. 646-674, mars 2011.
- [2] D. Ribatti et E. Crivellato, « “Sprouting angiogenesis”, a reappraisal », *Developmental Biology*, vol. 372, n° 2, p. 157-165, déc. 2012.
- [3] R. M. Lafrenie, C. A. Buckner, et M. A. Bewick, « Cell adhesion and cancer: is there a potential for therapeutic intervention? », *Expert Opin. Ther. Targets*, vol. 11, n° 6, p. 727-731, juin 2007.
- [4] S. Hirohashi et Y. Kanai, « Cell adhesion system and human cancer morphogenesis », *Cancer Sci.*, vol. 94, n° 7, p. 575-581, juill. 2003.
- [5] Y. A. Fouad et C. Aanei, « Revisiting the hallmarks of cancer », *American journal of cancer research* vol. 7,5 1016-1036. 1 May. 2017 p. 21.
- [6] P. Rawla, T. Sunkara, et V. Gaduputi, « Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors », *World J Oncol*, vol. 10, n° 1, p. 10-27, févr. 2019.
- [7] « Cancers du pancréas : les traitements | Fondation ARC pour la recherche sur le cancer ». [En ligne]. Disponible sur: <https://www.fondation-arc.org/cancer/cancer-pancreas/traitement-cancer>.
- [8] F. Noble *et al.*, « International Union of Pharmacology. XXI. Structure, Distribution, and Functions of Cholecystokinin Receptors », *Pharmacol Rev*, vol. 51, n° 4, p. 745-781, déc. 1999.
- [9] Silvente-Poirot S. et al. « The peripheral cholecystokinin receptors - European Journal of Biochemistry - Wiley Online Library ».1993.
- [10] M. Pohl, S. Silvente-Poirot, J. R. Pisegna, N. I. Tarasova, et S. A. Wank, « Ligand-induced Internalization of Cholecystokinin Receptors: DEMONSTRATION OF THE IMPORTANCE OF THE CARBOXYL TERMINUS FOR LIGAND-INDUCED INTERNALIZATION OF THE RAT CHOLECYSTOKININ TYPE B RECEPTOR BUT NOT THE TYPE A RECEPTOR », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, n° 29, p. 18179-18184, juill. 1997.
- [11] R. Magnan, B. Masri, C. Escrieut, M. Foucaud, P. Cordelier, et D. Fourmy, « Regulation of Membrane Cholecystokinin-2 Receptor by Agonists Enables Classification of Partial Agonists as Biased Agonists », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, n° 8, p. 6707-6719, févr. 2011.
- [12] P. H. Anborgh, J. L. Seachrist, L. B. Dale, et S. S. Ferguson, « Receptor/beta-arrestin complex formation and the differential trafficking and resensitization of beta2-adrenergic and angiotensin II type 1A receptors », *Mol. Endocrinol.*, vol. 14, n° 12, p. 2040-2053, déc. 2000.
- [13] D. S. Weinberg, B. Ruggeri, M. T. Barber, S. Biswas, S. Miknyocki, et S. A. Waldman, « Cholecystokinin A and B receptors are differentially expressed in normal pancreas and pancreatic adenocarcinoma. », *Journal of Clinical Investigation*, vol. 100, n° 3, p. 597-603, août 1997.
- [14] Rai, « Heterogeneous expression of cholecystokinin and gastrin receptor in stomach and pancreatic cancer: An immunohistochemical study ». *J Can Res Ther* 2016;12:411-6 .
- [15] J. P. Smith, G. Liu, V. Soundararajan, P. J. McLaughlin, et I. S. Zagon, « Identification and characterization of CCK-B/gastrin receptors in human pancreatic cancer cell lines », *Am. J. Physiol.*, vol. 266, n° 1 Pt 2, p. R277-283, janv. 1994.
- [16] R. Moonka, W. Zhou, et R. H. Bell, « Cholecystokinin-a receptor messenger RNA expression in human pancreatic cancer », *Journal of Gastrointestinal Surgery*, vol. 3, n° 2, p. 134-140, mars 1999.

- [17] J. P. Smith et T. E. Solomon, « Cholecystokinin and pancreatic cancer: the chicken or the egg? », *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 306, n° 2, p. G91-G101, janv. 2014.
- [18] C. Tang, I. Biemond, et C. B. Lamers, « Expression of peptide receptors in human endocrine tumours of the pancreas », *Gut*, vol. 40, n° 2, p. 267-271, févr. 1997.
- [19] J. P. Smith *et al.*, « Cholecystokinin Receptor Antagonist Halts Progression of Pancreatic Cancer Precursor Lesions and Fibrosis in Mice »:, *Pancreas*, vol. 43, n° 7, p. 1050-1059, oct. 2014.
- [20] Nijaguna B. Prasad et al. « Gene Expression Profiles in Pancreatic Intraepithelial Neoplasia Reflect the Effects of Hedgehog Signaling on Pancreatic Ductal Epithelial Cells | ». *Cancer Research*. 2005
- [21] P. Clerc *et al.*, « Expression of CCK2 receptors in the murine pancreas: Proliferation, transdifferentiation of acinar cells, and neoplasia », *Gastroenterology*, vol. 122, n° 2, p. 428-437, févr. 2002.
- [22] J. P. Smith, M. W. Hamory, M. F. Verderame, et I. S. Zagon, « Quantitative analysis of gastrin mRNA and peptide in normal and cancerous human pancreas. », *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 2, n° 3, p. 309-324, sept. 1998.
- [23] JP Smith et al. « Gastrin regulates growth of human pancreatic cancer in a tonic and autocrine fashion | ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 1996
- [24] M. Caplin *et al.*, « Expression and processing of gastrin in pancreatic adenocarcinoma. », *Br J Surg*, vol. 87, p. 1035-1040, août 2000.
- [25] Matters, Gail L et al. "Growth of human pancreatic cancer is inhibited by down-regulation of gastrin gene expression." *Pancreas* vol. 38,5 (2009):
- [26] J. P. Smith, M. F. Verderame, E. N. Ballard, et I. S. Zagon, « Functional significance of gastrin gene expression in human cancer cells », *Regulatory Peptides*, vol. 117, n° 3, p. 167-173, mars 2004.
- [27] J. Burks *et al.*, « Cholecystokinin Receptor-Targeted Polyplex Nanoparticle Inhibits Growth and Metastasis of Pancreatic Cancer », *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, vol. 6, n° 1, p. 17-32, 2018.
- [28] K. K. Fino, G. L. Matters, C. O. McGovern, E. L. Gilius, et J. P. Smith, « Downregulation of the CCK-B receptor in pancreatic cancer cells blocks proliferation and promotes apoptosis », *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 302, n° 11, p. G1244-G1252, juin 2012.
- [29] JP. Smith et al. « Cholecystokinin receptors and PANC-1 human pancreatic cancer cells | ». *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 1993
- [30] R. O. Hynes, « The Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils », *Science*, vol. 326, n° 5957, p. 1216-1219, nov. 2009.
- [31] P. Lu, V. M. Weaver, et Z. Werb, « The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression », *The Journal of Cell Biology*, vol. 196, n° 4, p. 395-406, févr. 2012.
- [32] K. Räsänen et A. Vaheri, « Activation of fibroblasts in cancer stroma », *Experimental Cell Research*, vol. 316, n° 17, p. 2713-2722, oct. 2010.
- [33] R. R. Langley et I. J. Fidler, « The seed and soil hypothesis revisited-The role of tumor-stroma interactions in metastasis to different organs », *International Journal of Cancer*, vol. 128, n° 11, p. 2527-2535, juin 2011.
- [34] F. Chen *et al.*, « New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities », *BMC Medicine*, vol. 13, n° 1, déc. 2015.
- [35] S. Goel, A. H.-K. Wong, et R. K. Jain, « Vascular Normalization as a Therapeutic Strategy for Malignant and Nonmalignant Disease », *Cold Spring Harb Perspect Med*, vol. 2, n° 3, mars 2012.

- [36] A. Dutour et M. Rigaud, « Tumor endothelial cells are targets for selective therapies: In vitro and in vivo models to evaluate antiangiogenic strategies », *Anticancer research*, vol. 25, p. 3799-807, nov. 2005.
- [37] B. I. Terman et M. Dougher-Vermazen, « Biological properties of VEGF/VPF receptors », *Cancer Metast Rev*, vol. 15, n° 2, p. 159-163, juin 1996.
- [38] Donald M MacDonald et Peter Choyke « Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic - Semantic Scholar ». *Nature Medicine*. 2003
- [39] F. Ghiringhelli, « surveillance immune antitumorale et échappement », p. 5, 2013.
- [40] S. Ostrand-Rosenberg, « Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity », *Current Opinion in Genetics & Development*, vol. 18, n° 1, p. 11-18, févr. 2008.
- [41] Man, Yan-Gao et al. "Tumor-infiltrating immune cells promoting tumor invasion and metastasis: existing theories." *Journal of Cancer* vol. 4,1 (2013):
- [42] M. Terabe et J. A. Berzofsky, « Immunoregulatory T cells in tumor immunity », *Current Opinion in Immunology*, vol. 16, n° 2, p. 157-162, avr. 2004.
- [43] M. Terme et C. Tanchot, « [Immune system and tumors] », *Ann Pathol*, vol. 37, n° 1, p. 11-17, févr. 2017.
- [44] Alberto Mantovani et al. « Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion " *Cancer and Metastasis Reviews*. 2006
- [45] R. Wang *et al.*, « Tumor-associated macrophages provide a suitable microenvironment for non-small lung cancer invasion and progression », *Lung Cancer*, vol. 74, n° 2, p. 188-196, nov. 2011.
- [46] S. B. Coffelt, R. Hughes, et C. E. Lewis, « Tumor-associated macrophages: Effectors of angiogenesis and tumor progression », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, vol. 1796, n° 1, p. 11-18, août 2009.
- [47] J. W. Pollard, « Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer », *J Leukoc Biol*, vol. 84, n° 3, p. 623-630, sept. 2008.
- [48] A. Sica, P. Allavena, et A. Mantovani, « Cancer related inflammation: The macrophage connection », *Cancer letters*, vol. 267, p. 204-15, mai 2008.
- [49] M. J. Bissell, P. A. Kenny, et D. C. Radisky, « Microenvironmental Regulators of Tissue Structure and Function Also Regulate Tumor Induction and Progression: The Role of Extracellular Matrix and Its Degrading Enzymes », *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, vol. 70, p. 343, 2005.
- [50] N. Ilan, M. Elkin, et I. Vlodavsky, « Regulation, function and clinical significance of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis », *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 38, n° 12, p. 2018-2039, janv. 2006.
- [51] Kessenbrock, Kai et al. "Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment." *Cell* vol. 141,1 (2010): 52-67. doi:10.1016/j.cell.2010.03.015
- [52] X. Zou *et al.*, « Up-regulation of type I collagen during tumorigenesis of colorectal cancer revealed by quantitative proteomic analysis », *Journal of Proteomics*, vol. 94, p. 473-485, déc. 2013.
- [53] D. Öhlund, C. Lundin, B. Ardnor, M. Öman, P. Naredi, et M. Sund, « Type IV collagen is a tumour stroma-derived biomarker for pancreas cancer », *British Journal of Cancer*, vol. 101, n° 1, p. 91, juin 2009.
- [54] Paszek. al et, « Tensional homeostasis and the malignant phenotype. - PubMed - NCBI ». *Cancer cell*. 2005
- [55] T. Armstrong *et al.*, « Type I Collagen Promotes the Malignant Phenotype of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma », *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 10, p. 7427-37, déc. 2004.

- [56] S. Berchtold *et al.*, « Collagen type V promotes the malignant phenotype of pancreatic ductal adenocarcinoma », *Cancer Letters*, vol. 356, n° 2, Part B, p. 721-732, janv. 2015.
- [57] S. Kaushik, M. W. Pickup, et V. M. Weaver, « From transformation to metastasis: deconstructing the extracellular matrix in breast cancer », *Cancer Metastasis Rev*, vol. 35, n° 4, p. 655-667, déc. 2016.
- [58] Q. Xiao et G. Ge, « Lysyl Oxidase, Extracellular Matrix Remodeling and Cancer Metastasis », *Cancer Microenvironment*, vol. 5, n° 3, p. 261, déc. 2012.
- [59] Z.-H. Zhou, C.-D. Ji, H.-L. Xiao, H.-B. Zhao, Y.-H. Cui, et X.-W. Bian, « Reorganized Collagen in the Tumor Microenvironment of Gastric Cancer and Its Association with Prognosis », *J. Cancer*, vol. 8, n° 8, p. 1466-1476, 2017.
- [60] M. R. Ng et J. S. Brugge, « A Stiff Blow from the Stroma: Collagen Crosslinking Drives Tumor Progression », *Cancer Cell*, vol. 16, n° 6, p. 455-457, déc. 2009.
- [61] Levental, Kandice R et al. "Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling." *Cell* vol. 139,5 (2009): 891-906. doi:10.1016/j.cell.2009.10.027
- [62] P. P. Provenzano, K. W. Eliceiri, J. M. Campbell, D. R. Inman, J. G. White, et P. J. Keely, « Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion », *BMC Medicine*, vol. 4, p. 38, 2006.
- [63] D. Kadel, Y. Zhang, H.-R. Sun, Y. Zhao, Q.-Z. Dong, et L. Qin, « Current perspectives of cancer-associated fibroblast in therapeutic resistance: potential mechanism and future strategy », *Cell Biology and Toxicology*, janv. 2019.
- [64] D. Hanahan et L. M. Coussens, « Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment », *Cancer Cell*, vol. 21, n° 3, p. 309-322, mars 2012.
- [65] M. Shimoda, K. T. Mellody, et A. Orimo, « Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression », *Seminars in Cell & Developmental Biology*, vol. 21, n° 1, p. 19, févr. 2010.
- [66] Kalluri, R., Zeisberg « Fibroblasts in cancer ». *Nat Rev Cancer* 2006
- [67] Y. Kojima *et al.*, « Autocrine TGF-beta and stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling drives the evolution of tumor-promoting mammary stromal myofibroblasts », nov. 2010.
- [68] Y. Attieh et D. M. Vignjevic, « The hallmarks of CAFs in cancer invasion », *European Journal of Cell Biology*, vol. 95, n° 11, p. 493-502, nov. 2016.
- [69] Butcher, Darci T et al. "A tense situation: forcing tumour progression." *Nature reviews. Cancer* vol. 9,2 (2009): 108-22. doi:10.1038/nrc2544
- [70] Samuel, Michael S et al. "Actomyosin-mediated cellular tension drives increased tissue stiffness and β -catenin activation to induce epidermal hyperplasia and tumor growth." *Cancer cell* vol. 19,6 (2011): 776-91. doi:10.1016/j.ccr.2011.05.008
- [71] F. Calvo *et al.*, « Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts », *Nature Cell Biology*, vol. 15, n° 6, p. 637-646, juin 2013.
- [72] H. Sugimoto, T. M. Mundel, M. W. Kieran, et R. Kalluri, « Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment », *Cancer Biology & Therapy*, vol. 5, n° 12, p. 1640-1646, déc. 2006.
- [73] Rhim, Andrew D et al. "Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma." *Cancer cell* vol. 25,6 (2014): 735-47. doi:10.1016/j.ccr.2014.04.021
- [74] « Özdemir, Berna C et al. "Depletion of carcinoma-associated fibroblasts and fibrosis induces immunosuppression and accelerates pancreas cancer with reduced survival." *Cancer cell* vol. 25,6 (2014):
- [75] M. Wang *et al.*, « Role of tumor microenvironment in tumorigenesis », *Journal of Cancer*, vol. 8, n° 5, p. 761-773, 2017.

- [76] R. Kalluri, « The biology and function of fibroblasts in cancer », *Nature Reviews Cancer*, vol. 16, n° 9, p. 582-598, sept. 2016.
- [77] C. Chantrain et Y. A. DeClerck, « Les métalloprotéases matricielles et leurs inhibiteurs synthétiques dans la progression tumorale », *Med Sci (Paris)*, vol. 18, n° 5, p. 565-575, mai 2002.
- [78] Jodele. S. al et, « Modifying the soil to affect the seed: role of stromal-derived matrix metalloproteinases in cancer progression. - *Cancer Metastasis Rev* 2006
- [79] Têtu, Bernard et al. "The influence of MMP-14, TIMP-2 and MMP-2 expression on breast cancer prognosis." *Breast cancer research : BCR* vol. 8,3 (2006): R28. doi:10.1186/bcr1503
- [80] S. P. Turunen, O. Tatti-Bugaeva, et K. Lehti, « Membrane-type matrix metalloproteases as diverse effectors of cancer progression », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1864, n° 11, Part A, p. 1974-1988, nov. 2017.
- [81] John E Park et al « Fibroblast Activation Protein, a Dual Specificity Serine Protease Expressed in Reactive Human Tumor Stromal Fibroblasts ». *Journal of Biochemistry* 1999
- [82] A. Glentis *et al.*, « Cancer-associated fibroblasts induce metalloprotease-independent cancer cell invasion of the basement membrane », *Nat Commun*, vol. 8, n° 1, p. 1-13, oct. 2017.
- [83] H.-O. Lee, S. R. Mullins, J. Franco-Barraza, M. Valianou, E. Cukierman, et J. D. Cheng, « FAP-overexpressing fibroblasts produce an extracellular matrix that enhances invasive velocity and directionality of pancreatic cancer cells », *BMC Cancer*, vol. 11, p. 245, 2011.
- [84] D. Pankova *et al.*, « Cancer-Associated Fibroblasts Induce a Collagen Cross-link Switch in Tumor Stroma », *Molecular Cancer Research*, vol. 14, n° 3, p. 287-295, mars 2016.
- [85] Chen, Yulong et al. "Lysyl Hydroxylase 2 Is Secreted by Tumor Cells and Can Modify Collagen in the Extracellular Space." *The Journal of biological chemistry* vol. 291,50 (2016): 25799-25808. doi:10.1074/jbc.M116.759803
- [86] Barker, Holly E et al. "Tumor-secreted LOXL2 activates fibroblasts through FAK signaling." *Molecular cancer research : MCR* vol. 11,11 (2013): 1425-36. doi:10.1158/1541-7786.MCR-13-0033-T
- [87] S. Torres *et al.*, « LOXL2 Is Highly Expressed in Cancer-Associated Fibroblasts and Associates to Poor Colon Cancer Survival », *Clin Cancer Res*, vol. 21, n° 21, p. 4892-4902, nov. 2015.
- [88] Erdogan, Begum et al. "Cancer-associated fibroblasts promote directional cancer cell migration by aligning fibronectin." *The Journal of cell biology* vol. 216,11 (2017): 3799-3816. doi:10.1083/jcb.201704053
- [89] K. M. Riching *et al.*, « 3D Collagen Alignment Limits Protrusions to Enhance Breast Cancer Cell Persistence », *Biophysical Journal*, vol. 107, n° 11, p. 2546-2558, déc. 2014.
- [90] A. S. Piotrowski-Daspit, B. A. Nerger, A. E. Wolf, S. Sundaresan, et C. M. Nelson, « Dynamics of Tissue-Induced Alignment of Fibrous Extracellular Matrix », *Biophysical Journal*, vol. 113, n° 3, p. 702-713, août 2017.
- [91] V. Tjomsland *et al.*, « Interleukin 1 α Sustains the Expression of Inflammatory Factors in Human Pancreatic Cancer Microenvironment by Targeting Cancer-Associated Fibroblasts », *Neoplasia (New York, N.Y.)*, vol. 13, n° 8, p. 664, août 2011.
- [92] Q. Sun *et al.*, « The impact of cancer-associated fibroblasts on major hallmarks of pancreatic cancer », *Theranostics*, vol. 8, n° 18, p. 5072-5087, 2018.
- [93] L. De Monte *et al.*, « Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer », *J Exp Med*, vol. 208, n° 3, p. 469-478, mars 2011.

- [94] D. Tang *et al.*, « High expression of Galectin-1 in pancreatic stellate cells plays a role in the development and maintenance of an immunosuppressive microenvironment in pancreatic cancer », *International Journal of Cancer*, vol. 130, n° 10, p. 2337-2348, 2012.
- [95] Zhang, Aibin *et al.* "Cancer-associated fibroblasts promote M2 polarization of macrophages in pancreatic ductal adenocarcinoma." *Cancer medicine* vol. 6,2 (2017): 463-470. doi:10.1002/cam4.993
- [96] L. Ziani, S. Chouaib, *et J. Thiery*, « Alteration of the Antitumor Immune Response by Cancer-Associated Fibroblasts », *Frontiers in Immunology*, vol. 9, mars 2018.
- [97] S. Zhang, « The role of transforming growth factor β in T helper 17 differentiation », *Immunology*, vol. 155, n° 1, p. 24-35, 2018.
- [98] R. Trotta *et al.*, « TGF- β Utilizes SMAD3 to Inhibit CD16-Mediated IFN- γ Production and Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Human NK Cells », *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 181, n° 6, p. 3784, sept. 2008.
- [99] Donatelli, Sarah S *et al.* "TGF- β -inducible microRNA-183 silences tumor-associated natural killer cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 111,11 (2014): 4203-8. doi:10.1073/pnas.1319269111
- [100] Alain Vonlaufen *et al.*« Pancreatic Stellate Cells: Partners in Crime with Pancreatic ». *Cancer Cells / Cancer Research* 2008
- [101] T. Murata *et al.*, « HB-EGF and PDGF Mediate Reciprocal Interactions of Carcinoma Cells with Cancer-Associated Fibroblasts to Support Progression of Uterine Cervical Cancers », *Cancer Research*, vol. 71, n° 21, p. 6633-6642, nov. 2011.
- [102] G. Li, K. Satyamoorthy, F. Meier, C. Berking, T. Bogenrieder, *et M. Herlyn*, « Function and regulation of melanoma–stromal fibroblast interactions: when seeds meet soil », *Oncogene*, vol. 22, n° 20, p. 3162-3171, mai 2003.
- [103] F. Xing, J. Saidou, *et K. Watabe*, « Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment », *Front Biosci*, vol. 15, p. 166-179, janv. 2010.
- [104] Deying, Wei *et al.* "CAF-derived HGF promotes cell proliferation and drug resistance by up-regulating the c-Met/PI3K/Akt and GRP78 signalling in ovarian cancer cells." *Bioscience reports* vol. 37,2 BSR20160470. 10 Apr. 2017, doi:10.1042/BSR20160470
- [105] Hwang, Rosa F *et al.* "Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumor progression." *Cancer research* vol. 68,3 (2008): 918-26. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5714
- [106] Stuelten, Christina H *et al.* "Transient tumor-fibroblast interactions increase tumor cell malignancy by a TGF-Beta mediated mechanism in a mouse xenograft model of breast cancer." *PloS one* vol. 5,3 e9832. 23 Mar. 2010, doi:10.1371/journal.pone.0009832
- [107] Ruby Yun-Ju Huang, *et al.* « Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition ». *Journal of Cell Science* 2012
- [108] H. Cardenas *et al.*, « TGF- β induces global changes in DNA methylation during the epithelial-to-mesenchymal transition in ovarian cancer cells », *Epigenetics*, vol. 9, n° 11, p. 1461-1472, nov. 2014.
- [109] K. Kikuta *et al.*, « Pancreatic stellate cells promote epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells », *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 403, n° 3, p. 380-384, déc. 2010.
- [110] Y. S. Wu, I. Chung, W. F. Wong, A. Masamune, M. S. Sim, *et C. Y. Looi*, « Paracrine IL-6 signaling mediates the effects of pancreatic stellate cells on epithelial-mesenchymal transition via Stat3/Nrf2 pathway in pancreatic cancer cells », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1861, n° 2, p. 296-306, févr. 2017.
- [111] L. Wang *et al.*, « Asporin promotes pancreatic cancer cell invasion and migration by regulating the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) through both autocrine and paracrine mechanisms », *Cancer Letters*, vol. 398, p. 24-36, juill. 2017.

- [112] C. Pena *et al.*, « STC1 Expression By Cancer-Associated Fibroblasts Drives Metastasis of Colorectal Cancer », *Cancer Research*, vol. 73, n° 4, p. 1287-1297, févr. 2013.
- [113] V. Luga *et al.*, « Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration », *Cell*, vol. 151, n° 7, p. 1542-1556, déc. 2012.
- [114] S. N. Salaria *et al.*, « Palladin is Overexpressed in the Non-Neoplastic Stroma of Infiltrating Ductal Adenocarcinomas of the Pancreas, but is only Rarely Overexpressed in Neoplastic Cells », *Cancer Biol Ther*, vol. 6, n° 3, p. 324-328, mars 2007.
- [115] S. M. Goicoechea *et al.*, « Isoform-Specific Upregulation of Palladin in Human and Murine Pancreas Tumors », *PLoS One*, vol. 5, n° 4, avr. 2010.
- [116] Goicoechea, S M *et al.* "Palladin promotes invasion of pancreatic cancer cells by enhancing invadopodia formation in cancer-associated fibroblasts." *Oncogene* vol. 33,10 (2014): 1265-73. doi:10.1038/onc.2013.68
- [117] M. A. Mansour *et al.*, « Special AT-rich sequence-binding protein 2 suppresses invadopodia formation in HCT116 cells via palladin inhibition », *Experimental Cell Research*, vol. 332, n° 1, p. 78-88, mars 2015.
- [118] B. Grum-Schwensen *et al.*, « Suppression of Tumor Development and Metastasis Formation in Mice Lacking the *S100A4(mts1)* Gene », *Cancer Res*, vol. 65, n° 9, p. 3772-3780, mai 2005.
- [119] A. Labernadie *et al.*, « A mechanically active heterotypic E-cadherin/N-cadherin adhesion enables fibroblasts to drive cancer cell invasion », *Nature Cell Biology*, vol. 19, n° 3, p. 224-237, mars 2017.
- [120] A. Masamune, K. Kikuta, T. Watanabe, K. Satoh, M. Hirota, et T. Shimosegawa, « Hypoxia stimulates pancreatic stellate cells to induce fibrosis and angiogenesis in pancreatic cancer », *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 295, n° 4, p. G709-717, oct. 2008.
- [121] Xu, Zhihong *et al.* "Role of pancreatic stellate cells in pancreatic cancer metastasis." *The American journal of pathology* vol. 177,5 (2010): 2585-96. doi:10.2353/ajpath.2010.090899
- [122] Yoichi Matsuo *et al.* « CXCL8/IL-8 and CXCL12/SDF-1 α co-operatively promote invasiveness and angiogenesis in pancreatic cancer ». *International Journal of Cancer*.2009
- [123] K. Shiga, M. Hara, T. Nagasaki, T. Sato, H. Takahashi, et H. Takeyama, « Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth », *Cancers (Basel)*, vol. 7, n° 4, p. 2443-2458, déc. 2015.
- [124] L. Tao, G. Huang, H. Song, Y. Chen, et L. Chen, « Cancer associated fibroblasts: An essential role in the tumor microenvironment », *Oncology Letters*, vol. 14, n° 3, p. 2611-2620, sept. 2017.
- [125] S. Pavlides *et al.*, « The reverse Warburg effect: Aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma », *Cell Cycle*, vol. 8, n° 23, p. 3984-4001, déc. 2009.
- [126] T. Shan *et al.*, « Cancer-associated fibroblasts enhance pancreatic cancer cell invasion by remodeling the metabolic conversion mechanism », *Oncology Reports*, vol. 37, n° 4, p. 1971-1979, avr. 2017.
- [127] H. Park *et al.*, « The prognostic significance of cancer-associated fibroblasts in pancreatic ductal adenocarcinoma », *Tumour Biol.*, vol. 39, n° 10, p. 1010428317718403, oct. 2017.
- [128] K. Fujiwara *et al.*, « CD271+ Subpopulation of Pancreatic Stellate Cells Correlates with Prognosis of Pancreatic Cancer and Is Regulated by Interaction with Cancer Cells », *PLoS One*, vol. 7, n° 12, déc. 2012.
- [129] N. Ikenaga *et al.*, « CD10+ pancreatic stellate cells enhance the progression of pancreatic cancer », *Gastroenterology*, vol. 139, n° 3, p. 1041-1051, 1051.e1-8, sept. 2010.

- [130] D. Öhlund *et al.*, « Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer », *The Journal of Experimental Medicine*, p. jem.20162024, févr. 2017.
- [131] A. Kanno *et al.*, « Periostin, secreted from stromal cells, has biphasic effect on cell migration and correlates with the epithelial to mesenchymal transition of human pancreatic cancer cells », *International Journal of Cancer*, vol. 122, n° 12, p. 2707-2718, juin 2008.
- [132] C. E. Meacham et S. J. Morrison, « Tumor heterogeneity and cancer cell plasticity », *Nature*, vol. 501, n° 7467, p. 328-337, sept. 2013.
- [133] V. S. LeBleu et R. Kalluri, « A peek into cancer-associated fibroblasts: origins, functions and translational impact », *Disease Models & Mechanisms*, vol. 11, n° 4, p. dmm029447, avr. 2018.
- [134] M. A. Shields, S. Dangi-Garimella, A. J. Redig, et H. G. Munshi, « Biochemical role of the collagen-rich tumour microenvironment in pancreatic cancer progression », *Biochemical Journal*, vol. 441, n° 2, p. 541-552, janv. 2012.
- [135] Cole R Drifka et al. « Periductal stromal collagen topology of pancreatic ductal adenocarcinoma differs from that of normal and chronic pancreatitis. ». *Modern Pathology* 2015
- [136] N. Martínez-Bosch, J. Vinaixa, et P. Navarro, « Immune Evasion in Pancreatic Cancer: From Mechanisms to Therapy », *Cancers*, vol. 10, p. 6, janv. 2018.
- [137] M. Apte *et al.*, « Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture », *Gut*, vol. 43, n° 1, p. 128-133, juill. 1998.
- [138] M. J. Berna *et al.*, « CCK1 and CCK2 Receptors Are Expressed on Pancreatic Stellate Cells and Induce Collagen Production », *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, n° 50, p. 38905-38914, déc. 2010.
- [139] P. A. Phillips *et al.*, « Pancreatic stellate cells produce acetylcholine and may play a role in pancreatic exocrine secretion », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, n° 40, p. 17397-17402, oct. 2010.
- [140] J. P. Smith, S. Wang, S. Nadella, S. A. Jablonski, et L. M. Weiner, « Cholecystokinin receptor antagonist alters pancreatic cancer microenvironment and increases efficacy of immune checkpoint antibody therapy in mice », *Cancer Immunology, Immunotherapy*, vol. 67, n° 2, p. 195-207, févr. 2018.
- [141] S. Nadella *et al.*, « Dietary fat stimulates pancreatic cancer growth and promotes fibrosis of the tumor microenvironment through the cholecystokinin receptor », *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 315, n° 5, p. G699-G712, nov. 2018.
- [142] K. H. T. Paraiso et K. S. M. Smalley, « Fibroblast-mediated drug resistance in cancer », *Biochemical Pharmacology*, vol. 85, n° 8, p. 1033-1041, avr. 2013.
- [143] « Transport of Molecules in the Tumor Interstitium: A Review | Cancer Research ». [En ligne]. Disponible sur: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/47/12/3039>. [Consulté le: 06-sept-2019].
- [144] V. P. Chauhan, T. Stylianopoulos, Y. Boucher, et R. K. Jain, « Delivery of Molecular and Nanoscale Medicine to Tumors: Transport Barriers and Strategies », *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.*, vol. 2, n° 1, p. 281-298, juin 2011.
- [145] P. P. Provenzano, C. Cuevas, A. E. Chang, V. K. Goel, D. D. Von Hoff, et S. R. Hingorani, « Enzymatic Targeting of the Stroma Ablates Physical Barriers to Treatment of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma », *Cancer Cell*, vol. 21, n° 3, p. 418-429, mars 2012.
- [146] Jacobetz, Michael A et al. "Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer." *Gut* vol. 62,1 (2013): 112-20. doi:10.1136/gutjnl-2012-302529

- [147] C.-H. Heldin, K. Rubin, K. Pietras, et A. Östman, « High interstitial fluid pressure — an obstacle in cancer therapy », *Nat Rev Cancer*, vol. 4, n° 10, p. 806-813, oct. 2004.
- [148] Hessmann, E et al. "Fibroblast drug scavenging increases intratumoural gemcitabine accumulation in murine pancreas cancer." *Gut* vol. 67,3 (2018): 497-507. doi:10.1136/gutjnl-2016-311954
- [149] M. B. Meads, R. A. Gatenby, et W. S. Dalton, « Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease », *Nature Reviews Cancer*, vol. 9, n° 9, p. 665-674, sept. 2009.
- [150] D. A. Senthane et al., « The Role of Tumor Microenvironment in Chemoresistance: To Survive, Keep Your Enemies Closer », *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 18, n° 7, p. 1586, juill. 2017.
- [151] Vaibhav Sahai et al. « Promotion of gemcitabine resistance in pancreatic cancer cells by three-dimensional collagen I through HMGA2-dependent histone acetyltransferase expression. | ». *Journal of Clinical Oncology* 2013
- [152] A. J. Rice et al., « Matrix stiffness induces epithelial–mesenchymal transition and promotes chemoresistance in pancreatic cancer cells », *Oncogenesis*, vol. 6, n° 7, p. e352, juill. 2017.
- [153] Flach, Edward H et al. "Fibroblasts contribute to melanoma tumor growth and drug resistance." *Molecular pharmaceutics* vol. 8,6 (2011): 2039-49. doi:10.1021/mp200421k
- [154] G. Li, K. Satyamoorthy, et M. Herlyn, « N-Cadherin-mediated Intercellular Interactions Promote Survival and Migration of Melanoma Cells », p. 8.
- [155] Choe, Chungyoul et al. "Crosstalk with cancer-associated fibroblasts induces resistance of non-small cell lung cancer cells to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibition." *OncoTargets and therapy* vol. 8 3665-78. 7 Dec. 2015, doi:10.2147/OTT.S89659
- [156] Straussman, Ravid et al. "Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion." *Nature* vol. 487,7408 (2012): 500-4. doi:10.1038/nature11183
- [157] Ireland, Lucy et al. "Chemoresistance in Pancreatic Cancer Is Driven by Stroma-Derived Insulin-Like Growth Factors." *Cancer research* vol. 76,23 (2016): 6851-6863. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-1201
- [158] Long, Kristen B et al. "IL6 Receptor Blockade Enhances Chemotherapy Efficacy in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." *Molecular cancer therapeutics* vol. 16,9 (2017): 1898-1908. doi:10.1158/1535-7163.MCT-16-0899
- [159] C. Duluc et al., « Pharmacological targeting of the protein synthesis mTOR/4E-BP1 pathway in cancer-associated fibroblasts abrogates pancreatic tumour chemoresistance », *EMBO Mol Med*, vol. 7, n° 6, p. 735-753, juin 2015.
- [160] K. E. Richards, A. E. Zeleniak, M. L. Fishel, J. Wu, L. E. Littlepage, et R. Hill, « Cancer-associated fibroblast exosomes regulate survival and proliferation of pancreatic cancer cells », *Oncogene*, vol. 36, n° 13, p. 1770-1778, mars 2017.
- [161] M. C. Boelens et al., « Exosome Transfer from Stromal to Breast Cancer Cells Regulates Therapy Resistance Pathways », *Cell*, vol. 159, n° 3, p. 499-513, oct. 2014.
- [162] Au Yeung, Chi Lam et al. "Exosomal transfer of stroma-derived miR21 confers paclitaxel resistance in ovarian cancer cells through targeting APAF1." *Nature communications* vol. 7 11150. 29 Mar. 2016, doi:10.1038/ncomms11150
- [163] B. Son, S. Lee, H. Youn, E. Kim, W. Kim, et B. Youn, « The role of tumor microenvironment in therapeutic resistance », *Oncotarget*, vol. 8, n° 3, p. 3933-3945, déc. 2016.

- [164] Chronopoulos, Antonios et al. "ATRA mechanically reprograms pancreatic stellate cells to suppress matrix remodelling and inhibit cancer cell invasion." *Nature communications* vol. 7 12630. 7 Sep. 2016, doi:10.1038/ncomms12630
- [165] P. Dauer *et al.*, « Inactivation of Cancer-Associated-Fibroblasts Disrupts Oncogenic Signaling in Pancreatic Cancer Cells and Promotes Its Regression », *Cancer Research*, vol. 78, n° 5, p. 1321-1333, mars 2018.
- [166] M. H. Sherman *et al.*, « Vitamin D Receptor-Mediated Stromal Reprogramming Suppresses Pancreatitis and Enhances Pancreatic Cancer Therapy », *Cell*, vol. 159, n° 1, p. 80-93, sept. 2014.
- [167] C. Roma-Rodrigues, R. Mendes, P. Baptista, et A. Fernandes, « Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Therapy », *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, n° 4, p. 840, févr. 2019.
- [168] Hong, In-Sun. "Stimulatory versus suppressive effects of GM-CSF on tumor progression in multiple cancer types." *Experimental & molecular medicine* vol. 48,7 e242. 1 Jul. 2016, doi:10.1038/emm.2016.64
- [169] N. G. Kooreman *et al.*, « Autologous iPSC-Based Vaccines Elicit Anti-tumor Responses In Vivo », *Cell Stem Cell*, vol. 22, n° 4, p. 501-513.e7, avr. 2018.
- [170] M. G. Hanna, Jr, « Immunotherapy with autologous tumor cell vaccines for treatment of occult disease in early stage colon cancer », *Hum Vaccin Immunother*, vol. 8, n° 8, p. 1156-1160, août 2012.
- [171] Q. Song, C. Zhang, et X. Wu, « Therapeutic cancer vaccines: From initial findings to prospects », *Immunology Letters*, vol. 196, p. 11-21, avr. 2018.
- [172] S. Lee et K. Margolin, « Cytokines in Cancer Immunotherapy », *Cancers (Basel)*, vol. 3, n° 4, p. 3856-3893, oct. 2011.
- [173] Darvin, Pramod et al. "Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers." *Experimental & molecular medicine* vol. 50,12 165. 13 Dec. 2018, doi:10.1038/s12276-018-0191-1
- [174] Y. Zhao *et al.*, « Losartan treatment enhances chemotherapy efficacy and reduces ascites in ovarian cancer models by normalizing the tumor stroma », *PNAS*, vol. 116, n° 6, p. 2210-2219, févr. 2019.
- [175] Yuxia Tang et al. « Depletion of collagen by losartan to improve tumor accumulation and therapeutic efficacy of photodynamic nanoplatforms |». *Drug delivery and translational research* 2019
- [176] Diop-Frimpong, Benjamin et al. "Losartan inhibits collagen I synthesis and improves the distribution and efficacy of nanotherapeutics in tumors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 108,7 (2011): 2909-14. doi:10.1073/pnas.1018892108
- [177] Janet E Murphy et al. « Potentially curative combination of TGF- β 1 inhibitor losartan and FOLFIRINOX (FFX) for locally advanced pancreatic cancer (LAPC): R0 resection rates and preliminary survival data from a prospective phase II study. | ». *Journal of Clinical Oncology* 2018
- [178] Pietras, Kristian et al. "Functions of paracrine PDGF signaling in the proangiogenic tumor stroma revealed by pharmacological targeting." *PLoS medicine* vol. 5,1 (2008): e19. doi:10.1371/journal.pmed.0050019
- [179] K. Pietras, K. Rubin, T. Sjoblom, E. Buchdunger, M. Sjoquist, et C.-H. Heldin, « Inhibition of PDGF Receptor Signaling in Tumor Stroma Enhances Antitumor Effect of Chemotherapy », p. 10.
- [180] E. Gherardi, W. Birchmeier, C. Birchmeier, et G. Vande Woude, « Targeting MET in cancer: rationale and progress », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 12, n° 2, p. 89-103, janv. 2012.

- [181] G. R. Blumenschein, G. B. Mills, et A. M. Gonzalez-Angulo, « Targeting the Hepatocyte Growth Factor–cMET Axis in Cancer Therapy », *J Clin Oncol*, vol. 30, n° 26, p. 3287-3296, sept. 2012.
- [182] Katayama, Ryohei et al. “Cytotoxic activity of tivantinib (ARQ 197) is not due solely to c-MET inhibition.” *Cancer research* vol. 73,10 (2013): 3087-96. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3256
- [183] H. A. Wakelee *et al.*, « A phase Ib/II study of XL184 (BMS 907351) with and without erlotinib (E) in patients (pts) with non-small cell lung cancer (NSCLC). », *JCO*, vol. 28, n° 15_suppl, p. 3017-3017, mai 2010.
- [184] J. Tanizaki *et al.*, « MET Tyrosine Kinase Inhibitor Crizotinib (PF-02341066) Shows Differential Antitumor Effects in Non-small Cell Lung Cancer According to MET Alterations », *Journal of Thoracic Oncology*, vol. 6, n° 10, p. 1624-1631, oct. 2011.
- [185] Mikala Egeblad et al. « New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression ». *Nature Reviews cancer* 2002
- [186] J. E. Rundhaug, « Matrix metalloproteinases and angiogenesis », *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 9, n° 2, p. 267-285, 2005.
- [187] B. J. Dezube, S. E. Krown, J. Y. Lee, K. S. Bauer, et D. M. Aboulafia, « Randomized Phase II Trial of Matrix Metalloproteinase Inhibitor COL-3 in AIDS-Related Kaposi's Sarcoma: An AIDS Malignancy Consortium Study », *Journal of Clinical Oncology*, sept. 2016.
- [188] Ling, Binbing et al. “A novel immunotherapy targeting MMP-14 limits hypoxia, immune suppression and metastasis in triple-negative breast cancer models.” *Oncotarget* vol. 8,35 58372-58385. 9 May. 2017, doi:10.18632/oncotarget.17702
- [189] Scannevin, Robert H et al. “Discovery of a highly selective chemical inhibitor of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) that allosterically inhibits zymogen activation.” *The Journal of biological chemistry* vol. 292,43 (2017): 17963-17974. doi:10.1074/jbc.M117.806075
- [190] S. R. Hingorani *et al.*, « Phase Ib Study of PEGylated Recombinant Human Hyaluronidase and Gemcitabine in Patients with Advanced Pancreatic Cancer », *Clinical Cancer Research*, vol. 22, n° 12, p. 2848-2854, juin 2016.
- [191] S. R. Hingorani *et al.*, « HALO 202: Randomized Phase II Study of PEGPH20 Plus Nab-Paclitaxel/Gemcitabine Versus Nab-Paclitaxel/Gemcitabine in Patients With Untreated, Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma », *J. Clin. Oncol.*, vol. 36, n° 4, p. 359-366, 01 2018.
- [192] Ramanathan RK et al. « Phase IB/II Randomized Study of FOLFIRINOX Plus Pegylated Recombinant Human Hyaluronidase Versus FOLFIRINOX Alone in Patients With Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma: SWOG S1313 » *Journal of Clinical Oncology*. 2019
- [193] T. Miyashita *et al.*, « Neoadjuvant chemotherapy with gemcitabine plus nab-paclitaxel reduces the number of cancer-associated fibroblasts through depletion of pancreatic stroma », *Anticancer research*, vol. 38, n° 1, p. 337-343, janv. 2018.
- [194] R. Alvarez *et al.*, « Stromal disrupting effects of nab-paclitaxel in pancreatic cancer », *Br J Cancer*, vol. 109, n° 4, p. 926-933, août 2013.
- [195] Y. Gao, S.-P. Yin, X.-S. Xie, D.-D. Xu, et W. Du, « The relationship between stromal cell derived SPARC in human gastric cancer tissue and its clinicopathologic significance », *Oncotarget*, vol. 8, sept. 2017.
- [196] Infante JR et al. « Peritumoral Fibroblast SPARC Expression and Patient Outcome With Resectable Pancreatic Adenocarcinoma | ». *Journal of Clinical Oncology* 2007

- [197] M. J. Ernsting *et al.*, « Targeting of metastasis-promoting tumor-associated fibroblasts and modulation of pancreatic tumor-associated stroma with a carboxymethylcellulose-docetaxel nanoparticle », *J Control Release*, vol. 206, p. 122-130, mai 2015.
- [198] W.-Q. Wang, L. Liu, J.-Z. Xu, et X.-J. Yu, « Reflections on depletion of tumor stroma in pancreatic cancer », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, vol. 1871, n° 2, p. 267-272, avr. 2019.
- [199] W.-Q. Wang *et al.*, « Intratumoral α -SMA Enhances the Prognostic Potency of CD34 Associated with Maintenance of Microvessel Integrity in Hepatocellular Carcinoma and Pancreatic Cancer », *PLoS One*, vol. 8, n° 8, août 2013.
- [200] S. Guo, C. M. Lin, Z. Xu, L. Miao, Y. Wang, et L. Huang, « Co-delivery of Cisplatin and Rapamycin for Enhanced Anticancer Therapy through Synergistic Effects and Microenvironment Modulation », *ACS Nano*, vol. 8, n° 5, p. 4996-5009, mai 2014.
- [201] C. Feig *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*, vol. 110, n° 50, p. 20212-20217, déc. 2013.
- [202] G. Valenti *et al.*, « Cancer Stem Cells Regulate Cancer-Associated Fibroblasts via Activation of Hedgehog Signaling in Mammary Gland Tumors », *Cancer Res.*, vol. 77, n° 8, p. 2134-2147, 15 2017.
- [203] G. L. Beatty *et al.*, « CD40 Agonists Alter Tumor Stroma and Show Efficacy Against Pancreatic Carcinoma in Mice and Humans », *Science*, vol. 331, n° 6024, p. 1612-1616, mars 2011.
- [204] Olive, Kenneth P et al. "Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer." *Science (New York, N.Y.)* vol. 324,5933 (2009): 1457-61. doi:10.1126/science.1171362
- [205] D. V. T. Catenacci *et al.*, « Randomized Phase Ib/II Study of Gemcitabine Plus Placebo or Vismodegib, a Hedgehog Pathway Inhibitor, in Patients With Metastatic Pancreatic Cancer », *J Clin Oncol*, vol. 33, n° 36, p. 4284-4292, déc. 2015.
- [206] Kim, Edward J et al. "Pilot clinical trial of hedgehog pathway inhibitor GDC-0449 (vismodegib) in combination with gemcitabine in patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma." *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* vol. 20,23 (2014): 5937-5945. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1269
- [207] Ko, Andrew H et al. "A Phase I Study of FOLFIRINOX Plus IPI-926, a Hedgehog Pathway Inhibitor, for Advanced Pancreatic Adenocarcinoma." *Pancreas* vol. 45,3 (2016): 370-5. doi:10.1097/MPA.0000000000000458
- [208] Neese A. et al. « Stromal biology and therapy in pancreatic cancer: ready for clinical translation? ». *Gut* 2019
- [209] Mathew, Esha et al. "Dosage-dependent regulation of pancreatic cancer growth and angiogenesis by hedgehog signaling." *Cell reports* vol. 9,2 (2014): 484-94. doi:10.1016/j.celrep.2014.09.010
- [210] C. Polydorou, F. Mpekris, P. Papageorgis, C. Voutouri, et T. Stylianopoulos, « Pirfenidone normalizes the tumor microenvironment to improve chemotherapy », *Oncotarget*, vol. 8, n° 15, p. 24506-24517, févr. 2017.
- [211] Shingo Kozono et al. « Pirfenidone Inhibits Pancreatic Cancer Desmoplasia by Regulating Stellate Cells | ». *Cancer Research 2013*
- [212] S. A. M. Ealia et M. P. Saravanakumar, « A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application », *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.*, vol. 263, p. 032019, nov. 2017.

- [213] « Recommandation de la Commission du 18 octobre 2011 relative à la définition des nanomatériaux Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE », Journal Officiel de l'Union Européenne 2011 p. 3.
- [214] C. Cheung et W. T. Al-Jamal, « Liposomes-Based Nanoparticles for Cancer Therapy and Bioimaging », in *Nanooncology: Engineering nanomaterials for cancer therapy and diagnosis*, G. Gonçalves et G. Tobias, Éd. Cham: Springer International Publishing, 2018, p. 51-87.
- [215] C. C. Lee, J. A. MacKay, J. M. J. Fréchet, et F. C. Szoka, « Designing dendrimers for biological applications », *Nat Biotechnol*, vol. 23, n° 12, p. 1517-1526, déc. 2005.
- [216] X. J. Gao, X. Shen, G. Xing, et X. Gao, « Fullerenes for Cancer Therapy and Bioimaging », in *Nanooncology: Engineering nanomaterials for cancer therapy and diagnosis*, G. Gonçalves et G. Tobias, Éd. Cham: Springer International Publishing, 2018, p. 387-415.
- [217] S. Ghanbarzadeh et H. Hamishehkar, « Application of Graphene and its Derivatives in Cancer Diagnosis and Treatment », *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*, vol. 67, sept. 2017.
- [218] H. He, L. A. Pham-Huy, P. Dramou, D. Xiao, P. Zuo, et C. Pham-Huy, « Carbon Nanotubes: Applications in Pharmacy and Medicine », *Biomed Res Int*, vol. 2013, 2013.
- [219] H. Pandey, R. Rani, V. Agarwal, H. Pandey, R. Rani, et V. Agarwal, « Liposome and Their Applications in Cancer Therapy », *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol. 59, 2016.
- [220] A. K. Sharma, A. Gothwal, P. Kesharwani, H. Alsaab, A. K. Iyer, et U. Gupta, « Dendrimer nanoarchitectures for cancer diagnosis and anticancer drug delivery », *Drug Discovery Today*, vol. 22, n° 2, p. 314-326, févr. 2017.
- [221] L. T. B. and P. Paira*, « Current Application of Quantum Dots (QD) in Cancer Therapy: A Review », *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 31-août-2017.
- [222] H. Daraee, A. Eatemadi, E. Abbasi, S. Fekri Aval, M. Kouhi, et A. Akbarzadeh, « Application of gold nanoparticles in biomedical and drug delivery », *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, vol. 44, n° 1, p. 410-422, 2016.
- [223] L. Zhu, Z. Zhou, H. Mao, et L. Yang, « Magnetic nanoparticles for precision oncology: theranostic magnetic iron oxide nanoparticles for image-guided and targeted cancer therapy », *Nanomedicine (Lond)*, vol. 12, n° 1, p. 73-87, janv. 2017.
- [224] M. A. Dobrovolskaia, P. Aggarwal, J. B. Hall, et S. E. McNeil, « Preclinical Studies To Understand Nanoparticle Interaction with the Immune System and Its Potential Effects on Nanoparticle Biodistribution », *Mol Pharm*, vol. 5, n° 4, p. 487-495, 2008.
- [225] A. Albanese, C. D. Walkey, J. B. Olsen, H. Guo, A. Emili, et W. C. W. Chan, « Secreted Biomolecules Alter the Biological Identity and Cellular Interactions of Nanoparticles », *ACS Nano*, vol. 8, n° 6, p. 5515-5526, juin 2014.
- [226] D. E. Owens et N. A. Peppas, « Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles », *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 307, n° 1, p. 93-102, janv. 2006.
- [227] Jelena Kolosnjaj-Tabi et al. « Cycle de vie de nanoparticules magnétiques dans l'organisme ». *Biologie Aujourd'hui* 2014
- [228] J. P. M. Almeida, A. L. Chen, A. Foster, et R. Drezek, « In vivo biodistribution of nanoparticles », *Nanomedicine (Lond)*, vol. 6, n° 5, p. 815-835, juill. 2011.
- [229] G. Fullstone, J. Wood, M. Holcombe, et G. Battaglia, « Modelling the Transport of Nanoparticles under Blood Flow using an Agent-based Approach », *Scientific Reports*, vol. 5, p. 10649, juin 2015.

- [230] M. Gindy et R. Prud'homme, « Gindy, ME and Prud'homme, RK. Multifunctional nanoparticles for imaging, delivery and targeting in cancer therapy. Expert Opin Drug Deliv 6: 865-878 », *Expert opinion on drug delivery*, vol. 6, p. 865-78, sept. 2009.
- [231] J. L. Corchero et A. Villaverde, « Biomedical applications of distally controlled magnetic nanoparticles », *Trends in Biotechnology*, vol. 27, n° 8, p. 468-476, août 2009.
- [232] F. Danhier, O. Feron, et V. Préat, « To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery », *Journal of Controlled Release*, vol. 148, n° 2, p. 135-146, déc. 2010.
- [233] H. Maeda, T. Sawa, et T. Konno, « Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs, including the EPR effect in solid tumor and clinical overview of the prototype polymeric drug SMANCS », *Journal of Controlled Release*, vol. 74, n° 1, p. 47-61, juill. 2001.
- [234] C. Corot *et al.*, « Macrophage Imaging in Central Nervous System and in Carotid Atherosclerotic Plaque Using Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide in Magnetic Resonance Imaging », *Investigative radiology*, vol. 39, p. 619-25, nov. 2004.
- [235] « Arami, Hamed et al. "In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles." *Chemical Society reviews* vol. 44,23 (2015): 8576-607. doi:10.1039/c5cs00541h
- [236] E. C. Dreaden, A. M. Alkilany, X. Huang, C. J. Murphy, et M. A. El-Sayed, « The golden age: gold nanoparticles for biomedicine », *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, n° 7, p. 2740-2779, mars 2012.
- [237] R. Shukla, V. Bansal, M. Chaudhary, A. Basu, R. R. Bhonde, et M. Sastry, « Biocompatibility of Gold Nanoparticles and Their Endocytotic Fate Inside the Cellular Compartment: A Microscopic Overview », *Langmuir*, vol. 21, n° 23, p. 10644-10654, nov. 2005.
- [238] S. Jeon, R. Subbiah, T. Bonaedy, S. Van, K. Park, et K. Yun, « Surface functionalized magnetic nanoparticles shift cell behavior with on/off magnetic fields », *Journal of Cellular Physiology*, vol. 233, n° 2, p. 1168-1178, 2018.
- [239] X. Liu, N. Huang, H. Li, Q. Jin, et J. Ji, « Surface and Size Effects on Cell Interaction of Gold Nanoparticles with Both Phagocytic and Nonphagocytic Cells », *Langmuir*, vol. 29, n° 29, p. 9138-9148, juill. 2013.
- [240] C. H. J. Choi, J. E. Zuckerman, P. Webster, et M. E. Davis, « Targeting kidney mesangium by nanoparticles of defined size », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 108, n° 16, p. 6656-6661, avr. 2011.
- [241] X. Sun *et al.*, « An Assessment of the Effects of Shell Crosslinked Nanoparticle Size, Core Composition, and Surface PEGylation on In Vivo Biodistribution », *Biomacromolecules*, vol. 6, n° 5, p. 2541-2554, 2005.
- [242] N. Hoshyar, S. Gray, H. Han, et G. Bao, « The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction. », *Nanomedicine (Lond)*, vol. 11, n° 6, p. 673-692, mars 2016.
- [243] E. Duguet, S. Vasseur, S. Mornet, et J.-M. Devoisselle, « Magnetic Nanoparticles and Their Applications in Medicine », *Nanomedicine (London, England)*, vol. 1, p. 157-68, sept. 2006.
- [244] A. Schroeder *et al.*, « Treating metastatic cancer with nanotechnology », *Nature Reviews Cancer*, vol. 12, n° 1, p. 39-50, janv. 2012.
- [245] A. Kunzmann *et al.*, « Efficient internalization of silica-coated iron oxide nanoparticles of different sizes by primary human macrophages and dendritic cells », *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 253, n° 2, p. 81-93, juin 2011.

- [246] G. Fleige *et al.*, « In Vitro Characterization of Two Different Ultrasmall Iron Oxide Particles for Magnetic Resonance Cell Tracking », *Investigative Radiology*, vol. 37, n° 9, p. 482-488, sept. 2002.
- [247] C. Leuschner, C. S. Kumar, W. Hansel, W. Soboyejo, J. Zhou, et J. Hormes, « LHRH-conjugated Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Detection of Breast Cancer Metastases », *Breast Cancer Res Treat*, vol. 99, n° 2, p. 163-176, sept. 2006.
- [248] A. Vegerhof *et al.*, « Targeted Magnetic Nanoparticles for Mechanical Lysis of Tumor Cells by Low-Amplitude Alternating Magnetic Field », *Materials*, vol. 9, n° 11, p. 943, nov. 2016.
- [249] « Choi, Hak Soo et al. "Renal clearance of quantum dots." *Nature biotechnology* vol. 25,10 (2007): 1165-70. doi:10.1038/nbt1340
- [250] Choi, Hak Soo et al. "Design considerations for tumour-targeted nanoparticles." *Nature nanotechnology* vol. 5,1 (2010): 42-7. doi:10.1038/nnano.2009.314
- [251] Yu, Shann S et al. "Size- and charge-dependent non-specific uptake of PEGylated nanoparticles by macrophages." *International journal of nanomedicine* vol. 7 (2012): 799-813. doi:10.2147/IJN.S28531
- [252] N. Khlebtsov et L. Dykman, « Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies », *Chem Soc Rev*, vol. 40, n° 3, p. 1647-1671, mars 2011.
- [253] R. Weissleder, G. Elizondo, J. Wittenberg, C. A. Rabito, H. H. Bengel, et L. Josephson, « Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: characterization of a new class of contrast agents for MR imaging. », *Radiology*, vol. 175, n° 2, p. 489-493, mai 1990.
- [254] Sapsford et al « Functionalizing Nanoparticles with Biological Molecules: Developing Chemistries that Facilitate Nanotechnology | ». Chemical Reviews 2013
- [255] Yidong Yang « Temporal and noninvasive monitoring of inflammatory-cell infiltration to myocardial infarction sites using micrometer-sized iron oxide particles ». Magnetic Resonance in Medicine 2010
- [256] Weishaupt et al. « Pulmonary hemorrhage: Imaging with a new magnetic resonance blood pool agent in conjunction with breathheld three-dimensional magnetic resonance angiography». 1999
- [257] C. Corot, P. Robert, J.-M. Idée, et M. Port, « Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 58, n° 14, p. 1471-1504, déc. 2006.
- [258] H. Jackson *et al.*, « QUANTUM DOTS ARE PHAGOCYTIZED BY MACROPHAGES AND COLOCALIZE WITH EXPERIMENTAL GLIOMAS », *Neurosurgery*, vol. 60, n° 3, p. 524-530, mars 2007.
- [259] P. Gas, « Essential Facts on the History of Hyperthermia and their Connections with Electromedicine », *Przegląd Elektrotechniczny*, vol. 87, p. 37-40, déc. 2011.
- [260] R. K. Gilchrist, R. Medal, W. D. Shorey, R. C. Hanselman, J. C. Parrott, et C. B. Taylor, « Selective Inductive Heating of Lymph Nodes », *Ann Surg*, vol. 146, n° 4, p. 596-606, oct. 1957.
- [261] S. Luo *et al.*, « Clinical trials of magnetic induction hyperthermia for treatment of tumours », *Critical review*, p. 6, 2014.
- [262] K. Maier-Hauff *et al.*, « Intracranial Thermotherapy using Magnetic Nanoparticles Combined with External Beam Radiotherapy: Results of a Feasibility Study on Patients with Glioblastoma Multiforme », *J Neurooncol*, vol. 81, n° 1, p. 53-60, janv. 2007.
- [263] K. Maier-Hauff *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*, vol. 103, n° 2, p. 317-324, juin 2011.

- [264] S. Dutz et R. Hergt, « Magnetic particle hyperthermia - A promising tumour therapy? », *Nanotechnology*, vol. 25, nov. 2014.
- [265] A. Villanueva *et al.*, « Hyperthermia HeLa Cell Treatment with Silica-Coated Manganese Oxide Nanoparticles », *J. Phys. Chem. C*, vol. 114, n° 5, p. 1976-1981, févr. 2010.
- [266] C. Sanchez *et al.*, « Targeting a G-protein-coupled receptor overexpressed in endocrine tumors by magnetic nanoparticles to induce cell death », *ACS Nano*, vol. 8, n° 2, p. 1350-1363, févr. 2014.
- [267] J. Carrey, B. Mehdaoui, et M. Respaud, « Simple models for dynamic hysteresis loop calculations of magnetic single-domain nanoparticles: Application to magnetic hyperthermia optimization », *Journal of Applied Physics*, vol. 109, n° 8, p. 083921, avr. 2011.
- [268] L. Polo-Corrales et C. Rinaldi, « Monitoring iron oxide nanoparticle surface temperature in an alternating magnetic field using thermoresponsive fluorescent polymers », *Journal of Applied Physics*, vol. 111, p. 07B334, mars 2012.
- [269] Riedinger et al. « Subnanometer local temperature probing and remotely controlled drug release based on azo-functionalized iron oxide nanoparticles. » *Nano Lett* 2013
- [270] H. Huang, S. Delikanli, H. Zeng, D. Ferkey, et A. Pralle, « Remote control of ion channels and neurons through magnetic-field heating of nanoparticles », *Nature nanotechnology*, vol. 5, p. 602-6, août 2010.
- [271] M. Domenech, I. Marrero-Berrios, M. Torres-Lugo, et C. Rinaldi, « Lysosomal Membrane Permeabilization by Targeted Magnetic Nanoparticles in Alternating Magnetic Fields », *ACS Nano*, vol. 7, n° 6, p. 5091-5101, juin 2013.
- [272] N. Hallali, P. Clerc, D. Fourmy, V. Gigoux, et J. Carrey, « Influence on cell death of high frequency motion of magnetic nanoparticles during magnetic hyperthermia experiments », *Appl. Phys. Lett.*, vol. 109, n° 3, p. 032402, juill. 2016.
- [273] Y. I. Golovin *et al.*, « The dynamics of magnetic nanoparticles exposed to non-heating alternating magnetic field in biochemical applications: theoretical study », *J Nanopart Res*, vol. 19, n° 2, p. 59, févr. 2017.
- [274] J. H. Wang et B. Li, « Mechanics rules cell biology », *BMC Sports Science, Medicine and Rehabilitation*, vol. 2, n° 1, déc. 2010.
- [275] A. I. Gonçalves, M. S. Miranda, M. T. Rodrigues, R. L. Reis, et M. E. Gomes, « Magnetic responsive cell-based strategies for diagnostics and therapeutics », *Biomedical Materials*, vol. 13, n° 5, p. 054001, août 2018.
- [276] M. Ermolli, C. Menné, G. Pozzi, M.-Á. Serra, et L. A. Clerici, « Nickel, cobalt and chromium-induced cytotoxicity and intracellular accumulation in human haca keratinocytes », *Toxicology*, vol. 159, n° 1, p. 23-31, févr. 2001.
- [277] D. W. Wong, W. L. Gan, Y. K. Teo, et W. S. Lew, « Interplay of cell death signaling pathways mediated by alternating magnetic field gradient », *Cell Death Discovery*, vol. 4, n° 1, déc. 2018.
- [278] S. K. Hobbs *et al.*, « Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 95, n° 8, p. 4607-4612, avr. 1998.
- [279] P. Decuzzi *et al.*, « Size and shape effects in the biodistribution of intravascularly injected particles », *Journal of Controlled Release*, vol. 141, n° 3, p. 320-327, févr. 2010.
- [280] E. Zhang, M. F. Kircher, M. Koch, L. Eliasson, S. N. Goldberg, et E. Renström, « Dynamic Magnetic Fields Remote-Control Apoptosis via Nanoparticle Rotation », *ACS Nano*, vol. 8, n° 4, p. 3192-3201, avr. 2014.
- [281] M. H. Cho *et al.*, « A magnetic switch for the control of cell death signalling in *in vitro* and *in vivo* systems », *Nature Materials*, vol. 11, n° 12, p. 1038-1043, déc. 2012.

- [282] A. M. Master *et al.*, « Remote Actuation of Magnetic Nanoparticles For Cancer Cell Selective Treatment Through Cytoskeletal Disruption », *Scientific Reports*, vol. 6, n° 1, déc. 2016.
- [283] W. Li, Y. Liu, Z. Qian, et Y. Yang, « Evaluation of Tumor Treatment of Magnetic Nanoparticles Driven by Extremely Low Frequency Magnetic Field », *Scientific Reports*, vol. 7, n° 1, déc. 2017.
- [284] R. Brossel, A. Yahi, S. David, L. Moreno Velasquez, et J.-M. Guinebretière, « Mechanical Signals Inhibit Growth of a Grafted Tumor In Vivo: Proof of Concept », *PLoS One*, vol. 11, n° 4, avr. 2016.
- [285] I. V. Belyanina *et al.*, « In Vivo Cancer Cells Elimination Guided by Aptamer-Functionalized Gold-Coated Magnetic Nanoparticles and Controlled with Low Frequency Alternating Magnetic Field », *Theranostics*, vol. 7, n° 13, p. 3326-3337, 2017.
- [286] S. Du, J. Li, C. Du, Z. Huang, G. Chen, et W. Yan, « Overendocytosis of superparamagnetic iron oxide particles increases apoptosis and triggers autophagic cell death in human osteosarcoma cell under a spinning magnetic field », *Oncotarget*, vol. 8, n° 6, févr. 2017.
- [287] K. Spyridopoulou *et al.*, « Effect of low frequency magnetic fields on the growth of MNP-treated HT29 colon cancer cells », *Nanotechnology*, vol. 29, n° 17, p. 175101, avr. 2018.
- [288] A. I. Martínez-Banderas *et al.*, « Functionalized magnetic nanowires for chemical and magneto-mechanical induction of cancer cell death », *Scientific Reports*, vol. 6, n° 1, déc. 2016.
- [289] M. Contreras, R. Sougrat, A. Zaher, T. Ravasi, et J. Kosel, « Non-chemotoxic induction of cancer cell death using magnetic nanowires », *International Journal of Nanomedicine*, p. 2141, mars 2015.
- [290] H. Chiriac *et al.*, « Fe-Cr-Nb-B ferromagnetic particles with shape anisotropy for cancer cell destruction by magneto-mechanical actuation », *Scientific Reports*, vol. 8, déc. 2018.
- [291] M. E. Muroski *et al.*, « Controlled Payload Release by Magnetic Field Triggered Neural Stem Cell Destruction for Malignant Glioma Treatment », *PLoS One*, vol. 11, n° 1, janv. 2016.
- [292] T. Zamay *et al.*, « Noninvasive Microsurgery Using Aptamer-Functionalized Magnetic Microdisks for Tumor Cell Eradication », *Nucleic acid therapeutics*, vol. 27, déc. 2016.
- [293] J. Wen *et al.*, « Apoptosis selectively induced in BEL-7402 cells by folic acid-modified magnetic nanoparticles combined with 100 Hz magnetic field », *Int J Nanomedicine*, vol. 9, p. 2043-2050, 2014.
- [294] D.-H. Kim *et al.*, « Biofunctionalized magnetic-vortex microdiscs for targeted cancer-cell destruction », *Nature Materials*, vol. 9, n° 2, p. 165-171, févr. 2010.
- [295] H. Ju, Y. Cui, Z. Chen, Q. Fu, M. Sun, et Y. Zhou, « Effects of combined delivery of extremely low frequency electromagnetic field and magnetic Fe₃O₄ nanoparticles on hepatic cell lines », *Am J Transl Res*, vol. 8, n° 4, p. 1838-1847, 2016.
- [296] D. Liu, L. Wang, Z. Wang, et A. Cuschieri, « Magnetoporation and Magnetolysis of Cancer Cells via Carbon Nanotubes Induced by Rotating Magnetic Fields », *Nano Lett.*, vol. 12, n° 10, p. 5117-5121, oct. 2012.
- [297] B. Wang *et al.*, « Necrosis of HepG2 cancer cells induced by the vibration of magnetic particles », *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 344, p. 193-201, oct. 2013.
- [298] M. F. Contreras, T. Ravasi, et J. Kosel, « Targeted cancer cell death induced by biofunctionalized magnetic nanowires », in *2nd Middle East Conference on Biomedical Engineering*, Doha, Qatar, 2014, p. 47-50.

- [299] S. Leulmi *et al.*, « Triggering the apoptosis of targeted human renal cancer cells by the vibration of anisotropic magnetic particles attached to the cell membrane », *Nanoscale*, vol. 7, n° 38, p. 15904-15914, oct. 2015.
- [300] Y. Cheng *et al.*, « Rotating magnetic field induced oscillation of magnetic particles for in vivo mechanical destruction of malignant glioma », *Journal of Controlled Release*, vol. 223, p. 75-84, févr. 2016.
- [301] Y. Shen *et al.*, « Elongated Nanoparticle Aggregates in Cancer Cells for Mechanical Destruction with Low Frequency Rotating Magnetic Field », *Theranostics*, vol. 7, n° 6, p. 1735-1748, 2017.
- [302] F. Mazuel *et al.*, « Forced- and Self-Rotation of Magnetic Nanorods Assembly at the Cell Membrane: A Biomagnetic Torsion Pendulum », *Small*, vol. 13, n° 31, p. 1701274, août 2017.
- [303] R. Mansell *et al.*, « Magnetic particles with perpendicular anisotropy for mechanical cancer cell destruction », *Sci Rep*, vol. 7, n° 1, p. 1-7, juin 2017.
- [304] M. Subramanian, A. Miaskowski, S. I. Jenkins, J. Lim, et J. Dobson, « Remote manipulation of magnetic nanoparticles using magnetic field gradient to promote cancer cell death », *Appl. Phys. A*, vol. 125, n° 4, p. 226, mars 2019.
- [305] B. G. Nair, Y. Nagaoka, H. Morimoto, Y. Yoshida, T. Maekawa, et D. Sakthi Kumar, « Aptamer conjugated magnetic nanoparticles as nanosurgeons », *Nanotechnology*, vol. 21, n° 45, p. 455102, nov. 2010.
- [306] D. W. Wong, W. L. Gan, N. Liu, et W. S. Lew, « Magneto-actuated cell apoptosis by biaxial pulsed magnetic field », *Scientific Reports*, vol. 7, n° 1, déc. 2017.
- [307] Y. I. Golovin *et al.*, « Towards nanomedicines of the future: Remote magneto-mechanical actuation of nanomedicines by alternating magnetic fields », *Journal of Controlled Release*, vol. 219, p. 43-60, déc. 2015.
- [308] Yu. I. Golovin *et al.*, « Selective Deformation of Single Macromolecules and Biomolecular Structures as a Method for Remote Control of Their Properties and Functions for Next-Generation Medicine », *Russ. Metall.*, vol. 2019, n° 4, p. 374-384, avr. 2019.
- [309] D. Liu, Z. Wang, L. Wang, et A. Cuschieri, « Finite Element Study of Carbon Nanotube Induced Cell Membrane Poration for Drug and Gene Delivery », *J Med Imaging Hlth Inform*, vol. 2, n° 2, p. 132-138, juin 2012.
- [310] L. Vande Walle et M. Lamkanfi, « Pyroptosis », *Current Biology*, vol. 26, n° 13, p. R568-R572, juill. 2016.
- [311] M. N. Bouchlaka *et al.*, « Mechanical Disruption of Tumors by Iron Particles and Magnetic Field Application Results in Increased Anti-Tumor Immune Responses », *PLoS ONE*, vol. 7, n° 10, p. e48049, oct. 2012.
- [312] A. O. Fung, V. Kapadia, E. Pierstorff, D. Ho, et Y. Chen, « Induction of Cell Death by Magnetic Actuation of Nickel Nanowires Internalized by Fibroblasts », *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 112, n° 39, p. 15085-15088, oct. 2008.
- [313] C. Bustamante, Y. R. Chemla, N. R. Forde, et D. Izhaky, « Mechanical Processes in Biochemistry », *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 73, n° 1, p. 705-748, juin 2004.
- [314] H. Itoh *et al.*, « Mechanically driven ATP synthesis by F₁-ATPase », *Nature*, vol. 427, n° 6973, p. 465-468, janv. 2004.
- [315] Yu. I. Golovin, S. L. Gribanovskii, N. L. Klyachko, et A. V. Kabanov, « Nanomechanical control of the activity of enzymes immobilized on single-domain magnetic nanoparticles », *Tech. Phys.*, vol. 59, n° 6, p. 932-935, juin 2014.
- [316] F. Mosconi, J. F. Allemand, et V. Croquette, « Soft magnetic tweezers: A proof of principle », *Review of Scientific Instruments*, vol. 82, n° 3, p. 034302, mars 2011.

- [317] P. Clerc *et al.*, « Targeted Magnetic Intra-Lysosomal Hyperthermia produces lysosomal reactive oxygen species and causes Caspase-1 dependent cell death », *Journal of Controlled Release*, vol. 270, p. 120-134, janv. 2018.
- [318] Y. Qiang, J. Liu, et E. Du, « Dynamic fatigue measurement of human erythrocytes using dielectrophoresis », *Acta Biomaterialia*, vol. 57, p. 352-362, juill. 2017.
- [319] U. Repnik, M. Hafner Česen, et B. Turk, « Lysosomal membrane permeabilization in cell death: Concepts and challenges », *Mitochondrion*, vol. 19, p. 49-57, nov. 2014.
- [320] Cirman et al. « Selective Disruption of Lysosomes in HeLa Cells Triggers Apoptosis Mediated by Cleavage of Bid by Multiple Papain-like Lysosomal Cathepsins ». *Journal of Biological Chemistry* 2003
- [321] C. Y. Taabazuing, M. C. Okondo, et D. A. Bachovchin, « Pyroptosis and Apoptosis Pathways Engage in Bidirectional Crosstalk in Monocytes and Macrophages », *Cell Chemical Biology*, vol. 24, n° 4, p. 507-514.e4, avr. 2017.
- [322] Galluzzi, Lorenzo et al. "Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018." *Cell death and differentiation* vol. 25,3 (2018): 486-541. doi:10.1038/s41418-017-0012-4
- [323] S. He et X. Wang, « RIP kinases as modulators of inflammation and immunity », *Nat Immunol*, vol. 19, n° 9, p. 912-922, sept. 2018.
- [324] N. Hallali, « Utilisation de nanoparticules magnétiques dans les traitements antitumoraux: Au-delà de l'hyperthermie magnétique », Thèse p. 207.
- [325] J. Pu, C. M. Guardia, T. Keren-Kaplan, et J. S. Bonifacino, « Mechanisms and functions of lysosome positioning », *J Cell Sci*, vol. 129, n° 23, p. 4329-4339, déc. 2016.
- [326] A. Serrano-Puebla et P. Boya, « Lysosomal membrane permeabilization as a cell death mechanism in cancer cells », *Biochemical Society Transactions*, vol. 46, n° 2, p. 207-215, avr. 2018.
- [327] Thoumine et al. « Influence of adhesion and cytoskeletal integrity on fibroblast traction ». *Cell Motility* 1996
- [328] D. Robert, T.-H. Nguyen, F. Gallet, et C. Wilhelm, « In Vivo Determination of Fluctuating Forces during Endosome Trafficking Using a Combination of Active and Passive Microrheology », *PLoS ONE*, vol. 5, n° 4, p. e10046, avr. 2010.
- [329] G. Yang, R. C. Crawford, et J. H.-C. Wang, « Proliferation and collagen production of human patellar tendon fibroblasts in response to cyclic uniaxial stretching in serum-free conditions », *Journal of Biomechanics*, vol. 37, n° 10, p. 1543-1550, oct. 2004.
- [330] Y. He, E. Macarak, J. Korostoff, et P. Howard, « Compression and Tension: Differential Effects on Matrix Accumulation by Periodontal Ligament Fibroblasts In Vitro », *Connective tissue research*, vol. 45, p. 28-39, févr. 2004.