

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY 1

2011

FACULTE DE PHARMACIE

Formulations pour le traitement local de tumeurs solides par hyperthermie à médiation magnétique.

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 14 Janvier 2011

pour obtenir

le Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie

par Pol-Edern **LE RENARD**

né le 19 avril 1977 à Thionville (57)

Membres du Jury

Président : **M. Philippe MAINCENT,**

Professeur – Laboratoire de Pharmacie Galénique et Biopharmacie, Faculté de Pharmacie de Nancy- Université de Nancy.

Juges : **M. Olivier JORDAN,**

Adjoint scientifique - Section des Sciences Pharmaceutiques – Biopharmacie, École de Pharmacie Genève Lausanne, Université de Genève.

Mme. Marie-Christine BÉNÉ,

Professeur PU-PH en Immunologie – CHU et Faculté de Médecine de Nancy – Nancy.

Mme Roudayna DIAB,

Maître de Conférences – Laboratoire de Pharmacie Galénique et Biopharmacie, Faculté de Pharmacie de Nancy – Université de Nancy.

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE
APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES
DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE
CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

UNIVERSITÉ Henri Poincaré, NANCY 1
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2010-2011

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Francine KEDZIEREWICZ

Président du Conseil de la Pédagogie

Bertrand RIHN

Commission de la Recherche

Christophe GANTZER

Mobilité ERASMUS et Communication

Francine KEDZIEREWICZ

Hygiène Sécurité

Laurent DIEZ

Responsable de la filière Officine : Francine PAULUS

Responsables de la filière Industrie : Isabelle LARTAUD,
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable du Collège d'Enseignement : Jean-Michel SIMON
Pharmaceutique Hospitalier

Louis SCHWARTZBROD

DOYEN HONORAIRE

Chantal FINANCE
Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON
Marie-Madeleine GALTEAU
Gérard SIEST
Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY
Thérèse GIRARD
Maurice HOFFMANN
Michel JACQUE
Lucien LALLOZ
Pierre LECTARD
Vincent LOPPINET
Marcel MIRJOLET
François MORTIER
Maurice PIERFITTE
Janine SCHWARTZBROD

MAITRES DE CONFERENCES

HONORAIRES

Monique ALBERT
Gérald CATAU
Jean-Claude CHEVIN
Jocelyne COLLOMB
Bernard DANGIEN
Marie-Claude FUZELLIER
Françoise HINZELIN
Marie-Andrée IMBS
Marie-Hélène LIVERTOUX
Jean-Louis MONAL
Dominique NOTTER
Marie-France POCHON
Anne ROVEL
Maria WELLMAN-ROUSSEAU

ASSISTANT HONORAIRE

Marie-Catherine BERTHE
Annie PAVIS

ENSEIGNANTS

PROFESSEURS

| | |
|-------------------------------------|--|
| Gilles AULAGNER | Pharmacie clinique |
| Alain BAGREL..... | Biochimie |
| Jean-Claude BLOCK | Santé publique |
| Christine CAPDEVILLE-ATKINSON | Pharmacologie cardiovasculaire |
| Chantal FINANCE..... | Virologie, Immunologie |
| Pascale FRIANT-MICHEL..... | Mathématiques, Physique, Audioprothèse |
| Christophe GANTZER | Microbiologie environnementale |
| Max HENRY | Botanique, Mycologie |
| Jean-Yves JOUZEAU..... | Bioanalyse du médicament |
| Pierre LABRUDE..... | Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile |
| Isabelle LARTAUD..... | Pharmacologie cardiovasculaire |
| Dominique LAURAIN-MATTAR..... | Pharmacognosie |
| Brigitte LEININGER-MULLER | Biochimie |
| Pierre LEROY | Chimie physique générale |
| Philippe MAINCENT | Pharmacie galénique |
| Alain MARSURA | Chimie thérapeutique |
| Patrick MENU | Physiologie |
| Jean-Louis MERLIN..... | Biologie cellulaire oncologique |
| Jean-Bernard REGNOUF de VAINS | Chimie thérapeutique |
| Bertrand RIHN | Biochimie, Biologie moléculaire |
| Jean-Michel SIMON..... | Economie de la santé, législation pharmaceutique |

MAITRES DE CONFÉRENCES

| | |
|-------------------------|--|
| Sandrine BANAS | Parasitologie |
| Mariette BEAUD | Biologie cellulaire |
| Emmanuelle BENOIT | Communication et santé |
| Isabelle BERTRAND..... | Microbiologie environnementale |
| Michel BOISBRUN | Chimie thérapeutique |
| François BONNEAUX | Chimie thérapeutique |
| Ariane BOUDIER..... | Chimie Physique |
| Cédric BOURA..... | Physiologie |
| Igor CLAROT | Chimie analytique |
| Joël COULON..... | Biochimie |
| Sébastien DADE..... | Bio-informatique |
| Dominique DECOLIN | Chimie analytique |
| Béatrice DEMORE..... | Pharmacie clinique |
| Joël DUCOURNEAU | Biophysique, audioprothèse, acoustique |
| Florence DUMARCAY..... | Chimie thérapeutique |
| François DUPUIS..... | Pharmacologie |
| Raphaël DUVAL | Microbiologie clinique |
| Béatrice FAIVRE..... | Hématologie - Génie Biologique |
| Adel FAIZ..... | Biophysique-acoustique |
| Luc FERRARI | Toxicologie |
| Stéphane GIBAUD | Pharmacie clinique |
| Thierry HUMBERT | Chimie organique |

Frédéric JORANDSanté et environnement
Olivier JOUBERT.....Toxicologie, sécurité sanitaire
Francine KEDZIEREWICZPharmacie galénique
Alexandrine LAMBERTInformatique, Biostatistiques
Faten MERHI-SOUSSI.....Hématologie biologique
Christophe MERLINMicrobiologie environnementale et moléculaire
Blandine MOREAUPharmacognosie
Maxime MOURER.....Pharmacochimie supramoléculaire
Francine PAULUSInformatique
Christine PERDICAKISChimie organique
Caroline PERRIN-SARRADOPharmacologie
Virginie PICHONBiophysique
Anne SAPIN.....Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDERMycologie, Botanique
Nathalie THILLYSanté publique
Gabriel TROCKLEPharmacologie
Marie-Noëlle VAULTIER.....Biodiversité végétale et fongique
Mohamed ZAIYOUBiochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTIPharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSERSémiologie

PROFESSEUR AGREGÉ

Christophe COCHAUDAnglais

Bibliothèque Universitaire Santé - Lionnois (Pharmacie - Odontologie)

Anne-Pascale PARRET.....Directeur

SERMENT DES APOTHICAIRES

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D' honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Résumé:

Dans ce travail, nous passons en revue les efforts de formulation et de préformulation pharmaceutiques pertinentes pour les nouvelles modalités d'hyperthermie magnétiquement induite dans le traitement des lésions cancéreuses pour lesquelles une thermo thérapie est indiquée, ou pour des indications *de novo* dans certaines situations cliniques. Nous introduirons d'abord les principes biologiques généraux sous-jacents à l'utilisation de l'hyperthermie, compte tenu des moyens techniques pour générer l'hyperthermie actuellement accessibles, nous détaillerons plus précisément différentes modalités magnétiques de chauffage. Nous présenterons alors une synthèse des formulations décrites dans la littérature, en comparant leurs spécificités, avantages et inconvénients. Premièrement, nous considérerons les biomatériaux basés sur les céramiques, les verres et les ciments, pour hyperthermie à médiation magnétique dans le traitement des tumeurs solides de l'os, tenant compte de ses spécificités biologiques. Dans un deuxième temps seront considérées les formulations destinées à l'induction magnétique d'une hyperthermie localisée pour le traitement de tumeurs solides des tissus mous, en insistant sur les modulations biochimiques et pharmacologiques. Dans la dernière partie, nous considérerons les formulations de liposomes magnétiques qui peuvent être également administrées dans divers types de tumeurs. Nous n'avons pas détaillé ici les formulations magnétiques pour l'hyperthermie magnétique fluide qui sont basées sur l'administration de suspensions de nanoparticules magnétiques stabilisées par un revêtement de surface permettant des applications biologiques. Les importantes considérations biologiques et immunologiques qui sont associés à ces formulations seront décrites. En tout point, cette revue se concentrera sur l'importance de la formulation pharmaceutique et sur les interactions extrêmement complexes en lien avec l'hyperthermie qui devraient être prises en compte dans diverses applications médicales.

Mots clés:

hyperthermie, oncologie, induction magnétique, champs magnétiques alternatifs, os, verres, céramiques, ciments, microparticules, embolisation, *in situ* dépôts, implants injectables, liposomes, immunité.

Remerciements:

Je tiens à remercier tous les membres du jury pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie Philippe Maincent d'avoir accepté d'être directeur et de présider de ce jury.

Je remercie Roudayna Diab d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie Olivier Jordan, pour notre longue collaboration autour du projet de recherche original qu'il a construit.

Je remercie Marie-Christine Béné, pour m'avoir transmis son goût de la recherche scientifique.

Je remercie ma famille pour tout le support apporté dans les moments les plus difficiles.

Au lecteur:

Merci infiniment à tous ceux qui liront ce travail. Si ils le souhaitent je me tiens à leur disposition pour toute correspondance à l'adresse e-mail:

lerenard.pe@gmail.com

et je serai très heureux de tous commentaires prolongeant ce manuscrit pour lesquels j'essaierai aussi d'animer un blog sur le site internet wordpress.com intitulé: thesepelr

<http://thesepelr.wordpress.com>

une version électronique de ce manuscrit sera par ailleurs déposée sur le serveur TEL du CCSD (Centre pour la Communication Scientifique Directe) à l'adresse internet suivante:

<http://tel.archives-ouvertes.fr>

Je dédie cette thèse à Nadja Stille que j'aime par-dessus tout.

Table des matières

| | | |
|-------|--|-----------|
| 1 | Introduction: comprendre la complexité de l'hyperthermie..... | <u>1</u> |
| 1.1 | Principes biologiques et cliniques de l'hyperthermie induite..... | <u>1</u> |
| 1.1.1 | Les effets et la toxicité de la chaleur au niveau cellulaire..... | <u>2</u> |
| | Changements morphostructuraux induits par la chaleur..... | <u>4</u> |
| | Les effets métaboliques de la chaleur..... | <u>13</u> |
| | Cytotoxicité de la chaleur et dosimétrie thermique..... | <u>15</u> |
| | Biologie moléculaire des réponses aux stressés: le choc thermique, l'hypoxie et connexions..... | <u>23</u> |
| 1.1.2 | Hyperthermie en oncologie..... | <u>27</u> |
| | Les modalités de traitement par hyperthermie..... | <u>27</u> |
| | Hyperthermie et physiopathologie des tumeurs solides..... | <u>28</u> |
| | Combinaisons thérapeutiques avec hyperthermie; procédures d'embolisation..... | <u>34</u> |
| | Hyperthermie et considérations immunologiques..... | <u>36</u> |
| 1.2 | Technologie de l'hyperthermie induite, modalités diverses et d'induction magnétique..... | <u>37</u> |
| 1.2.1 | Les diverses modalités physiques pour induire une hyperthermie..... | <u>37</u> |
| 1.2.2 | Modalités inductives pour l'hyperthermie induite..... | <u>38</u> |
| 1.2.3 | Pertes de chaleur par stimulation magnétique..... | <u>40</u> |
| | Pertes par hystérèse..... | <u>40</u> |
| | Pertes par relaxations magnétiques..... | <u>40</u> |
| 2 | Formulations pour le traitement hyperthermique local des tumeurs des tissus durs..... | <u>42</u> |
| 2.1 | Matériaux céramiques, verres et verre-céramiques magnétiques..... | <u>47</u> |
| 2.2 | Particules et microsphères de verre/céramique..... | <u>52</u> |
| 2.3 | Matériaux magnétiques pour ciments orthopédiques..... | <u>56</u> |
| 3 | Formulations et procédures mini-invasives pour hyperthermie locale des tumeurs de tissus mous à médiation magnétique..... | <u>58</u> |
| 3.1 | Injections artérielles et embolisation artérielle hyperthermiques: AEH..... | <u>59</u> |
| 3.1.1 | Microparticules..... | <u>59</u> |
| 3.1.2 | Formulation formant un dépôt..... | <u>60</u> |
| 3.2 | Injection intra-tumorale directe et hyperthermie (DIH: direct injection hyperthermia)..... | <u>61</u> |
| 3.2.1 | Formulation formant un dépôt..... | <u>61</u> |
| 3.2.2 | Formulations formant un implant in situ..... | <u>62</u> |
| 4 | Liposomes magnétiques et hyperthermie locale pour le traitement de tumeurs..... | <u>68</u> |
| 4.1 | Caractéristiques générales des liposomes..... | <u>68</u> |
| 4.2 | Magnétoliposomes et hyperthermie locale de la tumeur par induction magnétique..... | <u>69</u> |
| 4.2.1 | Magnétoliposomes conjugués aux anticorps dirigés contre CA9 (« human MN »)..... | <u>76</u> |
| 4.2.2 | Magnétoliposomes conjugués aux anticorps anti-ERBB2 (trastuzumab)..... | <u>77</u> |
| | Magnétoliposomes immunoconjugués anti-ERBB2 et considérations pharmaceutiques associées..... | <u>77</u> |
| | Magnétoliposomes immunoconjugués anti-ERBB2 et considérations micropharmacologiques pour les immunoliposomes anti-ERBB2 non magnétiques..... | <u>78</u> |
| 4.3 | Magnétoliposomes cationiques et induction magnétique de l'hyperthermie dans un modèle de métastases osseuse de cancer de prostate..... | <u>80</u> |
| 4.4 | Magnétoliposomes neutres comme intermédiaire pour l'hyperthermie induite magnétiquement..... | <u>81</u> |
| 5 | Conclusion..... | <u>82</u> |
| 6 | Références..... | <u>84</u> |

Table des tableaux et figures:

| | | | |
|------------|------|------------|---------|
| Tableau 1: | p 34 | Figure 7: | p 17 |
| Tableau 2: | p 50 | Figure 8: | p 19 |
| Figure 1: | p 2 | Figure 9: | p 20 |
| Figure 2: | p 5 | Figure 10: | p 45&46 |
| Figure 3: | p 7 | Figure 11: | p 58 |
| Figure 4: | p 8 | Figure 12: | p 63 |
| Figure 5: | p 11 | Figure 13: | p 65&66 |
| Figure 6: | p 12 | Figure 14: | p 75&76 |

1 Introduction: comprendre la complexité de l'hyperthermie

En oncologie, les multiples modalités de l'hyperthermie induite permettent pour les protocoles récents, toujours en association avec de nombreuses thérapies de référence, l'augmentation du gain thérapeutique au travers des effets biologiques et toxicogènes de la chaleur, impliquant des mécanismes variés et multidirectionnels [1]. Notre exposé portera sur les formulations et les modalités de l'hyperthermie spécifiques du traitement local des tumeurs malignes solides, à l'exclusion d'autres types de tumeurs ou d'autres modalités thérapeutiques. Dans cette partie introductive, nous essaierons d'abord de définir les effets biologiques et toxicogènes du stress par la chaleur et la modulation de la réponse, qui sous-tendent les justifications biologiques et cliniques du traitement par hyperthermie induite et les possibilités de formulation pharmaceutique. Par la suite, nous présenterons l'état d'avancement des techniques d'hyperthermie induite avant de souligner les principes physiques de l'hyperthermie magnétique. Cette dernière autorise de nombreuses possibilités pour la formulation pharmaceutique. Nous ne ferons qu'évoquer des aspects techniques et physiques de l'hyperthermie magnétique fluide (MFH), technique modèle et la plus avancée en ce qui concerne l'hyperthermie par médiation magnétique. Cette technique fait emploi strictement de suspensions de nanoparticules magnétiques qui, bien qu'étant des formulations pharmaceutiques à part entière, ne seront pas traitées ici. Néanmoins, certaines formulations envisagées ici sont en partie composées de nanoparticules magnétiques, voire des mêmes suspensions de nanoparticules, alors susceptibles d'être libérés. Ainsi, certains de leurs aspects physicochimiques fondamentaux ou des préoccupations biopharmaceutiques associées seront communs. Pour approfondir ces importants aspects, le lecteur pourra se référer aux nombreuses revues disponibles, concernant autant les formulations de particules magnétiques utilisées comme agent de contraste IRM que celles spécifiquement utilisées pour l'hyperthermie. Dans la deuxième partie, nous étudierons les formulations destinées au traitement par hyperthermie locale de tumeurs des tissus durs. Ces formulations sont les céramiques, les verres et leurs composites verre-céramique, et les ciments. Dans la troisième partie, nous traiterons des formulations peu invasives pour le traitement hyperthermique local de tumeurs des tissus mous. Il s'agira des microparticules et des formulations formant un dépôt ou un implant *in situ* après injection intratumorale ou artérielle. Enfin, nous consacrerons la quatrième partie aux formulations de liposomes magnétiques utiles pour l'induction de l'hyperthermie.

1.1 Principes biologiques et cliniques de l'hyperthermie induite

Notre compréhension actuelle des effets biologiques et toxicogènes de la chaleur sera exposée depuis les niveaux cellulaire et subcellulaire, en passant par les niveaux tissulaires, jusqu'à celui de la physiopathologie des tumeurs solides. Nous tenterons d'exposer le haut degré d'intrication entre biologie moléculaire et les différents niveaux biologiques et physiopathologiques pour les tumeurs. Ainsi pourra-t-on alors envisager la diversité des usages et effets thérapeutiques de l'hyperthermie, qui peuvent apparaître contradictoires à première vue.

1.1.1 Les effets et la toxicité de la chaleur au niveau cellulaire

Comme pour une variété de stress, les cellules de mammifères exposées à la chaleur réagissent sur le plan morphostructural et biologique. Ceci apparaît variablement selon les types cellulaires et proportionnellement à l'ampleur du stress. L'ampleur d'un stress thermique peut être *a priori* évaluée en combinant température atteinte et durée d'exposition [2,3]. Les changements morphostructuraux induits par un stress thermique de faible ampleur semblent limités, transitoires, réversibles et réparables. Ce genre de stress est dit subléta, car les fonctions cellulaires ou le développement cellulaire ne sont que temporairement affectés. En revanche, les modifications induites par un stress thermique de grande ampleur semblent prolongées. Si cela est encore possible (stress thermique non extrême), le retour de la cellule à l'état basal, par réparation et régénération, s'observe après un délai plus ou moins long, en lien avec l'ampleur du stress. Cependant des stresses de grande ampleur altéreront souvent irrémédiablement les fonctions cellulaires, compromettant la survie et la progression des cellules. Aussi, l'exposition à la chaleur peut supprimer l'activité clonogénique des cellules, conséquence d'effets cyostatiques mais aussi cytotoxiques. Finalement le déclenchement de la mort cellulaire apparaît de manière stochastique et rapide. Certains auteurs préfèrent alors parler d'effets cytocides de la chaleur [4]. Les effets toxicogènes de la chaleur sont nombreux. Différentes formes de mort cellulaire après exposition à la chaleur sont décrites: mort métabolique, apoptose, autophagie (Figure 1, [5]), nécrose ou mort reproductive. Les effets cytocides de l'hyperthermie induite, c'est-à-dire relevant d'une mort cellulaire directe, se réfèrent généralement à

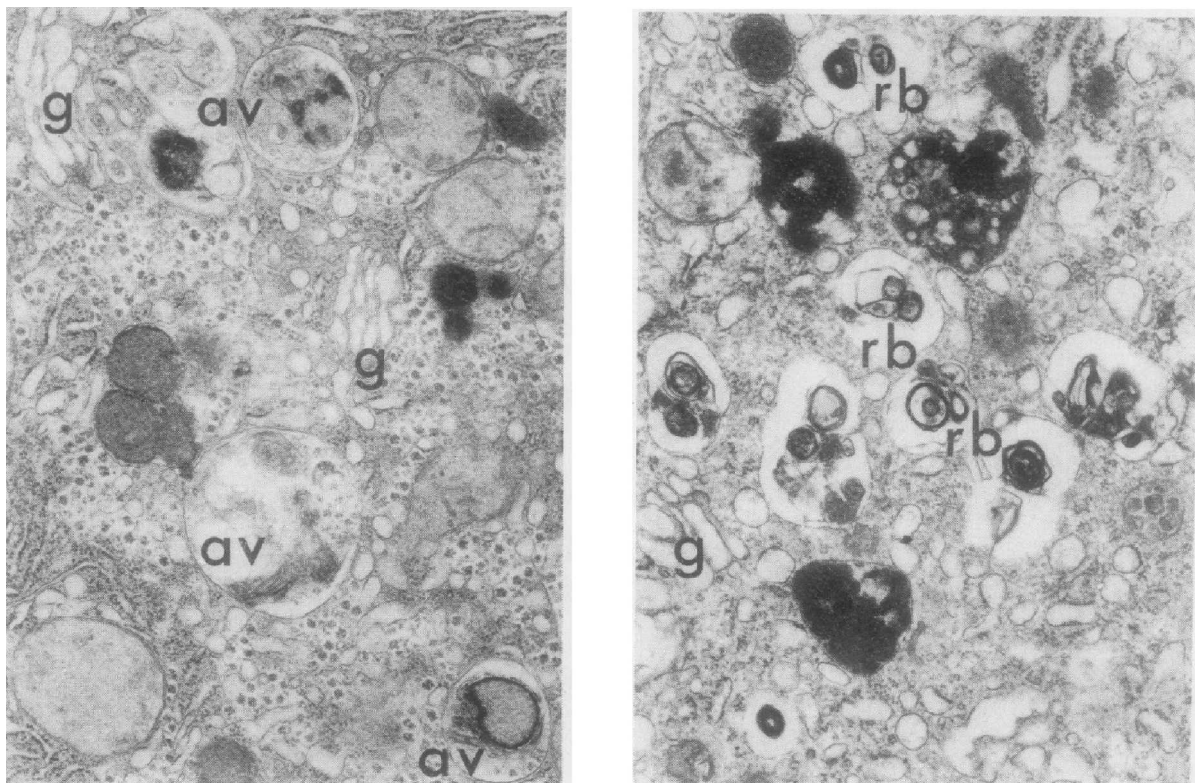


Figure 1: Mort cellulaire par autophagie (d'après la référence [5])

Photographies en microscopie électronique de biopsies du foie d'un patient traité pour métastase d'un sarcome ostéogénique au foie par hyperthermie, immédiatement ou 24 h après traitement, respectivement pour la photographie de gauche et celle de droite. Les vacuoles autophagiques (av) apparaissent dans les premiers temps englobant des organelles reconnaissables, puis apparaissent au stade de corps résiduel (rb). À noter les dilatations de l'appareil de Golgi (g).

la mort cellulaire pendant ou directement après un stress de chaleur. À cet égard, les méthodes de détermination du nombre de cellules survivantes pour évaluer le taux de survie après un traitement peuvent être trompeuses [4]. D'autres méthodes de comptage du nombre de cellules mortes, par exemple basées sur l'exclusion d'un colorant vital, permettent aussi une caractérisation des taux de survie. Très pertinente pour l'oncologie et donc pour l'hyperthermie, une méthode de détermination des taux de survie par mesure de la clonogénicité est fréquemment utilisée. Cette méthode révèle alors la résultante des effets cytostatiques et cytocides pour un traitement thermique donné [4]. Quand les méthodes clonogéniques sont appliquées, les effets strictement cytocides, c'est-à-dire la mort directe de cellules, peuvent être alors quelque peu sous-estimés [6]. En clinique, pour un traitement hyperthermique donné, la cytotoxicité regroupant ces deux effets est importante du point de vue thérapeutique. Remarquablement, les taux de survies cellulaires ne sont le plus souvent pas corrélés avec l'ampleur des perturbations morphostructurales induites par la chaleur, mais avec la rapidité à laquelle les cellules sont capable de retrouver leurs caractéristiques basales [4]. À l'exception de conditions bien particulières, lors d'un stress, les populations cellulaires survivantes développent une adaptation physiologique au stress sur des temps bien plus longs que ceux de la réponse morphostructurale immédiatement observée. Cette adaptation physiologique permettra lors d'une exposition ultérieure une plus grande capacité d'adaptation et de résistance au stress, conduisant *in fine* à des taux de survies plus élevés. Cet état physiologique d'endurance au stress et à ses effets toxicogéniques est qualifié de tolérance. La tolérance se conçoit à chaque niveau de complexité biologique d'un organisme: cellules, tissus et organes, physiologiquement organisés mais aussi physiopathologiquement perturbés (la tolérance peut aussi s'appliquer à un organisme entier pour certains organismes dit extrêmophiles). Ici, nous introduirons les aspects physiologiques du développement de la tolérance au plan cellulaire car celui-ci apparaît comme dénominateur commun, plus spécifiquement encore pour le stress thermique. L'adaptation au stress thermique est appelée thermotolérance. L'adaptation à d'autres stress, souvent concomitants avec les plurimodalités du traitement anticancéreux moderne, comme celui induit par les rayons X ou la chimiothérapie peuvent ainsi être appelées radiotolérance ou chimiotolérance, respectivement, mais sont communément qualifiées de radiorésistance ou chimiorésistance. D'un côté, le développement d'une tolérance après un stress donné génère une période de tolérance à ce même stress, dont le degré de résistance et la durée sont en rapport avec l'ampleur du stress initial. Aussi, le développement d'une tolérance au stress thermique suite à un premier stress thermique doit être proprement appelée une thermotolérance thermo-induite. Ceci doit être en effet précisé car il existe de nombreuses interconnexions entre les mécanismes d'une variété de réponses adaptatives. Ceci est probablement en lien avec le fait que ces réponses soient issues d'une voie ancestrale commune. Aussi, un type de stress donné peut induire le développement de tolérances non seulement pour ce type de stress, mais, dans une certaine mesure, aussi pour d'autres formes de stress. Par exemple, le stress thermique peut induire transitoirement un certain degré de radiotolérance (ou radiorésistance) ou de chimiotolérance (ou chimiorésistance). À noter pour cette dernière, que la forme de résistance aux agents chimiotoxiques multiples (« multiple drug resistance ») semble peu probable du fait que la protéine P170, sa composante moléculaire majeure, n'est pas connue pour être induite par la chaleur. Comme l'hyperthermie ne s'envisage présentement qu'en tant qu'adjuvant, la réciproque: une thermotolérance induite par la radiothérapie ou la chimiothérapie est moins étudiée et connue. Ces tolérances problématiques sont à prendre en considération lors de séquences et combinaisons de traitements visant des effets cytotoxiques additifs. Le schéma de traitement doit alors être ajusté à la cinétique de tolérance. Les tolérances peuvent être dramatiques lorsque l'on vise pour certains schémas de séquences de thérapie combinatoire des effets de synergie précis, sur laquelle repose le gain thérapeutique.

Changements morphostructuraux induits par la chaleur

Le pléomorphisme cellulaire induit par la chaleur, notamment au niveau de la membrane cytoplasmique, ainsi que le blocage temporaire de la cyclose, indique des perturbations et un réarrangement du cytosquelette [7]. Le cytosquelette est un réseau fibreux très dynamique et adaptatif qui soutient la cellule eucaryote et sous-tend son organisation, ses fonctions et la division cellulaire. Le cytosquelette comprend différents types de filaments: i) les microfilaments (polymères à base d'actine) qui déterminent la forme de la surface cellulaire et sont nécessaires à la locomotion, ii) les microtubules (polymères à base de tubuline) assurant le mouvement et le positionnement des organelles ainsi que le transport intracellulaire, et, iii) les filaments intermédiaires (polymères à base de monomères variés: vimentine, kératine, etc pour les métazoaires) qui apportent la résistance mécanique, notamment au stress de cisaillement [8]. Un grand nombre de protéines dites accessoires ainsi que les ions calcium intracellulaires libres sont nécessaires au fonctionnement de ces filaments. Le mouvement de la membrane plasmique et ses fonctions dépendent de la couche corticale et gélatineuse du cytosquelette, qui la supporte et est impliquée dans la régulation par de nombreux signaux extracellulaires. En fonction de la lignée cellulaire et de l'ampleur du choc thermique, un arrondissement (Figure 2) ou un aplatissement de la cellule, ainsi que la formation de protubérances membranaires (« bleb ») sont observés. Les perturbations du cytosquelette apparaissent réversibles, si ce n'est pour des stress thermiques extrêmes, alors directement létaux. En général, l'arrondissement cellulaire signe un réarrangement des microfilaments (actine), mais il est aussi caractéristique du début de l'apoptose. La réorganisation des microtubules et/ou des filaments intermédiaires, notamment ceux à base de vimentine, sont en lien avec l'aplatissement cellulaire, qui est, lui, caractéristique de l'arrêt de la croissance cellulaire [7,9]. Les protéines accessoires puis les microtubules se désagrègent transitoirement pendant le stress thermique avant de se réagréger, occasionnant peu ou prou une désorganisation. La tubuline notamment n'est pas dépolymérisée jusqu'à 42 °C, mais elle l'est à 44°C. Ces perturbations microtubulaires peuvent contribuer pour partie au pléomorphisme cellulaire. Elles peuvent aussi parfois être à l'origine de l'apparition d'un gigantisme, comme cela est bien décrit pour certaines cellules de mélanome après traitement par la chaleur [4]. Bien qu'il n'y ait globalement pas de corrélation directe entre l'effet de la chaleur sur les microtubules et la survie, leur altération explique cependant bien l'extrême thermosensibilité des cellules en phase de mitose. En effet, le fuseau mitotique est par nature très sensible à l'altération même transitoire des microtubules, conduisant à la tétraploïdie et au gigantisme des cellules qui n'ont pu mener leur mitose à terme. La mort cellulaire mitotique suivra directement le cycle concerné ou possiblement après accomplissement d'un cycle supplémentaire (impliquant l'octaploïdie qui est aussi décrite après traitement par la chaleur). Ainsi, le fort taux de mort cellulaire mitotique explique les faibles taux de survie finalement observés après exposition à la chaleur de ces cellules synchronisées en phase de mitose [4]. Les filaments intermédiaires, qui assurent la connexion entre le réseau de microtubules et les membranes, semblent endommagés par la chaleur plus sévèrement que les microtubules eux-mêmes [4]. Après 3h à 42°C, la morphologie plate qu'adoptent des fibroblastes de rat a été associée à l'effondrement des filaments intermédiaires contenant la vimentine situés dans l'espace périnucléaire, les microtubules n'apparaissant pas affectés [9]. Durant le stress thermique, la formation de lamellipodes, trait typique de l'apoptose, a pu être corrélée avec la survie cellulaire [4,10,11]. Mais, de manière générale, la réorganisation du cytosquelette ne peut être interprétée comme une cause mais plutôt comme part entière du processus de réponse au choc thermique qui participe de la survie cellulaire [7]. Concernant le choc thermique, les altérations du cytosquelette sont en fait peu prédictives de la survie cellulaire, tant que l'ampleur du choc thermique n'occasionne pas de dommages manifestement létaux. La capacité

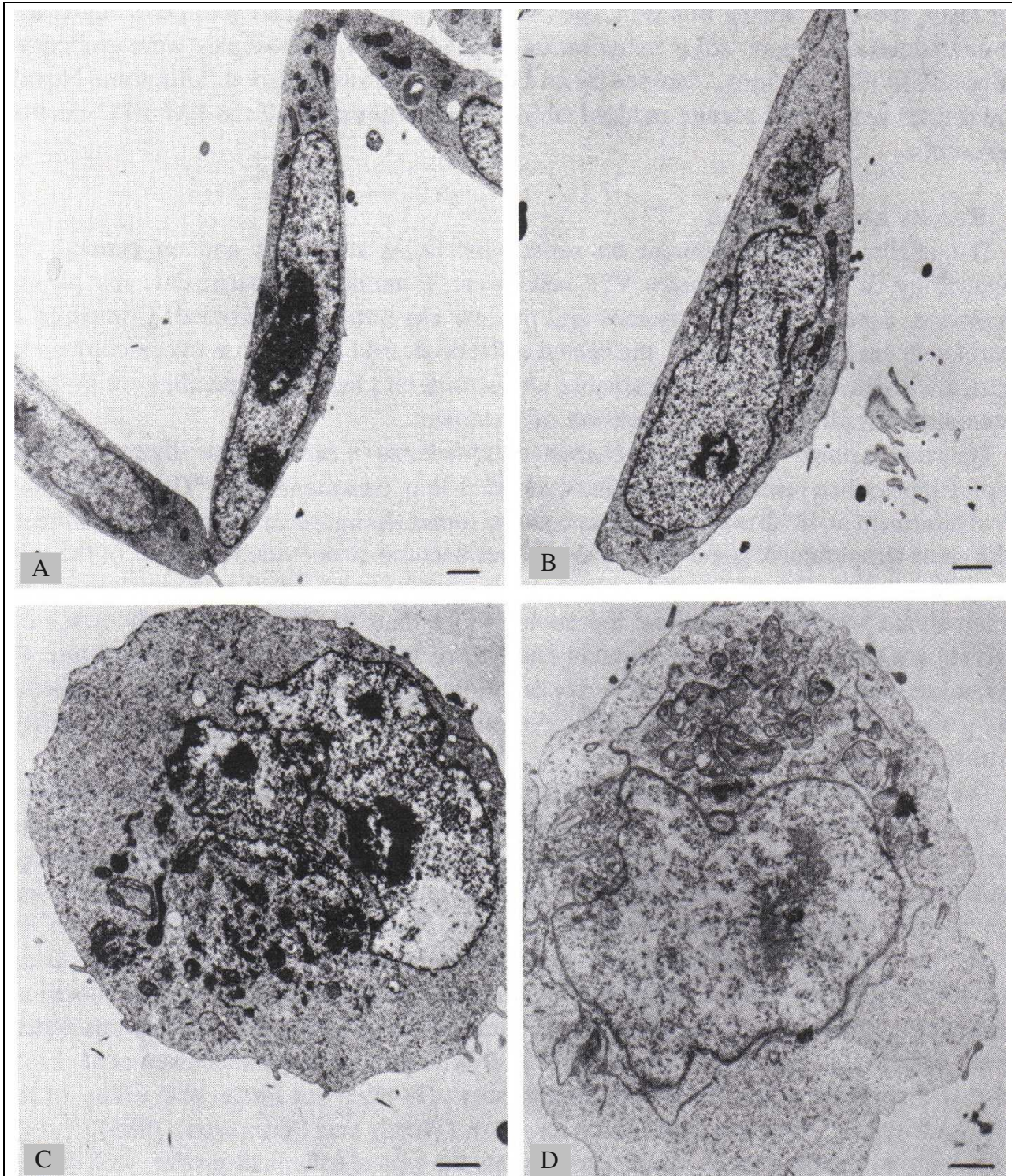


Figure 2: Effets morphostructuraux de la chaleur pour des fibroblastes d'hamster chinois V79 en culture d'après la référence [2] (barre = 1 μ m)

A: Fibroblastes témoins, non traités d'apparence physiologique allongée. Les auteurs précisent que cette apparence reste inchangée pour des chauffages à 42°C de longue durée. **B:** Début d'arrondissement après 1 h à 43°C. **C:** Après 3 h à 43°C, arrondissement cellulaire évident, fragmentations et convolutions du noyau, matrice nucléaire perturbée, et le nucléole perd sa structure fibrillaire. **D:** Changements morphostructuraux considérables après 1 h à 45°C, les matrices cytoplasmiques et nucléaires apparaissent affectées, les organelles sont rassemblés à un pôle de la cellule, dont les mitochondries qui présentent une densité de matrice faible et des dilations et interruptions au niveau des crêtes.

à recouvrer rapidement l'architecture normale du cytosquelette et une morphologie cellulaire normale, suite au choc thermique, durant une période en conditions physiologiques, montre une corrélation directe avec le taux de survie cellulaire [7,12]. Quand les cellules sont soumises à un nouveau stress thermique, cette capacité apparaît aussi caractéristique des celles qui ont été rendues thermotolérantes [7]. En fait, le cytosquelette peut même devenir résistant au choc thermique en l'absence de synthèse protéique. Ceci définit un premier type de thermotolérance, le type I. Il est spécifiquement indépendant de la synthèse de protéines puisque qu'observable lors de l'inhibition de la translation par l'arséniate ou les analogues d'acide aminés [7,13]. Ceci révèle un premier mécanisme de stabilisation cellulaire basé sur des éléments cellulaires préexistants pour limiter les perturbations induites par la chaleur. Parmi les nombreuses interactions biochimiques et métaboliques envisageables, peu ont en fait été approfondies. Les chaperonnes forment une classe de protéines qui interagissent avec les domaines hydrophobes d'autres protéines pour éviter d'indésirables et délétères interactions hydrophobes. Pour ce faire, elles guident et stabilisent le bon repliement des protéines dans leur structure tridimensionnelle native [14,15]. Les domaines hydrophobes sont très souvent impliqués dans des interactions délétères qui conduisent à la perte de fonction, ou dénaturation, des protéines. Ceci est particulièrement critique quand ils sont rendus accessibles aux interactions, c'est-à-dire durant leur synthèse ou après déstabilisation, que la chaleur induit typiquement. Aussi, les chaperonnes interagissent spontanément et rapidement autour de toute poche hydrophobe pour prévenir les interactions irréversibles. Une machinerie protéique se constitue et guide le bon repliement des protéines. Si le repliement adéquat ne peut être catalysé, les chaperonnes restent fermement liées à ces domaines, neutralisant les possibilités de propagation d'interactions délétères jusqu'à ce que la protéine soit prise en charge par les protéases et donc détruite. Ainsi, les chaperonnes présentes à l'état basal dans la cellule sont à même de participer directement à la défense contre les altérations induites par la chaleur. Étant donné les remarquables perturbations morphostructurales consécutives à un stress thermique, une multitude de protéines pourraient être concernées et mobilisées.

Une seconde forme de thermotolérance, le type II, est dépendante de la synthèse protéique. Un de ses traits notoires est d'engager une famille spécifique de protéines qui voient leurs concentrations intracellulaires particulièrement augmentées suite à un choc thermique. Ces protéines sont ainsi appelées « heat shock proteins », HSPs.

La variété et la complexité de leurs aspects moléculaires seront détaillées dans une section dédiée. Attention, les inconsistances dans leur nomenclature peuvent être source de confusions. Ici, nous nous attacherons à adopter la nomenclature et les règles de nomenclature du comité d'harmonisation HUGO (« the HUGO Gene Nomenclature Committee » [16]) pour les gènes ou protéines humains (ce qui implique que les gènes soient entièrement en majuscules et en italique, et les protéines aussi entièrement en majuscules mais par contre pas en italique). Lorsqu'il s'agira d'autres espèces, nous adopterons la présentation en accord avec la base de données du « National Center for Biotechnology Information »: NCBI Entrez Gene database (c'est-à-dire première lettre en majuscule ou non, les suivantes toujours en minuscules, avec les mêmes règles concernant la mise en italique selon la nature de gène ou de protéine). Mais surtout, nous respecterons les récentes directives spécifiquement publiées pour les HSPs, dans la référence [17]. Pour clarté, vis à vis des références citées, l'ancienne nomenclature sera présentée à la suite, entre parenthèses. N'oublions pas que les concentrations de HSPs peuvent être augmentées en réponse à nombre d'autres stress que la chaleur et aussi, que d'autres protéines non classées comme HSP peuvent participer à la réponse au stress thermique, au quel cas la dénomination d'usage générique peut se révéler utile. Il est d'ores et déjà important de noter qu'en regard de leur très fréquentes fonctions de stabilisation d'autres protéines, beaucoup de HSPs peuvent être classées comme chaperonnes à part entière. Par exemple, deux

groupes de HSPs: HSPD1 (HSP60) et HSPA8 (HSC70; HSC71; HSP71; HSP73), constituent aussi deux importants groupes de chaperonnes moléculaires dans les cellules eucaryotes. Pour en revenir aux propriétés de thermotolérance du cytosquelette, certains changements morphostructuraux sont aussi attribués au type II de thermotolérance que l'on rapproche des HSPs. Ceci apparaît en fait comme une conséquence de la colocalisation de protéines synthétisées *de novo*, c'est-à-dire de HSPs, mais non comme une cause [7]. Ceci explique l'observation de changements du cytosquelette similaires quand les cellules sont exposées à d'autres formes de stress qui sont cependant aussi capables d'induire les HSPs, par exemple l'exposition aux analogues d'acides aminés, aux solvants organiques ou aux métaux lourds.

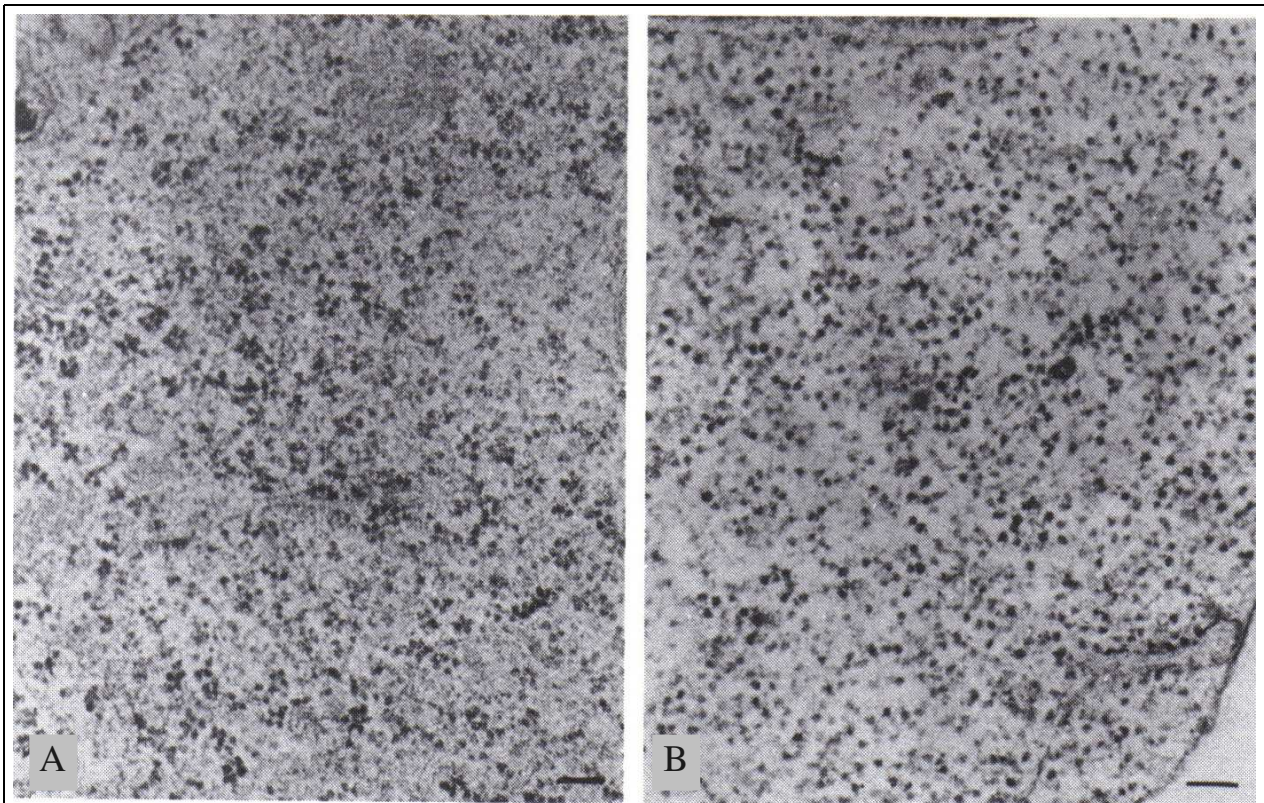


Figure 3: Influence de l'hyperthermie sur les ribosomes cytoplasmiques de fibroblastes V79 de hamster chinois (selon la référence [2], comme pour la figure 2, barre = 0,1 μm)

A: Fibroblaste témoin non traité, les ribosomes sont organisés en polysomes.

B: Après un traitement hyperthermique de 1h à 43°C, les ribosomes de ces mêmes fibroblastes apparaissent dissociés.

Par ailleurs, des perturbations singulières induites par la chaleur affectent également les polysomes ou polyribosomes. Un polysome se définit comme une chaîne de ribosomes assurant la transcription du même ARN messager (ARNm) en protéines. À 42°C, deux classes de polysomes se distinguent: une classe inactive comprenant des ARNm préalablement transcrits, et, par opposition, une classe très active au sein de laquelle quantité d'ARNm ont été induits par le stress et sont activement transcrits [9]. À 43°C, tous les polysomes sont finalement inactivés et ceci est maintenu même après un retour à des conditions physiologiques (Figure 3). La machinerie de transcription repose sur de nombreux facteurs et cofacteurs et implique notamment une orchestration spatiotemporelle très stricte et sensible à la déstabilisation physicochimique. L'implication d'autres éléments structuraux de connexion entre le cytosquelette et la membrane nucléaire semblent aussi d'une grande importance dans le choc thermique [4]. Un traitement à 43°C déclenche des dilatations irrégulières

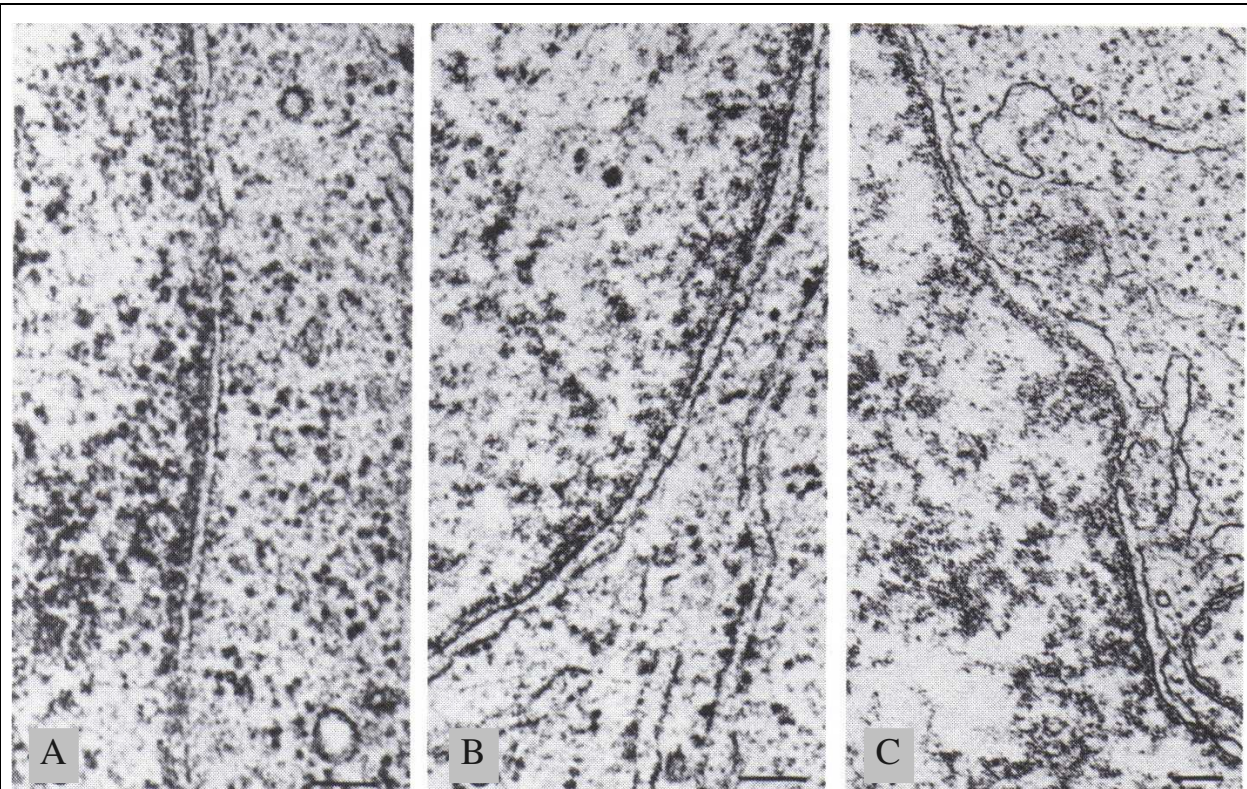


Figure 4: Effet de l'hyperthermie au niveau de l'enveloppe nucléaire de fibroblastes de hamster chinois, selon la référence [2] (cf Figures 2 et 3), barre = 0,1 μm .

A: Structure de l'enveloppe nucléaire d'un fibroblaste non traité. **B:** apparition après traitement par hyperthermie, 6 h à 42°C, de dilatations irrégulières de l'enveloppe nucléaire. **C:** Après un traitement hyperthermique de 1 h à 45°C, l'enveloppe nucléaire apparaît très dilatée et la membrane nucléaire externe présente de nombreux replis.

de l'enveloppe nucléaire avec perturbation des membranes la constituant, qui ne sont plus distinctement délimitées (à 45°C d'importantes dilatations de l'enveloppe nucléaire avec plusieurs repliements de la membrane externe peuvent être observées, Figure 4) [2]. Concernant le noyau, la chaleur induit son pléomorphisme (Figure 2, p5), avec accroissement de sa taille et altérations de ses fonctions [4]. Il faut noter qu'un accroissement de la densité de la matrice nucléaire est observé en réponse directe à un stress thermique (après 3h à 42°C par exemple [9]), et se remémorer la contiguïté du cytosquelette et de la matrice nucléaire. Cette densification peut être potentiellement expliquée par la redistribution de protéines intracellulaires, en faveur d'une relocalisation nucléaire, aux dépens des autres compartiments ou organelles cellulaires [9]. L'agrégation des protéines dans le noyau, impliquant déstabilisation et interactions hydrophobes contribue à la densification de la matrice nucléaire. Ceci est aussi lié à la formation de petits éléments granulaires au sein de la périchromatine [9]. Ces deux aspects ont pour perspective la perte des fonctions nucléaires. Aussi, les perturbations transitoires de l'équilibre dynamique entre agrégation et désagrégation des éléments fibrillaires de la matrice nucléaire apparaissent très sensibles au stress thermique, mais, là encore, les conséquences sur la survie cellulaire ne sont pas exactement comprises [4]. Cependant, pour des stresses de large ampleur, les dommages occasionnés à la matrice nucléaire apparaissent directement préjudiciables à la survie cellulaire. Ceci se manifeste à partir de 48°C qui est la température d'une importante transition calorimétrique pour le cytosquelette étudié à l'état isolé, et correspond au seuil de thermolabilité [18]. Occasionnellement, des structures réversibles formées de fibres d'actine, d'apparence rappelant celle d'un bâton (« rods-like actin structures ») ou sous forme

de para-cristaux nucléaires d'actine, peuvent être induits par la chaleur [3,12,9]. En présence de 10 % de diméthylsulfoxyde (DMSO), un solvant organique d'intérêt pharmaceutique, des para-cristaux nucléaires d'actine comparables sont aussi décrits. On sait alors qu'ils se forment aux dépens de l'actine cytoplasmique, notamment des fibres de stress [19-24]. En remarquable concordance avec ce que l'on peut observer au niveau du cytosquelette, une capacité accrue de réorganisation morphostructurale de la matrice nucléaire apparaît dans les cellules thermotolérantes [9]. Ceci n'est non plus corrélé à la mort, ou survie, cellulaire. Un aspect important à considérer au sujet de la matrice nucléaire est son rôle important dans la régulation de l'activité de la chromatine [25]. Les phénotypes cellulaires suggérant l'arrêt de croissance reflètent aussi une répression de la chromatine. Pour des températures de 42 à 45°C, les polymérisations de l'ADN ou de l'ARN sont très soudainement inhibées [3,4,9,25-27]. De plus, après un choc thermique, l'inhibition de la polymérisation de l'ADN est prolongée pendant un laps de temps proportionnel à l'ampleur du choc. Actuellement, les perturbations dynamiques de l'homéostasie nucléo-cytoplasmique de l'actine précédemment évoquées ont pu être comprises comme étant le mécanisme de signalisation du stress au niveau de la chromatine [25,28]. Bien que d'importance cruciale pour le maintien du développement cellulaire, l'inhibition de la polymérisation de l'ADN n'apparaît que peu liée à la létalité, moins que l'endommagement du cytosquelette ne peut l'être [4]. Parmi les agrégats protéiques nucléaires se trouvent des protéines HSPs et/ou chaperonnes, de localisation nucléaire, à l'état basal ou après relocalisation, et des protéines nouvellement synthétisées [25]. Ceci contribuant encore à la densification du noyau cellulaire. Les HSPs constitutives et préexistantes comme HSPB1 (HSP27), de localisation basale cytoplasmique, ainsi que HSPH (HSP110), localisée à l'état basal dans l'appareil de Golgi, sont redistribuées pendant le choc thermique et viennent se colocaliser au niveau de la matrice nucléaire, même en l'absence de synthèse protéique *de novo* (par inhibition chimique). Sans encore détailler la classification générale des HSPs, il doit être introduit une catégorie spécifique de HSPs, en étroite relation avec la matrice nucléaire, appelées en anglais « prompt HSPs ». Elles sont ainsi nommées pour bien marquer que, comme toute HSP, par définition, leur concentration augmente en réponse au choc thermique, mais que cette augmentation a lieu durant le choc, par opposition aux autres HSPs pour lesquelles elle prend effet plus tardivement, soit pour des chocs thermiques prolongés ou fréquemment après le choc thermique [29]. Les fonctions biologiques des « prompt HSPs » ne sont pas encore bien connues. Néanmoins, on sait que ces polypeptides, comme la lamine B, par exemple, s'associent avec les filaments intermédiaires nucléaires, après la translation de leur ARNm préexistant qui est maintenue durant l'exposition à la chaleur [30]. Notons que les autres HSPs inductibles par la chaleur ne proviennent pas d'ARNm capable d'être transcrits lors du choc thermique, de par la nécessité notablement quelques étapes synthétiques, complexes et sensibles à la chaleur, qui repoussent la synthèse à après le choc ou, possiblement, plus tard durant une exposition longue à un stress thermique de faible ampleur. Cette dernière modalité concerne par exemple HSPA2 (HSP 72), qui est encodée par un gène HSP purement thermo-inductible, qui, une fois induite des suites d'un choc thermique, se retrouvera en large proportion associée à la matrice nucléaire [3,9,31-35]. La relation entre changements nucléaires et développement d'une thermotolérance de type II semble reposer étroitement sur les HSPs. Au sein du noyau, c'est le nucléole qui est le plus sensible à la chaleur, même pour des élévations de températures limitées (Figure 2, p5) [4]. Le gonflement et l'aspect effiloché du nucléole induit par la chaleur sont le reflet d'importantes perturbations [9]. Les HSPs s'associant au noyau sont d'ailleurs retrouvées plus particulièrement concentrées au niveau du nucléole [9,35]. Ce qui sous-tend l'organisation du nucléole est pratiquement inconnu. Le rôle du nucléole est par contre très bien connu, il est impliqué dans la production des complexes RNA-protéines, c'est-à-dire les ribosomes dans la plus grande majorité. A l'état physiologique, l'ARN est intensément polymérisé au niveau du nucléole pour répondre au besoin élevé de transcription des

ADN codant pour les ARNs ribosomiques (ADNr, ce qui implique l'ARN-polymérase) qui sont destinés à être assemblés avec de petites protéines (smp: « small proteins ») importées du cytoplasme pour constituer les sous-unités ribosomiques, à leur tour exportées vers le cytoplasme. Ainsi la perturbation du nucléole durant le stress thermique corrobore-t-elle la sensibilité de la polymérisation d'ARN dépendante de l'ADN [3,26]. D'autre part, le réticulum endoplasmique, directement en continuité avec l'enveloppe nucléaire, ainsi que l'appareil de Golgi sont relativement thermosensibles [3,4,9]. Après 3 h à 42°C, l'appareil de Golgi peut pratiquement disparaître, probablement disloqué en de petites vésicules que l'on observe apparemment en retour [9]. Il y a ici un lien à suggérer avec la translocation nucléaire (au niveau du nucléole, notamment) de HSPH (HSP110), dont la localisation basale se situe dans l'appareil de Golgi. Une fonction importante de l'appareil de Golgi, la glycosylation des protéines, est certes inhibée par la chaleur, mais semble rapidement restaurée après le stress thermique [4,9]. Quant aux mitochondries, elles présentent des crêtes dilatées et vésiculaires après 1 h à 42°C [3,9]. Après 3h à 42°C [9] ou 1h à 43°C (Figure 2, p5, et Figure 5, p11) [2], les mitochondries sont gonflées, présentent clairement un espace matriciel élargi (comme il peut être observé après découplage oxydatif [36] ou inhibition du transport des électrons interférant avec la respiration et donc la complète glycolyse [9]). Les mitochondries se localisent au niveau de l'espace périnucléaire (Figure 2 p5), apparemment en conséquence de l'altération des filaments intermédiaires [9]. Après 1h à 45°C, les mitochondries apparaissent complètement agrégées au niveau de l'espace périnucléaire; leurs crêtes sont irrégulières et la densité de leur matrice diminue [3]. Étant donné leurs rôles pivots dans la mort cellulaire, les mitochondries doivent être envisagées comme modulateurs des effets toxicogéniques de la chaleur. La chaleur induit aussi une augmentation du nombre de lysosomes mais entraîne leur déstabilisation [4]. Ceci suggère qu'il s'agisse là d'un mécanisme plausible d'entraînement des cellules stressées par la chaleur vers la mort cellulaire avec autolyse [37]. Finalement, concernant la membrane plasmique, après 1h à 42°C, de petites interruptions réversibles de la bicouche lipidique apparaissent, avec altération transitoire de sa fonction de barrière (Figure 6, p12), notamment vis-à-vis des petites molécules [3]. Ces interruptions augmentent proportionnellement avec la durée et la température du choc thermique pour devenir clairement évidentes après 3 h à 43°C, toujours réversibles mais de taille suffisante pour permettre la perméabilité à des nanoparticules [3]. À 45°C, on observe la perte de larges segments de membrane cytoplasmique, alors létale pour la cellule [3]. Il est important de noter que la membrane plasmique, en considérant l'ensemble de l'entité biochimique qu'elle constitue, est considérée actuellement comme le site cellulaire le plus important pour le développement des effets toxicogéniques et cytotoxiques de la chaleur [38]. Les études par microscopie électronique à balayage révèlent que la chaleur peut induire la perte des particules protéiques intermembranaires, qui sont constituées par les protéines transmembranaires et qui stabilisent notoirement la membrane et assurent des réactions enzymatiques indispensables pour l'homéostasie cellulaire [4]. La modulation par la membrane des effets cytotoxiques de la chaleur est d'autant plus évidente que l'on observe un synergisme accroissant la létalité cellulaire d'un choc thermique lorsqu'il est associé au traitement par des agents contribuant à la déstabilisation des membranes cytoplasmiques, essentiellement, et potentiellement des membranes intracellulaires. Ces agents sont: i) les drogues actives au niveau membranaire telles que les anesthésiques (lidocaïne, procaïne), la phénotiazine (très spécifique du plasmalemme) ou enfin les solvants organiques, en particulier l'éthanol (ces drogues sont ainsi souvent regroupées sous le dénomination les thermosensibilisateurs ou « thermosensitizers ») ou, ii) différents liposomes (unilamellaires ou multilamellaires, cf paragraphe 4) [3,4]. Ceci revêt une importance cruciale concernant les formulations pharmaceutiques qui seront discutées ci-après, tout au long de cette revue.

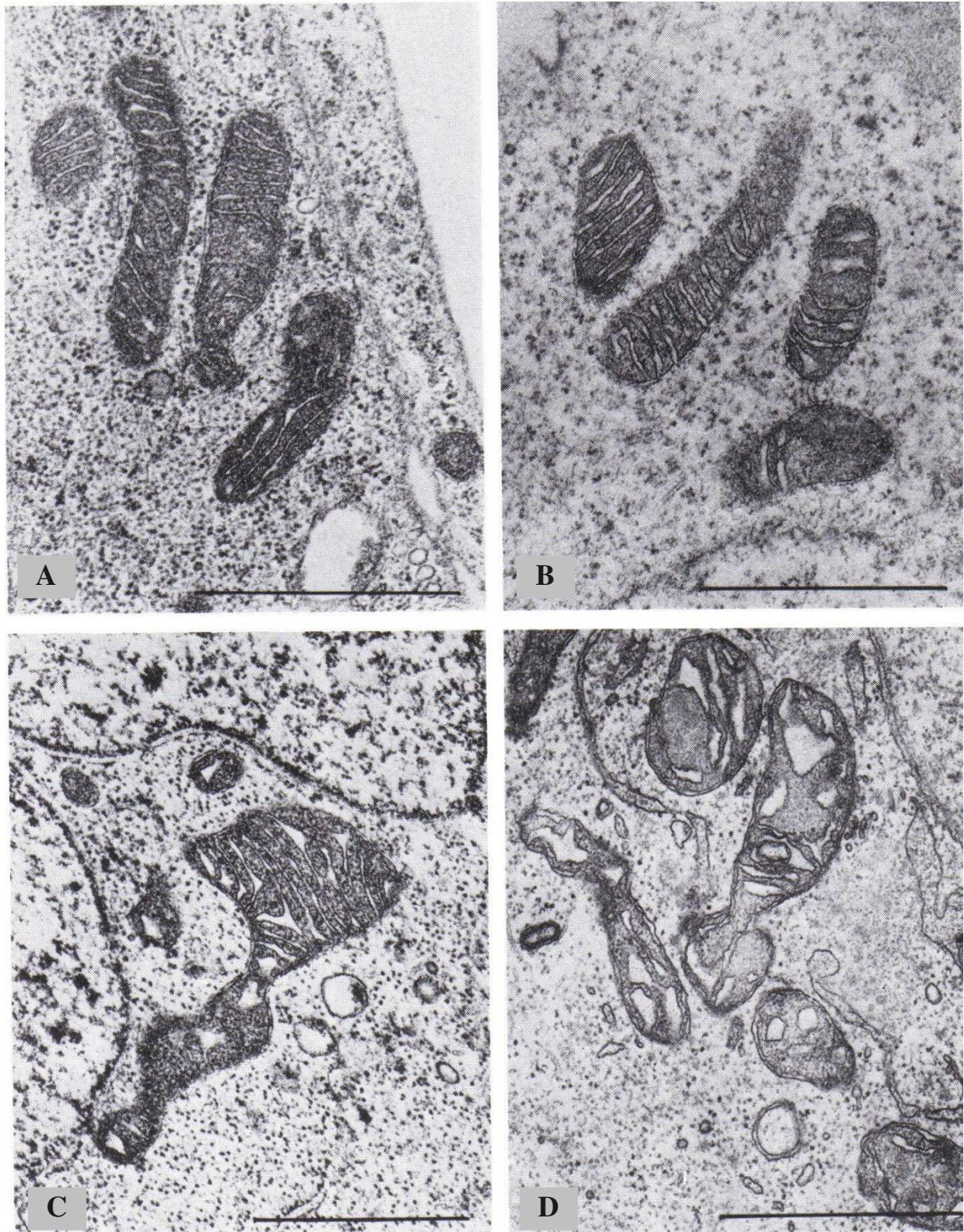


Figure 5: Influence de l'hyperthermie sur les mitochondries de fibroblastes V79 de hamster chinois, selon la référence [2] comme pour les figures 2 à 4; barre = 1 μm .

A: Mitochondrie de fibroblastes non traités montrant une matrice bien préservée et des crêtes parallèles. **B:** Après hyperthermie: 1h à 42°C, les crêtes des mitochondries sont dilatées, la matrice étant encore dense. **C:** Après hyperthermie: 1h à 43°C, les mitochondries ont un contour irrégulier et une structure modifiée. **D:** Après hyperthermie: 1h à 45°C, l'altération des mitochondries est évidente.

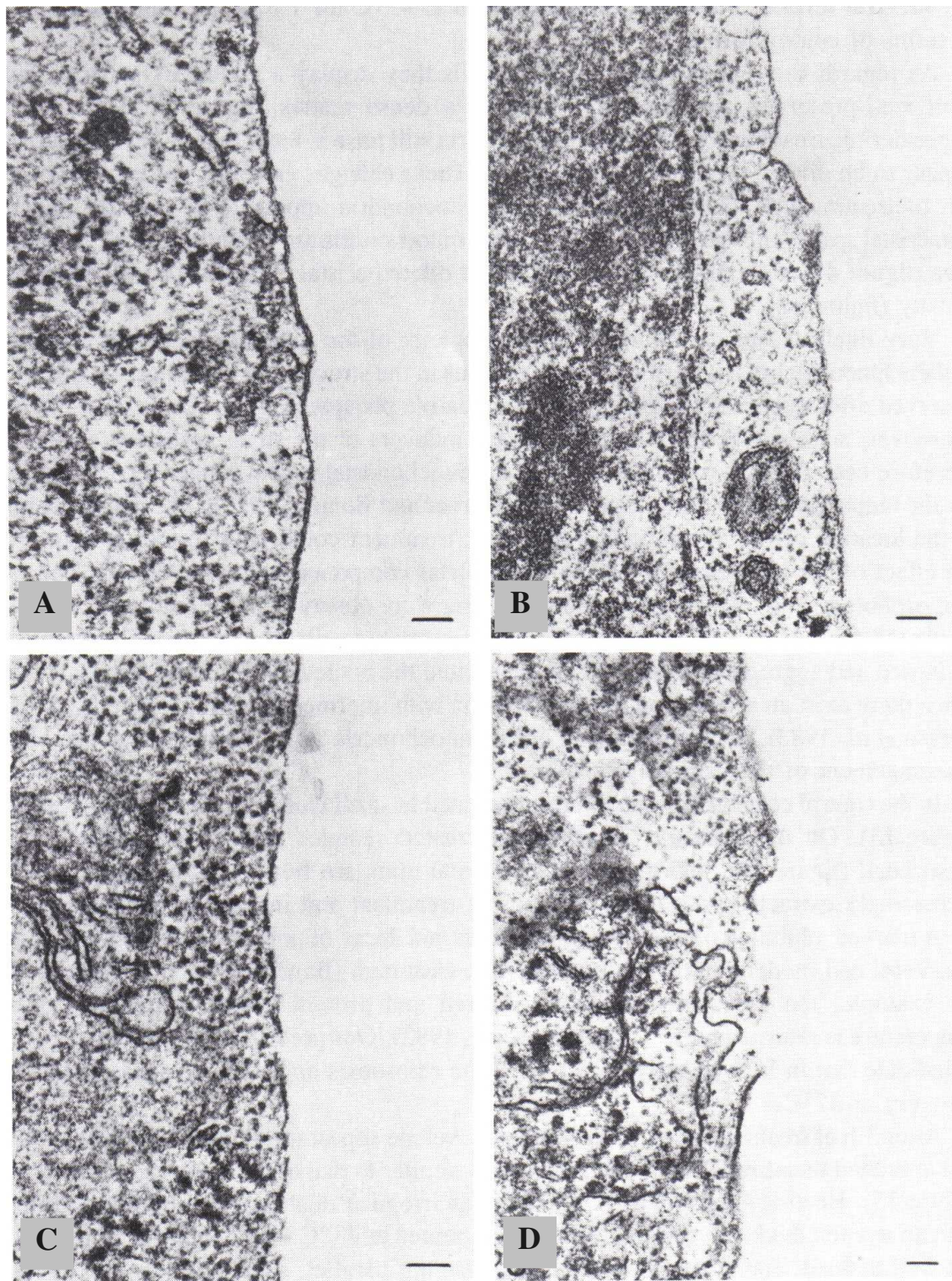


Figure 6: Altérations du plasmalemme de fibroblastes V79 de hamster chinois induite par l'hyperthermie (d'après la référence 2, en lien avec les figures 2 à 5), barre = 0,1 μm .

A: Détails de la membrane cytoplasmique d'un fibroblaste non traité. **B:** Après traitement hyperthermique de 1 h à 42°C, de petites discontinuités dans la structure du plasmalemme apparaissent. **C:** Après un traitement hyperthermique par 43°C pendant 3 h, on observe de nombreuses interruptions de la membrane plasmique. **D:** Après 1 h à 45°C, la membrane cytoplasmique apparaît déchirée.

Les effets métaboliques de la chaleur

Le catabolisme du glucose est central pour tout le métabolisme cellulaire. Il est étroitement lié au métabolisme des lipides et de nombre d'acides aminés. Aussi longtemps qu'il n'y a pas inhibition ou dénaturation des enzymes, les réservoirs cellulaires d'énergie, premièrement l'ATP, sont utilisés et diminuent pour satisfaire aux besoins de réactions métaboliques alors thermodynamiquement favorisées et afin de limiter les perturbations morphostructurales et de maintenir les gradients ioniques [4]. Une augmentation de l'efflux de K^+ , pendant l'exposition à la chaleur, et une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire, plus tardive, après l'exposition à la chaleur, témoignent d'une altération membranaire mais ne sont pas prédictifs de la mort cellulaire. Les cellules chauffées présentent un taux d'ATP bas, mais une synthèse et un taux de renouvellement élevé [4]. Après une forte exposition à la chaleur, le taux d'ATP intracellulaire pourrait en fait dépendre de l'inhibition de la Na^+/K^+ ATPase au cours de la réponse au choc thermique [39]. Ceci ne semble pas encore un événement primordial dans l'entraînement vers la mort cellulaire. La déplétion des stocks d'ATP affectera logiquement les enzymes ATPases, telles que les transporteurs membranaires, en conjonction avec la déstabilisation de la membrane. Pendant l'exposition à des températures élevées, la respiration cellulaire est compromise car la consommation d'oxygène est très réduite. Ceci doit être discuté en fonction du contexte mais peut être admis généralement pour les cellules néoplasiques [3]. La phosphorylation oxydative (située au niveau de la membrane interne mitochondriale) est directement dépendante de l'oxygène en étant précisément le seul site cellulaire où l'oxygène moléculaire est consommé. D'autres voies métaboliques dépendent du statut global en oxygène sous des formes variées et interchangeableables mais non directement de l'oxygène moléculaire: O_2 [4]. Ainsi, l'inhibition de la consommation d'oxygène peut être considérée *a priori* comme le reflet de l'état de la phosphorylation oxydative. Les capacités de production d'ATP dépendent principalement de la phosphorylation oxydative, ainsi que la régénération des stocks de NAD^+ , qui est, en général et particulièrement chez l'homme, limité [40], ou de FAD par l'oxydation du $NADH+H^+$ ou $FADH_2$, respectivement. Le cycle du citrate, dans le cytosol mitochondrial, apparaît aussi inhibé par la chaleur [4,41]. Ceci affecte sa capacité à prendre en charge les acides gras ou l'acétyl CoA, à laquelle participe NAD^+ et FAD, et donc la génération de GTP, $NADH+H^+$ et $FADH_2$ associée. La glycolyse *stricto sensu*, c'est-à-dire le premier temps du catabolisme de glucose (commun aux voies aérobie ou anaérobie du métabolisme du glucose), s'achève par la génération de deux pyruvates. Cela nécessite 2 NAD^+ et génère 2 $NADH+H^+$ et 2 ATP parmi les 30 que l'oxydation complète du glucose en condition euoxique génère par molécule de glucose [42]. La glycolyse est évidemment indissociable du statut en oxygène, mais il faut aussi faire attention au fait qu'elle soit très dépendante des milieux extra- et intracellulaire [43,44], du statut en nutriment et du pH. Tous influencent la régulation biochimique de la glycolyse, principalement au travers du lactate. Couplée avec la phosphorylation oxydative, la capacité du cycle du citrate de poursuivre la métabolisation du pyruvate et donc de régénérer le $NADH$ et $FADH_2$ sera affectée [3,4,43,44]. En conditions physiologiques, i.e. avec régénération constante de NAD^+ , ce qui signifie euoxie et respiration normale, le complexe de déshydrogénation du pyruvate dépendant du NAD^+ , situé au niveau de la matrice mitochondriale, assure la décarboxylation du pyruvate en acétyl CoA qui entre dans le cycle du citrate [42]. Aussi, quand la régénération oxydative du NAD^+ n'est pas possible, comme lors de l'anaérobiose ou durant l'exposition à la chaleur, le NAD^+ nécessaire à la glycolyse est alternativement régénéré par la transformation du pyruvate en lactate. Dans le cadre physiologique de l'anaérobiose, le lactate accumulé est normalement exporté dans le compartiment

extracellulaire par un transporteur spécifique pour être drainé par la circulation vers le foie [40]. D'un côté, l'acidification du milieu due à l'efflux de lactate peut, sous condition de drainage insuffisant, inhiber la glycolyse [3]. D'un autre côté, l'augmentation du lactate intracellulaire, plus exactement l'augmentation du ratio lactate/pyruvate, ainsi que celle du β -hydroxybutyrate, entraîne une diminution du pH intracellulaire (pH_i), qui est lui aussi capable d'engendrer une inhibition de la glycolyse [4]. Naturellement, se pose aussi la question de l'intégrité fonctionnelle des enzymes glycolytiques. Elles ne semblent pas affectées jusqu'à des températures aussi élevées que 44°C pour de très nombreux systèmes biologiques [3]. D'apparence contradictoires, nombre de publications rapportant une inhibition de la glycolyse trouvent finalement explication au regard de la diminution de pH due à l'acidification du milieu (en particulier *in vitro*, quand les conditions de culture ne sont pas adaptées), ou par l'acidification intracellulaire qui peut toujours être directement ou indirectement générée, indirectement sous-entendant en conséquence d'une brusque diminution de pH extracellulaire (pH_e). Après exposition à la chaleur de cellules normales, le ratio lactate/pyruvate et le taux de β -hydroxybutyrate, ne sont pas notablement modifiés. Dans le cas de cellules tumorales ou de tumeurs, qui dépendent quasi-exclusivement de la glycolyse (anaérobie), il y a diminution notable du ratio lactate/pyruvate ainsi que, dans une moindre mesure, du taux de β -hydroxybutyrate pour les cellules tumorales *in vitro*, qui, paradoxalement, augmentent de façon très significative lorsque ces mêmes cellules sont au sein de tumeurs, *in vivo* [3,4,45-50]. Ceci soulève ici l'importance des caractéristiques physiopathologiques, sur lesquelles nous nous étendrons plus longuement quand l'effet de l'hyperthermie sera envisagé pour les tumeurs solides. Parallèlement, le statut en nutriments est aussi considérablement influant. De ces premières remarques, pour des températures jusqu'à 45°C , il apparaît possible de conclure que la glycolyse n'est pas inhibée durant l'exposition à la chaleur si tant est que le glucose soit disponible [4]. Finalement, certaines manipulations biochimiques, par exemple celles capables d'engendrer une inhibition de la glycolyse, de la phosphorylation oxydative ou une acidification, ont été imaginées comme des moyens de sensibiliser les cellules à l'action de la chaleur [51-54]. Après exposition à la chaleur, comme après exposition à l'éthanol, on note aussi une diminution des thiols intracellulaires, notamment le glutathion. Ceci a des répercussions aux niveaux de la réponse cellulaire au choc thermique, de l'acidification intracellulaire, de la toxicité des espèces radicalaires de l'oxygène (« reactive oxygen species », ROS) et de la thermotolérance [4,55,56]. L'hyperthermie peut en effet induire un accroissement de la concentration à l'équilibre (« steady-state concentration ») des ROS qui sont générées par les oxydases: $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 et du très réactif radical hydroxyle: $\cdot\text{OH}$ [3]. Ceci accroît les phénomènes d'oxydation cellulaire au niveau des protéines, de l'ADN et des lipides membranaires. Cela représente un autre mécanisme d'intérêt concernant l'endommagement cellulaire par le stress thermique [57] que l'on peut rapprocher de la photochimiothérapie. La cytotoxicité de la chaleur directement dépendante des ROS et même son effet antitumoral, pour partie, peuvent être spécifiquement inhibés par l'addition de superoxyde dismutases (SOD), de catalases ou du DMSO, solvant connu comme piègeur de radicaux (ROS scavenger) [58]. Ainsi, une augmentation de l'activité de SOD1, ou Cu,Zn-SOD, a été reliée au développement de thermotolérance après chauffage [59]. Réciproquement, la diminution de l'activité anti-oxydante est indissociable d'une sensibilisation à la chaleur [60]. Parmi les oxydases impliquées dans la dégradation des purines, il a aussi été démontré un rôle central dans la production de ROS induite par la chaleur pour la xanthine oxydase, XO, qui a O_2 pour substrat et qui est associée à la génération d'anions superoxydes [61-63]. La xanthine déshydrogénase, XDH, est une isoforme très proche de XO mais elle catabolise l'hypoxanthine en xanthine, avec NAD^+ pour co-substrat, sans générer d'anions superoxydes [64]. Les quantités de XDH sont notablement augmentées dans les tumeurs à l'état basal. Les modulations par la chaleur de l'induction des activités XDH et XO semblent reposer en fin de compte sur l'élévation des taux de Ca^{2+} cytosolique, probablement des suites de la limitation de la

respiration et de la production d'ATP [3]. L'augmentation du Ca^{2+} cytosolique est aussi bien capable d'activer les protéases et leur capacité de convertir la XDH en XO [65]. Une raison supplémentaire de l'induction de l'activité XO peut être liée au phénomène dit d'ischémie/reperfusion. Au moins pour le foie, la libération de fer par la ferritine apparaît aussi participer de la toxicité de la chaleur [66]. Un rôle notable des amino-oxidases a aussi été souligné [3]. Des effets pléthoriques de la chaleur, il est aussi connu une diminution de l'incorporation de nucléotides et acides aminés marqués durant l'exposition à la chaleur et pour une période plus ou moins longue après cette exposition. Ceci touche plus fortement la synthèse d'acides nucléiques et vérifie ainsi les hypothèses basées sur les constatations morphostructurelles au niveau biochimique [3,4]. Pour en terminer avec les importants effets métaboliques de la chaleur, un rôle proéminent de la synthèse d'ARN dans la genèse des dommages cellulaires induits par le stress thermique a été très brillamment décomposé lors d'investigations simultanées du traitement par la chaleur et par des inhibiteurs très spécifiques de la synthèse des acides nucléiques et des protéines de cellules HeLa [3,67]. Il en résulte qu'alors que les inhibiteurs de la synthèse d'ADN et de protéines diminuent la sensibilité à la chaleur, les inhibiteurs de la synthèse d'ARN accroissent cette sensibilité. En exergue, nous remarquerons que les effets de la chaleur sur la matrice extracellulaire bien qu'elle soit très importante pour la croissance cellulaire (en supportant les cellules et en liant les facteurs de croissance, agissant comme réservoir) n'a pas été spécifiquement étudiée à notre connaissance.

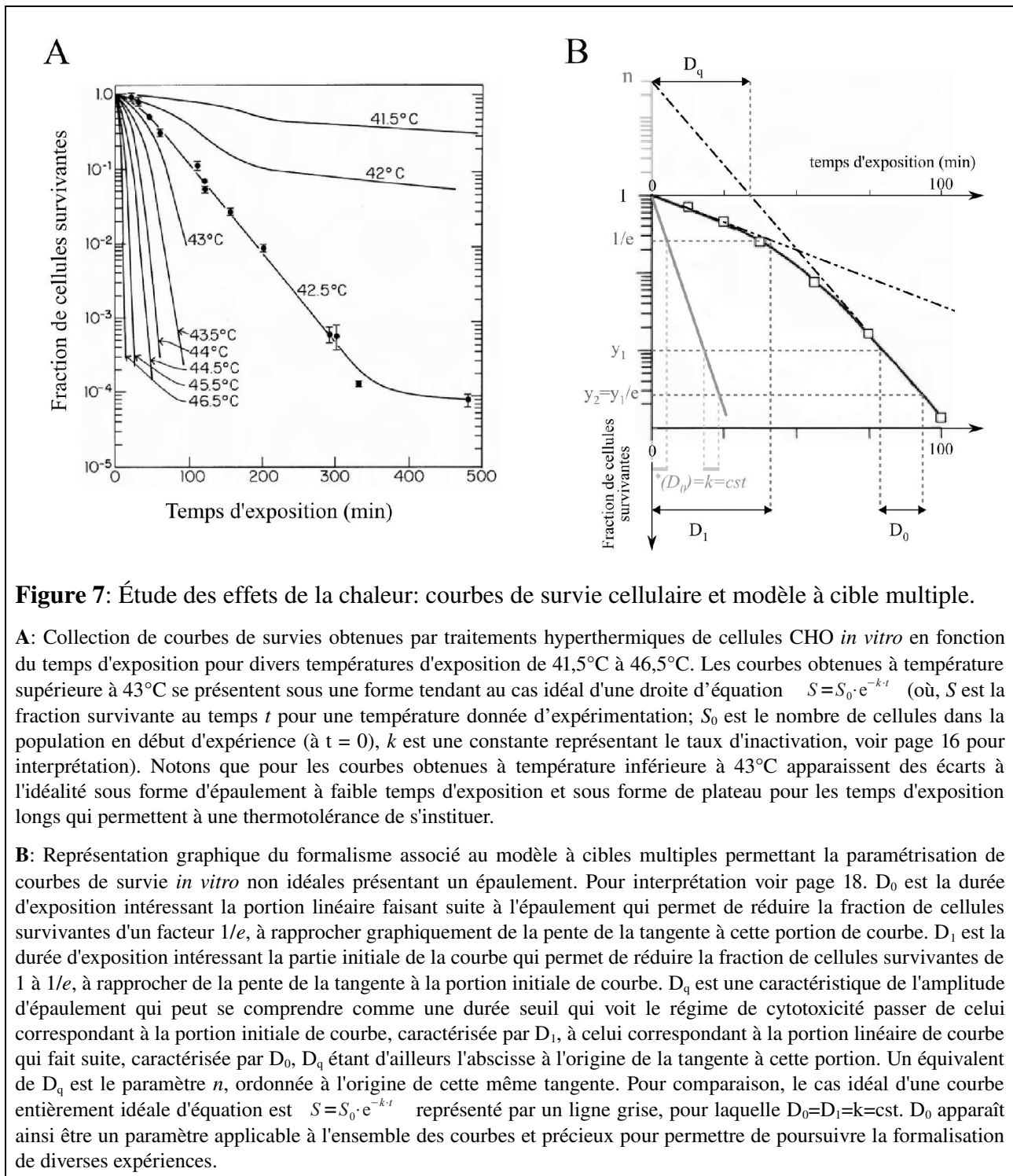
Cytotoxicité de la chaleur et dosimétrie thermique

Comme nous l'avons déjà évoqué et très largement, l'essentiel de nos connaissances les plus approfondies de la cytotoxicité de la chaleur a pour origine des études *in vitro* avec des cellules en culture dans des dispositifs de chauffage permettant un contrôle très précis de la température et de son homogénéité. Ces conditions ne se retranscrivent que difficilement dans la pratique clinique. Les études *in vitro* ont cet avantage de permettre la décomposition des effets de la chaleur pour en comprendre les mécanismes fondamentaux conduisant à la mort cellulaire mais correspondent à des conditions idéales et ne permettent pas d'évaluer les effets indirects de la chaleur qui peuvent contribuer à l'efficacité d'un traitement par hyperthermie. C'est pourquoi tout au long de leur discussion, nous nous rappellerons que dans un contexte organique, physiologique ou pathologique, et surtout clinique: i) les paramètres du choc thermique ne peuvent pas être aussi bien contrôlés, et que, ii) quand on étudie les effets toxicogéniques de la chaleur au niveau d'un tissu, d'un organe ou de l'organisme entier, des effets biologiques indirects sont à considérer en parallèle de la cytotoxicité directe de la chaleur. Sans trop anticiper sur les considérations *in vivo*, le lecteur doit être averti que les effets biologiques indirects d'un traitement par la chaleur peuvent se révéler *in fine* dominants concernant la toxicité, globale mais aussi directe, comme lorsque des rétro-régulations physiologiques ou des réponses immunitaires entrent en jeu. La cytotoxicité cellulaire directe de la chaleur, que l'on peut aussi considérer comme intrinsèque, peut être observée dans l'intervalle de températures 42°-47°C. Différents types cellulaires présenteront une sensibilité pouvant varier d'un facteur 10 [38]. Notons soigneusement un fait très important et souvent négligé: en culture, rien ne permet de distinguer la sensibilité des cellules tumorales de celle des cellules normales de même origine [6]. Le taux de mort cellulaire induit par une exposition à la chaleur simple, c'est-à-dire unique, dépend simultanément des paramètres température et durée, auxquels se réfère l'expression très usitée à des fins analytiques, mais souvent peu explicite, de « dose thermique ». Tout effet biologique mesurable peut être relié aux variations d'une condition, tous les autres paramètres de conditions étant maintenus constants, au travers de courbes dose-effet, bien connues dans le domaine de la pharmacologie. C'est exactement le propos des études *in vitro* en thermobiologie.

Elles recourent aux courbes de survie cellulaire, sur le modèle des études *in vitro* de radiobiologie, et même bien souvent en combinaison avec elles [68]. Elles consistent en un graphique, commodément semi-logarithmique, de la fraction survivante d'une population cellulaire traitée par la chaleur, ayant fixé un premier paramètre, la durée ou, le plus souvent, la température en fonction du second (*nota bene*, ces deux paramètres sont interchangeable) [4,69]. La définition du critère terminal de survie doit être considérée avec grande précaution pour bien en saisir la signification biologique. Pour les cellules en prolifération, telles que les cellules malignes, le test de clonogénicité permet de déterminer la perte d'une capacité active de prolifération en culture, que ce soit *in vitro* ou *ex vivo*. Ce test est d'un grand intérêt en termes thérapeutiques, puisque pour qu'une tumeur soit bien contrôlée et même éradiquée, il est souvent suffisant de rendre ses cellules incapables de se diviser pour prévenir sa croissance et sa capacité de dissémination [4,68]. L'efficacité de suppression, soit le taux d'inactivation de la clonogénicité en fonction de l'accroissement du paramètre du traitement considéré (température ou durée ici), peut alors être discutée en termes d'effets cytostatiques, voire antimitotiques, et cytotoxiques, les effets de mort cellulaire directs participant à la suppression de la clonogénicité. Le taux d'inactivation de la clonogénicité peut se comprendre comme étant une dérivée assimilable à une tangente à la courbe de survie ou la pente de cette courbe, si elle se réduit à une relation linéaire simple. Tester la survie au travers de la clonogénicité n'est pas adéquat pour les cellules non proliférantes, comme celles de tissus sains. D'autres paramètres sont alors à tester pour évaluer leur survie [68]. Quand les courbes de survie à températures constantes en fonction de la durée de chauffage sont obtenues pour des températures supérieures à 43°C, elles apparaissent bien linéaires en représentation semi-logarithmique et sur l'ensemble de l'axe du temps. La pente est d'autant plus importante que la température d'investigation est élevée. Une courbe de survie idéalement linéaire en représentation semi-logarithmique se modélise par une équation dite à une étape (« one-step » ou « one-hit »):

$$S = S_0 \cdot e^{-k \cdot t}, \quad (T = cst), \quad \text{Equation 1}$$

où S est la fraction survivante au temps t pour une température constante d'exposition; S_0 est le nombre de cellules dans la population en début d'expérience ($t = 0$), k est une constante représentant le taux d'inactivation quand la température expérimentale d'investigation T est appliquée; soit dans les termes précédents, la pente de la courbe de survie, idéalement linéaire. Sur la base d'expériences à température variées, quand, d'une expérience à l'autre, la température d'investigation T augmente, k double et la durée d'exposition nécessaire pour atteindre une fraction de survie déterminée est alors réduite de moitié. Pour certaines lignées cellulaires, les courbes de survie se prêtent très bien à cette modélisation pour des températures supérieures à 43°C, voir même déjà pour les températures supérieures à la température physiologique, mais ceci ne concerne que quelques lignées cellulaires (glioblastomes). En fait, les courbes expérimentales de survie en fonction du temps d'incubation (Figure 7A, p.17) dévient souvent du comportement idéalement exponentiel, avec des pentes inférieures à celles attendues, à deux niveaux: i) pour des températures d'expérimentation dans l'intervalle 42-43°C, un épaulement se forme en début de courbe [68], là aussi en dépendance avec la lignée cellulaire; ii) pour des temps d'incubation très longs. Sont alors impliquées les capacités adaptatives des cellules évoquées précédemment, qui permettraient le développement d'une résistance durant un stress thermique prolongé, c'est-à-dire une thermotolérance. Il est parfois distinctement stipulé lorsqu'il s'agit d'une thermotolérance aiguë par opposition à une thermotolérance chronique ou héritée, qui, pour des temps de d'exposition très long, supérieur au temps de génération, réfère à la transmission après une, voire plusieurs divisions de cette tolérance [4,6]. Pour mettre l'accent sur les variations dues aux lignées cellulaires, il est remarquable de noter que les cellules de glioblastomes semblent incapables de développer quelque thermotolérance que ce soit [70]. Des modèles radiobiologiques toujours plus sophistiqués, tel que le modèle à cibles

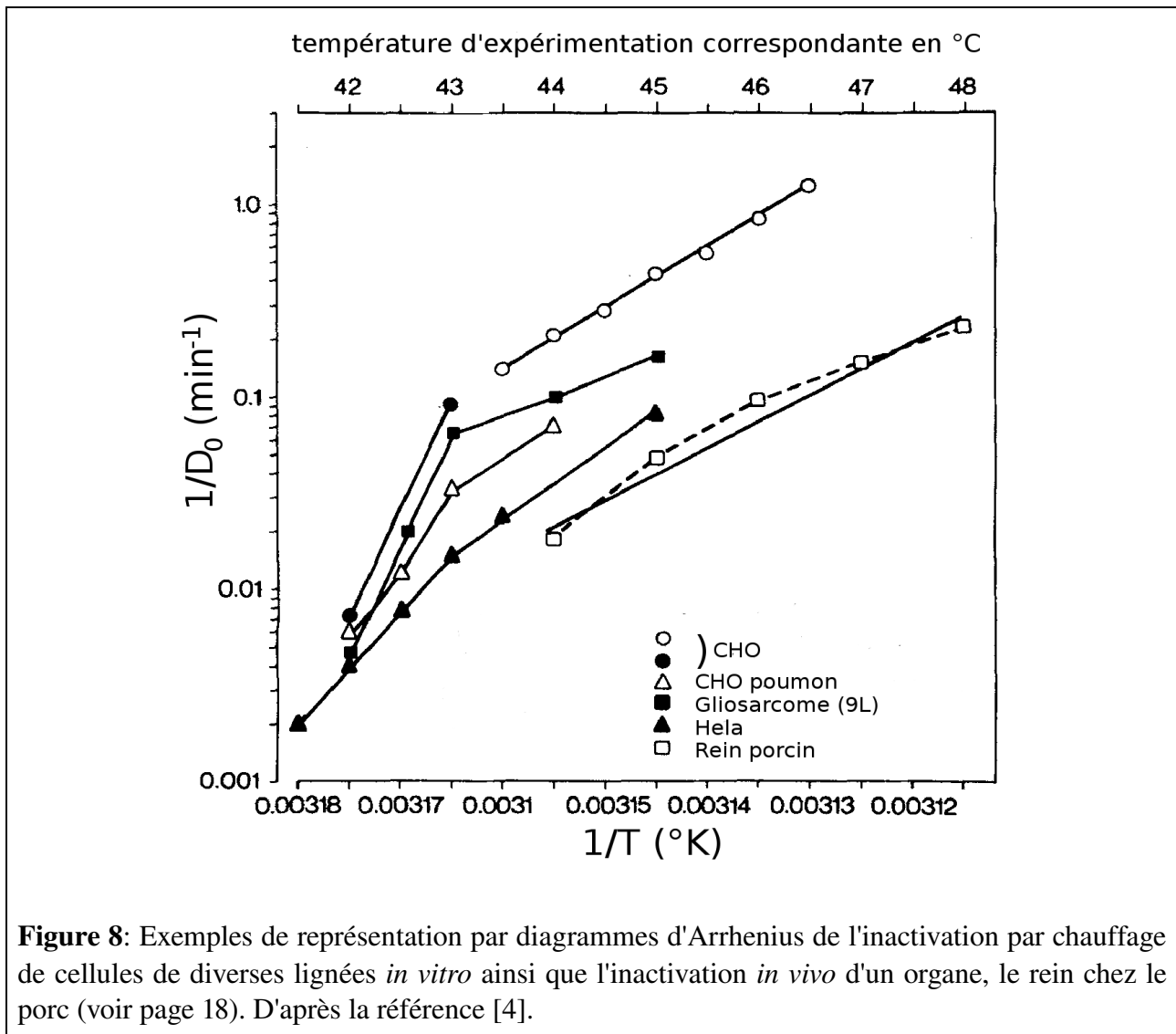


multiples (« multitarget model »), ou celui dit linéaire-quadratique (« linear quadratic model ») [68], se superposent toujours mieux aux données expérimentales, notamment au niveau des déviations au comportement exponentiel. Cependant, il ne faut pas perdre de vue la signification biologique en lien avec l'hyperthermie. Il doit être absolument compris à ce niveau que la toxicité thermique repose sur des mécanismes complètement différents de ceux impliqués dans la cytotoxicité induite par les radiations ionisantes [4], et donc d'intérêt thérapeutique complémentaire. Concernant le raffinement de la modélisation, notons qu'un récent modèle basé sur un processus qui impliquerait dans un premier temps des lésions non létales, par la suite converties en lésions létales semble être

plus approprié à l'hyperthermie [71-73]. Ces considérations mises à part, un paramètre classiquement associé au modèle à cibles multiples en radiobiologie, le paramètre dose (D) peut être adapté à l'hyperthermie. Mais attention, cette fois il s'agit d'un paramètre de durée d'exposition à une température donnée par l'expérimentation, que l'on s'accorde à définir comme le temps nécessaire à une température d'exposition pour observer le déclin de la fraction survivante d'un facteur $1/e$, soit 0.37 ou de 37%. Ceci est alors très précieux pour la simplification de diverses courbes de survie avec épaulement tout en restant toujours représentatif de l'importance du déclin exponentiel, en permettant leur comparaison et leur interprétation biologique. Les courbes de survie expérimentales à une épaulement peuvent alors être décrites par trois valeurs choisies de D : D_1 , D_0 , et D_q , remarquant que D est constant pour les courbes idéalement linéaires et équivalent à k (Figure 7B, p.17) [4,68]. D_1 est le temps nécessaire pour réduire la fraction de survie de 1 à 0.37. Il se définit aussi comme l'inverse de la pente de la courbe dans le domaine correspondant à la partie linéaire en représentation semi-logarithmique. Par opposition, D_0 est l'inverse de la pente finale de la courbe, en relation avec la partie exponentielle de courbe qui suit cet épaulement, déviant de la précédente en pratique, mais se définissant toujours comme la réduction de la fraction de survie d'un facteur $1/e$, dans le domaine correspondant. Pour ce faire, il faut s'intéresser au temps nécessaire pour que la fraction de survie passe de 0.1 à 0.037, ou 0.01 à 0.0037, et ainsi de suite jusqu'à atteindre ce domaine final. La dernière valeur caractéristique choisie: D_q , permet une représentation de l'ampleur de épaulement de la courbe et peut être vue comme un seuil (on utilise parfois un équivalent appelé n , voir Figure 7B, p.17). Il est très utile de s'appuyer sur D_0 pour compiler de façon formaliste différentes courbes de survie grâce à l'équation d'Arrhenius [74], qui, supposant l'équilibre thermodynamique, est un modèle d'(in)activation par la chaleur:

$$k = A \cdot e^{\frac{-E}{RT}}, \quad \text{Equation 2}$$

où k , la constante d'(in)activation, vaut $1/D_0$; A est une constante; E est l'énergie d'(in)activation, parfois plus simplement exprimée comme l'activation; R est la constante des gaz parfaits, et T est la température absolue appliquée (soit un paramètre constant durant un traitement par la chaleur donné qui est à l'origine de la courbe de survie dont on a extrait D_0) [4,69]. La représentation graphique, dite représentation d'Arrhenius, fait la synthèse d'un jeu d'expérimentations conduisant à des courbes de survie pour différentes températures d'intérêt dans un diagramme bidimensionnel et semi-logarithmique (Figure 8, p.19). Pratiquement, cette représentation graphique est construite en portant le logarithme de l'inverse des D_0 issus de chaque courbe de survie en ordonnée en fonction de la température d'expérience correspondante, portée en abscisse. De manière très caractéristique, cette représentation d'Arrhenius révèle presque toujours un point d'inflexion (« breakpoint temperature »), entre 42 et 43°C, souvent moyenné à 42.5°C, pour des considérations générales. Au-delà de ce point, l'efficacité de la cytotoxicité d'une exposition *in vitro* à la chaleur simple est bien plus élevée qu'en dessous [4,6,69,75]. D'après la théorie chimique des collisions (« rate theory ») [76], ceci se traduit par une différence d'énergie d'activation en dessus et en dessous de cette température, et reflète un changement des mécanismes moléculaires engendrant la mort cellulaire directe [4,6,38]. Au-delà de ce point d'inflexion, disons au-delà de 43°C, les énergies d'activations calculées, s'associant à une franche cytotoxicité, sont très reproductibles, même entre lignées cellulaires différentes, et toujours proches de l'enthalpie de dénaturation des protéines (140 kcal/mol) [77,78]. En dessous de ce point d'inflexion, disons en dessous de 42°C, les énergies d'activation calculées sont plus élevées et très variables. Ceci indique que les protéines, plus que toute autre macromolécule, sont des médiateurs centraux de la toxicité thermique, à savoir, que la conformation des acides nucléiques est stable même à température élevée. C'est seulement au-delà de 45°C, que suffisamment d'énergie peut être déposée dans la molécule d'ADN pour induire une cassure du brin. En fait, ces cassures ne sont mesurées qu'*a posteriori*, alors qu'une cytotoxicité



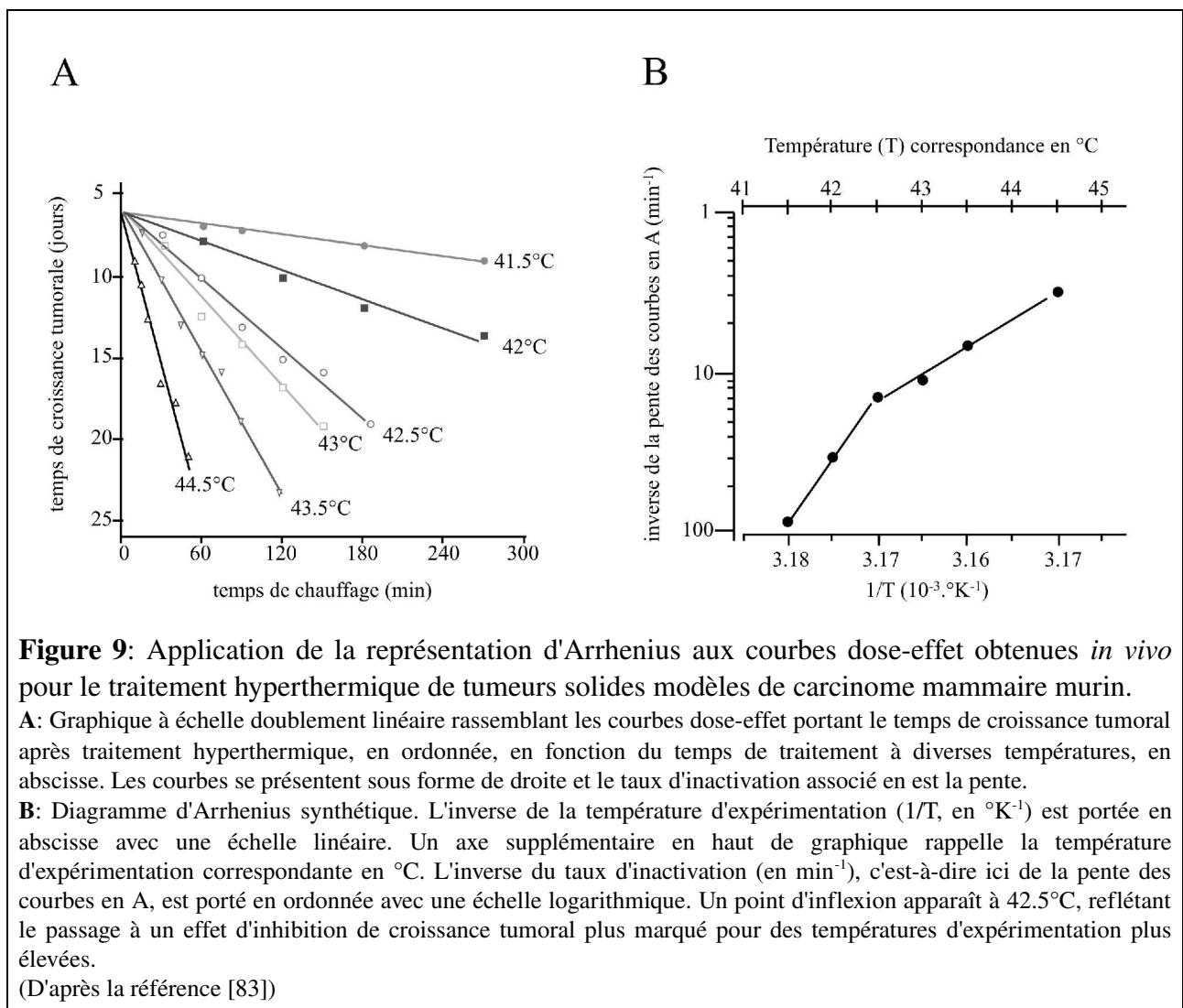
effective est déjà constatée, soit quand la fraction de survie n'est déjà plus que de 1 % [4,79]. Les énergies d'activation associées à l'endommagement de l'ADN sont en fait similaires à celles d'endommagement des protéines. Ceci suggère qu'il s'agisse plus d'un endommagement de la machinerie protéique associée à l'ADN que d'un endommagement de l'ADN lui-même. Plus généralement, à côté de la possibilité de tester la clonogénicité *ex vivo*, les diagrammes d'Arrhenius peuvent être obtenus à propos d'effets biologiques *in vivo*, une fois défini un paramètre terminal de mesure pertinent pour les effets considérés, tel que le délai de croissance des tumeurs solides après traitement [80-83], Figure 9 (p.20). Il apparaît alors que: i) le point d'inflexion *in vivo* pour le traitement de tumeurs par la chaleur est plus bas, se situant entre 41,5°-42,5°C, en comparaison avec la même lignée cellulaire cultivée *in vitro*, ii) une superposition des énergies d'activation déduites des expériences *in vitro* et *in vivo* au-delà du point d'inflexion, mais pas en dessous, iii) en deçà du point d'inflexion, une large variété d'énergies d'activation est obtenue *in vivo*, moins reproductibles mais toujours plus élevées que *in vitro*. Il faut donc considérer que l'effet toxique de la chaleur à fonction antitumorale a lieu *in vivo* à température notablement inférieure, en comparaison avec des conditions *in vitro*. Ceci renforce la précédente remarque concernant les modulations singulières des effets de la chaleur *in vivo* (voir ci-après). Pour caractériser la « puissance » du traitement par la chaleur, la simple multiplication des paramètres température et durée s'est révélée complètement inappropriée, et le concept de dose thermique iso-effet (TID, « thermal isoeffect dose ») a été

développé [84]. Ce dernier convertit les variables d'exposition à la chaleur en un équivalent minutes de chauffage à la température repère de 43°C (*EM43*) qui produit un effet biologique égal.

L'équation donnant un équivalent minutes de chauffage à la température repère de 43°C (*EM43*) est:

$$EM\ 43 = tC^{T-43}, \quad \text{Equation 3}$$

où t est le temps d'exposition à la température donnée T , et C est une constante, avec $C = 2$ au-delà de 43°C et $C = 4$ en-deçà. Ces deux valeurs de constante exponentielle distinguent les deux domaines de température pour lesquels l'inflexion d'énergie d'activation est observée expérimentalement [10,38,69]. Le *EM43* suffit pour prédire avec précision la survie cellulaire *in vitro* selon un schéma de traitement par la chaleur à exposition unique. Dans le cas où T varie, on a souvent recours à la somme des doses thermiques décomposées selon T en intervalles de temps, Δt . Ceci définit l'équivalent minutes cumulées de chauffage à 43°C, *CEM43* (« cumulative equivalent heating at 43°C »). Les considérations à propos de la thermotolérance mises à part, *CEM43* est très utile lors de schémas de traitement complexes, comme c'est le cas en clinique [4,69,75,85]. *In vivo*, la nécrose tissulaire peut ainsi être pronostiquée, si tant est que la distribution tridimensionnelle de la température tissulaire soit prise en compte, comme au travers du percentile 90 du *CEM43* dans le volume cible, *CEM43* T_{90} [6,69]. Ainsi, ces paramètres de thermodosimétrie sont très utiles en situation clinique au pronostique de la réponse tumorale [69,75,86,87], la thermométrie bénéficiant



de plus d'une constante amélioration technique [88].

L'effet cytotoxique d'une dose thermique est ainsi mieux défini, dépendant encore de la phase du cycle cellulaire. Les phases M et S sont les plus sensibles (expression d'une sensibilité de l'appareil mitotique et de l'altération des chromosomes, ou d'une inhibition de la synthèse de l'ADN, respectivement). La mort cellulaire apparaît principalement durant le cycle exposé à la chaleur [38]. Les cellules tumorales, fréquemment en phase M ou S, se reproduisant plus rapidement que les cellules de tissus sains, le plus souvent en phase G₁ or G₀, doivent être hypothétiquement plus sélectivement détruites par la chaleur [6]. Il est à noter pour la combinaison de traitements que la phase S, notablement la fin de phase S, est la plus résistante aux radiothérapies, les cellules traitées mourant alors en fin de cycle par mort reproductive. Certains bénéfices de l'association des deux traitements s'expliquent ainsi [6]. Ainsi la phase G₁ et donc les cellules différenciées, échappant complètement à la radiothérapie, sont tout de même affectées par la chaleur, bien que dans une moindre mesure par rapport aux phases M et S. En phase G, de plus larges doses de chaleur sont nécessaires pour entraîner la mort cellulaire, mais celle-ci adviendra alors beaucoup plus rapidement que lorsque l'exposition a lieu lors des phases M ou S [38,89]. L'hyperthermie est capable d'induire l'apoptose et la nécrose, pour des températures respectives croissantes. La susceptibilité à l'apoptose semble plus importante en-dessous de la température consensus de 43°C, alors que la nécrose apparaît plus franchement au-delà [38]. Ceci reste à être mis en parallèle avec le rôle crucial de la mitochondrie dans l'orientation vers ces différentes voies de mort cellulaire. Revenant aux considérations de clonogénicité, en addition de celles concernant plus spécifiquement la mort cellulaire, il est important de noter que la chaleur a aussi pour effet de prolonger le cycle cellulaire des cellules survivantes après exposition. Cet effet est d'autant plus prononcé que l'exposition à la chaleur a lieu lors de la phase G₁ ou en début de phase S [4]. Cet effet augmente aussi pour des températures plus élevées, conduisant à un nombre croissant de cellules qui ne se diviseront jamais. La chaleur peut aussi déclencher un arrêt en phases G₂ ou S₀. Les cellules temporairement arrêtées en S₀ meurent immédiatement en fin de cycle, montrant des aberrations chromosomiques spécifiquement dues à la désagrégation de la machinerie de synthèse de l'ADN [4]. Au contraire, les cellules arrêtées en G₂ apparaissent résistantes et ceci participe même de la thermotolérance [10].

À côté des considérations relatives aux caractéristiques cellulaires, les conditions du milieu ont aussi été étudiées. Ceci est le fruit d'expériences comparatives d'hyperthermie très élégantes, avec mesure de clonogénicité *ex vivo* pour des cellules tumorales greffées *in vivo* et chauffées *in situ*, en comparaison avec ces mêmes cellules cultivées et traitées *in vitro*. La clonogénicité observée *in vivo* se révéla bien inférieure à celle observée *in vitro*, diminuée d'un facteur 10². Ceci était encore plus prononcé lorsqu'un délai de 5 heures était respecté, précisément en laissant les cellules greffées *in situ* pendant ce délai [90-92]. Ce délai avait déjà été noté dans des expériences évaluant la viabilité des cellules tumorales au sein de nodules tumoraux traités par la chaleur au travers de leur capacité de greffe, qui s'est avérée à son nadir précisément après ce délai de 5 heures [93]. Une fois de plus, insistons sur les différences la sensibilité à la chaleur *in vivo* que *in vitro*. Elle apparaît plus élevée *in vivo* et ceci impliquerait le microenvironnement tumoral. Ce microenvironnement tumoral est une entité complexe résultant de l'interaction de multiples facteurs [94]: la perfusion tumorale, l'oxygénation tumorale, la distribution de pH intratumorale et son statut métabolique et bioénergétique, l'un influençant profondément l'autre, comme nous le verrons plus en détail. Dans le but de décomposer *in vitro* les facteurs de cette thermosensibilisation *in vivo*, nombres d'études intéressantes des effets toxicogéniques de la chaleur ont été menées dans des conditions reproduisant celles des tumeurs, c'est-à-dire en hypoxie, restriction en nutriments et pH acide. Dans les conditions *in vitro* de pure hypoxie aiguë, la thermosensibilité n'est que modestement affectée en

général [4,43]. Paradoxalement, les conditions d'hypoxie chronique se sont révélées capables d'augmenter nettement la thermosensibilité [4,44]. Il en résulte que la diminution du taux d'oxygène n'est pas en relation simple et directe avec une sensibilisation thermique, et que la thermosensibilisation est plus la conséquence de la perturbation par la chaleur d'un métabolisme cellulaire préalablement adapté aux conditions d'hypoxie [4,43]. Les aires tumorales où des cellules en hypoxie chronique sont présentes sont aussi acides le plus souvent. Aussi, quand on étudie *in vitro* les effets de conditions de pH acides, une sensibilisation à la chaleur est bien observée, notamment une diminution d'un facteur 10^2 de la clonogénicité, comme *in vivo* [95]. Lors d'une diminution du pH extracellulaire (pH_e) concomitante de l'exposition à la chaleur, un effet de thermosensibilisation n'apparaît que transitoirement, cependant qu'il est parfois plus prononcé pour les cellules tumorales que pour des cellules saines [4]. Il est très intéressant de noter que quand les cellules sont maintenues *in vitro* en conditions acides après traitement, l'effet de sensibilisation aux effets toxicogéniques de la chaleur apparaît maximal 5 h après traitement par la chaleur [95]. L'effet du pH semble en fait dépendre plus précisément du pH intracellulaire (pH_i) [4,43,44,96]. Pour des cellules préalablement cultivées en conditions acides avant exposition à la chaleur, cet effet de thermosensibilisation disparaît. Une adaptation des cellules tumorales pour maintenir leur pH_i à des valeurs presque physiologiques, 7.4, est à considérer. Les principaux mécanismes cellulaires d'homéostasie du pH impliquent les systèmes tampons intracellulaires, l'incorporation de H^+ dans les acides aminés au travers de $-NH_4^+$, et les enzymes de transport ATP-dépendantes, identifiées lors d'expériences d'inhibition spécifiques, par les inhibiteurs de pH, qui sont: i) un transporteur d'ion H^+ ATPase de type vacuolaire, inhibée par la bafilomycine et l'oximidine; ii) le co-transporteur d'échange H^+ /lactate, bloqué par l'amiloride et la quercétine; iii) l'échangeur Cl^-/HCO_3^- Na^+ /dépendant, bloqué par les dérivés disulfoniques (DIDS); iv) la famille d'échangeurs sodium-proton NHE, bloquée par l'amiloride et son dérivé, le cariporide; v) le co-transport électrogénique $Na^+-HCO_3^-$ [43]. Le facteur déterminant semble bien être la diminution du pH_i , mais ceci n'est pas encore clairement mis en évidence [4,43]. En représentation d'Arrhenius, pour des conditions acides, la température à laquelle l'inflexion apparaît est diminuée lorsque le pH_i est diminué [4,69]. Comme cette inflexion concerne en premier lieu les protéines, il est intéressant de mettre en parallèle les variations de force ionique en relation avec le pH, et leurs effets déstabilisants pour les protéines, avec les effets déstabilisateurs propres à la chaleur vers la facilitation de l'altération des protéines [4]. L'acidification a aussi démontré la capacité d'abroger le développement de la réponse au choc thermique, permettant l'apparition d'une thermotolérance aiguë [55]. Pour illustrer le haut degré d'intrication de tous ses facteurs entre eux, et avec la réponse au choc thermique, il est remarquable que le pH_i diminue en condition d'hypoxie aiguë, et que cet effet soit plus prononcé à $41^\circ C$ [4]. Pour finir, remarquons aussi que la carence en nutriments est capable d'augmenter la sensibilité thermique, reflet des changements et interrelations métaboliques complexes, dont l'ampleur et la pertinence ne pourront être proprement envisagées que plus loin, en venant à la physiopathologie tumorale.

Une large variété de stress, de ceux associés aux transitions de phases du cycle cellulaire, à la différenciation et à la croissance cellulaire, qualifiables de physiologiques à première vue, à ceux moins physiologiques d'apparence, comme les inhibiteurs du métabolisme énergétique, les toxines, des agents biophysiques variés dont, par-dessus tous, la chaleur, induisent au niveau cellulaire les dites réponses aux stress. Les premières protéines de stress découvertes, l'ont été comme produits de gènes remarquablement induits par la chaleur et ainsi appelées en anglais « heat shock proteins », HSPs. Parmi le nombre croissant de gènes classés dans ce groupe très conservé des « heat shock genes » (HSPs), certains codent pour les protéines les plus abondantes d'une cellule saine, représentant approximativement 50% des protéines cellulaires. Les concentrations intracellulaires basales dépendent de l'espèce considérée, et sont souvent plus élevées chez l'homme. L'élévation de la teneur en HSPs qui caractérise nombre de cellules cancéreuses est aussi remarquable. Les HSPs sont indispensables aux cellules saines pour assurer de multiples fonctions biologiques. Les HSPs participent en fait largement aux fonctions chaperonnes. Ces fonctions qui comme nous l'avons déjà évoqué contribuent à la stabilisation de la structure tertiaire et quaternaire d'autres ensembles protéiques en consommant de l'ATP. Ceci est crucial au bon repliement des protéines naissantes lorsque l'on considère l'énorme concentration protéique intracellulaire, et de même pour stabiliser et réparer le repliement de protéines partiellement dénaturées. Bon nombre de produits des gènes HSPs peuvent aussi être classés comme protéines chaperonnes. On reconnaît aussi à certains gènes HSPs des fonctions dites de « housekeeping » qui permettent d'assurer l'homéostasie cellulaire, et les protéines HSPs sont indispensables au trafic cellulaire, à la translocation et au renouvellement des protéines, ainsi qu'à la stabilisation de récepteurs (aux stéroïdes, par exemple) ou de vésicules mantelées (« coated vesicles ») [97]. Comme c'est déjà le cas pour certaines chaperonnes, des fonctions d'autre nature, appelées « moonlighting », ont aussi été mises à jour pour les HSPs. De la localisation des protéines dépendent principalement leurs fonctions « moonlighting »: au niveau intracellulaire, membranaire, ou dans les fluides extra-cellulaires, [14,98-100]. Au sein de leur famille protéique très conservée, les HSPs restent simplement classées en fonction de leur masse moléculaire [101]. Rappelons que nous utilisons ici la nomenclature selon la référence [17], ainsi que les règles du comité HUGO (HUGO Gene Nomenclature Committee) et selon la base de données « Entrez Gene database » (la dénomination commune antérieure est rappelée entre parenthèses par souci de clarté). Ceci dit, nous allons par la suite considérer des protéines remarquables pour notre propos, qui peuvent aussi bien être des HSPs très connues, des chaperonnes fameuses, inductibles ou non par la chaleur, voire des protéines non classées parmi les HSPs alors qu'elles soient connues pour être parfaitement induites par la chaleur [97,101-106]. Ainsi peut-on citer: les HSPs de faible poids moléculaire (« small HSPs »), telles que l'ubiquitine UBB, HSPE1 (HSP10) et HSPB1 (HSP27) qui ont une spécificité tissulaire; l'oxygénase de l'hème, HMOX1 (« heme oxygenase 1 » HO-I ou HSP32); SERPIN1 (HSP47), un paralogue inductible par la chaleur d'une sérine peptidase endoréticulaire associée au collagène; HSPD1 (HSP60), qui est importante pour les mitochondries et l'immunité innée; HSPA8 (HSC70; HSC71; HSP71; HSP73), qui est constitutive. Du groupe des HSPA, HSPA1A et HSPA1B (HSP70 et HSP72, respectivement) sont les HSPs les plus remarquablement induites par la chaleur. Ne différant que par seulement deux acides aminés, on pense qu'elles sont complètement interchangeables. HSC1 (HSP90) et HSPH1 (HSP100/105) sont connues comme d'importantes chaperonnes. HSPA8 (HSC70; HSC71; HSP71 ou HSP73) est la protéine HSP à fonction de chaperonne la plus abondante en conditions basales dans une cellule normale. La synthèse des isoformes de HSPA1 (isoformes de HSP70 induites par la

chaleur) est très faible en l'absence de stress ou de pathologie mais augmente après choc thermique d'une telle manière qu'elle devient la protéine la plus abondante de la cellule. Bien des conditions de stress peuvent entraîner la déstabilisation ou la détérioration de protéines et ainsi requérir l'intervention des fonctions chaperones des HSPs. Ainsi, la régulation de la synthèse des HSPs n'est pas seulement influencée par le stress thermique mais plus généralement par tout stress protéotoxique [102,97,107]. Les agents biophysiques distincts qui induisent les HSPs peuvent être classés en trois groupes selon le mécanisme aboutissant au stress protéotoxique commun [108]:

- i. l'induction de protéines non natives par les analogues d'acides aminées ou plus indirectement par l'éthanol, ainsi que de nombreux solvants organiques qui peuvent altérer la conformation de protéines jusqu'à dénaturation, entraînant finalement la synthèse de HSPs.
- ii. Certains métaux lourds, les ions (Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Zn^{2+}), les agents chélateurs et les composés thiols réactifs conduisent par réactions red-ox à la thiolation de protéines ou à la formation de ponts disulfures entre protéines. Ces agents et traitements sont d'ailleurs qualifiés comme altérant la conformation des protéines.
- iii. Les radicaux libres et la rétablissement après hypoxie, tous deux à distinguer du stress dit oxydatif, induisent les HSPs principalement à la suite d'une fragmentation des protéines directe ou par réaction red-ox, impliquant notamment le radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$).

Les gènes *HSPs* sont transcrits directement en ARNm sans modifications post-transcriptionnelles. De plus, pour *HSPC1* et *HSPA1* (*HSP90* et *HSP70*) aucune modification post-traductionnelle n'est nécessaire, par opposition à *HSPC4* (*GP96*) pour laquelle une étape de glycosylation est nécessaire. L'induction des gènes *HSPs* peut ainsi être très rapide comme leur transcription qui se maintient pendant une période de temps déterminée, grossièrement 48 h, avec un pic à 24 h suivant le stress inductif. Par exemple, durant un traitement de cellules HeLa à 42°C pendant 4 h, on voit dans les premières 30 – 60 min la transcription de *HSPs* atteindre son maximum puis décliner. Si l'ampleur du stress ne compromet pas la traduction, les ARNm rapidement produits sont traduits pendant cette exposition à la chaleur et maintenus actifs, car le choc thermique entraîne aussi un effet de stabilisation de ces ARNm. Un maximum du taux de traduction est observé dans les 2 h, comme pour *HSA1* typiquement. Finalement, la concentration de protéine *HSPA1* (*HSP70*) est maximale dans les 3 h [109]. Les auteurs notent que, à 43°C, il y a ni transcription de *HSPs*, ni traduction en *HSPs*. Néanmoins, après retour à température physiologique, les gènes *HSPs* seront inéluctablement induits à cause des dégâts cellulaires occasionnés [13]. Les facteurs de transcription du choc thermique, HSFs (« Heat shock transcription factors »), soit, pour les mammifères, trois homologues HSF1, 2 et 4, ont une importance centrale dans la régulation de l'expression des gènes *HSPs*. Les HSFs reconnaissent et se lient à l'ADN par la séquence appelée *HSE*, « heat shock element DNA sequence », ce qui active la transcription des *HSPs*. HSF1 est le facteur de régulation le plus important pour tout le répertoire des gènes *HSPs* [110], pour les gènes canoniques de la famille: *HSPB1*, *HSPA1* et *HSC1* (*HSP27*, *HSP70* and *HSP90*), mais peut aussi participer à la régulation d'autres gènes [111]. Ainsi, il est intéressant de savoir que le promoteur des gènes *SOD*, codant pour les superoxyde dismutases, et le promoteur des gènes *ABCBI*, impliqués dans la résistance multiple à la chimiothérapie, présentent tous deux un site de liaison à HSF [112,113]. D'autre part, quelques protéines non considérées comme *HSPs*, telles que celles impliquées dans le complexe majeur d'histocompatibilité humain, HLA (Human Leukocyte Antigens) de classe I, (MHC-I) et la prise en charge des antigènes, « antigen processing » -à l'exception de l'ubiquitine, UBB, qui est bien classée parmi les *HSPs*- semblent cependant transcriptionnellement activées par le choc thermique. Récemment, ceci s'est imposé pour deux sous-unités du protéasome: PSMB9 (alias Imp2) et PSMB8 (alias Imp7), responsable d'une augmentation de la présentation d'antigènes [114].

La forme cytosolique monomérique de HSF1 est l'état réprimé de ce facteur de transcription. HSC1 (HSP90) s'associe à cette forme et contribue à la répression. La dérèpression est déclenchée lors de stress, thermiques ou non, et permet l'activation de ce HSF, et d'autres apparemment. Conséquemment, la phosphorylation, la trimérisation des HSFs et leur translocation dans le noyau permettent leur liaison à l'ADN au niveau des séquences promotrices *HSE*, responsables de l'apparition caractéristique de granules intranucléaires de stress, et, au final, les gènes *HSPs* sont ainsi activés [110]. Un événement possiblement initiateur en lien avec le stress protéotoxique est la levée de répression par HSC1 (HSP90) qui, alors requise par ailleurs, se dissocie de son association avec HSF1. Des taux de transcription élevés ne sont maintenus que tant que les trimères de HSF1 restent liés aux *HSEs*. En retour, lorsque HSF1 est converti en monomères, quand le signal de stress est levé ou que l'endommagement de protéines s'estompe, l'activité des gènes *HSPs* s'atténue [115]. HSA1 (HSP70), dont les fonctions de chaperonne en réponse au stress thermique sont les mieux décrites, se lie aux protéines dénaturées (reconnaissant les poches hydrophobes exposées par cette dénaturation) et tente de restaurer la structure tertiaire et l'activité de ces protéines par un mécanisme dépendant de l'ATP. Les interactions des HSPs avec les HSFs permettent très vraisemblablement un rétro-contrôle de l'activité des gènes *HSPs*. La répression de HSF1 par HSPA1 (HSP70) a été clairement démontrée [109]. En ce qui concerne le génome entier, la liaison de HSF1 à l'ADN n'a pas été observée comme nécessaire ou suffisante pour l'induction de transcrits par le choc thermique [111]. Il a été ainsi proposé d'autres possibilités de régulation à ce niveau pour expliquer comment des gènes pour lesquels une liaison à HSF1 est rapportée ne sont pas induits par le choc thermique, et, alternativement, comment ceux pour lesquels aucune liaison à HSF1 n'a été rapportée sont, eux, bien induits par le choc thermique. D'un côté, un mécanisme post-transcriptionnel influant sur le traitement de l'ARNm ou sur sa stabilité pendant ou après le choc thermique pourrait contribuer à l'augmentation des concentrations de transcrits de gènes apparemment indépendantes de HSF1, bien que induites par le choc thermique. Les auteurs suggèrent pour ces gènes: i) que la régulation est bien indépendante de HSF1, sur la base d'articles précédents [116,117]) ou, ii) que ceci relève d'une réponse secondaire au sein d'un sous-groupe de cellules après échec de la réponse primaire au choc thermique. D'un autre côté, pour les gènes reliés à la liaison de HSF1, mais non activés par la chaleur, un mécanisme *sui generi* de répression de l'activité de HSF1 est suggéré. Une considération importante à propos de *HSPA1* est l'apparente discordance entre la transcription en ARNm et la traduction en protéine. Elle renforce l'hypothèse selon laquelle la régulation des concentrations de protéines HSPs pourrait dépendre de mécanismes de régulation plus en aval, tels qu'au niveau de la traduction de l'ARNm [13].

Intéressons nous maintenant à l'augmentation du stock intracellulaire en HSPA1 (HSP70) par surexpression basale comme on l'observe dans les cellules cancéreuses. Ceci est considéré comme étant indépendant de l'activité du gène *HSF1*. Confusément, la régulation de traduction ou l'intercession d'autres isoformes de HSFs sont invoquées, mais des études récentes ont révélé avec pertinence un mécanisme original d'activation de HSF1 par signalisation horizontale au niveau membranaire. HSF1 serait activé par levée de la répression exercée par un antagoniste constitutif, la « glucose synthase kinase »: GSK3. Cette kinase se situe en fin de la cascade de phosphorylation déclenchée par le facteur de croissance malin de la famille des neurégulines (« neuregulin ») NRG1 (Heregulin β 1), proche du facteur de croissance épidermique, EGF (« epidermal growth factor ») et capable d'entraîner la l'homo- ou l'hétérodimérisation des quatre récepteurs à l'EGF et d'aboutir à la levée d'inhibition exercée par GSK3 sur HSF1 [118-120]. La réponse au choc thermique, comme la plupart des réponses aux stress, est très complexe et de plus une régulation croisée entre différentes voies permet qu'une voie associée à un stress sensibilise une voie associée à un autre stress en enclenchant une réponse dans des conditions non classiques. Un exemple d'importance en

est la réponse au stress hypoxique qui repose centralement sur la voie de stress sensible à l'oxygène (« oxygen-sensing stress pathway »), mais qui nécessite pour être complète l'intervention des gènes *HSPs* [121]. HSPA9 (GRP75) et HSPA5 (GRP78) sont notamment connus comme facteurs de la régulation associée à l'oxygène [101]. La réponse au stress hypoxique résulte rapidement des changements du statut en oxygène, comme c'est le cas lors du phénomène d'ischémie/reperfusion. Ce phénomène est très fréquent dans les tumeurs mais doit être distingué du stress d'hypoxie chronique et de la réponse associée. L'ischémie, la première phase, correspond directement à la phase de diminution des apports en oxygène. La deuxième phase, la reperfusion, correspond au retour à des conditions normoxiques avec génération d'un pic de concentration en espèces radicalaires, les ROS (« reactive oxygen species »). Avertis que le stress associé au phénomène d'ischémie/reperfusion se distingue du stress oxydatif, bien qu'ils se recouvrent en partie finalement, précisons qu'ils se définissent de telle sorte que le stress d'ischémie/reperfusion dépend strictement des taux en oxygène moléculaire alors que le stress oxydatif dépend lui plus strictement des ROS, parmi lesquelles H₂O₂ semble jouer le rôle de signal moléculaire [41]. Nous nous attacherons à cette distinction, bien qu'elle soit le sujet d'intenses débats [122]. Cependant, nous aborderons et retiendrons de ces deux stress les inter-relations avec le stress thermique, qui nous intéresse ici. Pour le stress oxydatif, sa capacité d'induire entièrement une thermotolérance en l'absence d'induction de HSPs, comme bon exemple de thermotolérance de type-I, a été démontrée [13]. Précisons maintenant les bases moléculaires de la réponse aux variations de la concentration en oxygène. Le facteur induit par l'hypoxie: HIF1 (« hypoxia-inducible factor 1 »), un hétérodimère des protéines HIF1A et HIF1B, est activé durant une pathologie ischémique ou lors des ischémies fréquentes de la vascularisation tumorale par la carence en oxygène moléculaire qui permet, en conditions normales, la dégradation rapide de HIF1A (c'est un bon exemple de régulation post-traductionnelle). HIF1 et le groupe de protéines qu'il régule, appelées protéines régulées par l'oxygène (« oxygen-regulated proteins »), incluant p53 et les facteurs vasculaires de croissance endothéliales (VEGFs, « vascular endothelial growth factors »), jouent un rôle fondamental dans les cancers [123-126], notamment dans l'agressivité des tumeurs [127]. HIF1 induit un nombre important de gènes qui sont impliqués dans la régulation vasomotrice (oxydase nitrique), dans le transport du glucose, dans la glycolyse, l'érythropoïèse, l'angiogenèse (VEGFs et angiopoïétines), dans la production du facteur de croissance semblable à l'insuline (« insulin-like growth factor »), dans le remodelage de la matrice extra-cellulaire et dans la régulation du cycle cellulaire [128]. Les enzymes qui catalysent des étapes intermédiaires de la glycolyse particulièrement augmentées par HIF1 sont GLUT-1, une exokinase de type I; l'aldolase A, la lactate deshydrogénase, la phosphofructokinase L, la phosphoglycérate kinase 1 et la pyruvate kinase M. De plus, HIF1 entraîne l'augmentation des superoxyde dismutases: SOD, et des oxygénases de l'hème: HMOX1 (HSP32) et HMOX2, qui permettent par ailleurs de piéger les ROS (« scavenging ») et seront amenés à jouer un rôle important lors du pic de stress oxydatif qui fera suite [129]. Ces oxygénases catalysent en effet la réaction de Fenton, recourant aux atomes de fer et contribuant à son métabolisme, qui apparaît important pour la physiopathologie tumorale [130]. HIF1 régule aussi les anhydrases carboniques positivement, s'opposant à l'acidification intracellulaire, qui participe aussi à la physiopathologie tumorale [131]. Chez la drosophile, il a été mis en évidence que les séquences de régulation au sein du promoteur de *Hsfl* lient l'homologue drosophilien de HIF1A chez l'homme: sima, et que ceci déclenche l'augmentation de la transcription de *Hsfl* en ARNm. Ceci est nécessaire pour la complète induction des Hsps durant l'hypoxie [132]. Cette régulation croisée reflète encore la grande complexité de la régulation des gènes impliqués dans le choc thermique, qui semblent à l'origine d'une adaptation évolutive moléculaire à des formes de stress variées vers une protection plus large dans la diversification des formes de stress jusque dans des formes de signalisation de mort cellulaire. En particulier, HSPB1, HSPA1 et HSPC1 (HSP27, HSP70 et HSP90) ont des rôles inhibiteurs extrêmement complexes dans

la régulation de l'apoptose. Des interactions physiques avec les molécules apoptotiques (caspases, les cdk: « cyclin dépendant kinases », BAG3) seraient à l'origine de l'inhibition de l'apoptose [133,103]. Ceci peut bien sûr toujours être débordé par un stress de grande ampleur qui obligera alors la cellule à nécroser. La résistance à la mort cellulaire accordée par des concentrations élevées de HSPs participerait de l'accroissement de certaines capacités de survie dans les cellules cancéreuses. Ceci limiterait les bénéfices que l'on peut attendre de modalités thérapeutiques basées sur l'induction de l'apoptose, telles que certaines modalités de chimiothérapie, radiothérapie et d'hyperthermie même. Ainsi, le parallèle entre HSPs et thermotolérance est presque certain, mais il n'est pas aussi direct qu'à première vue, et il reste à le comprendre plus en détail. Récemment, il a été démontré que HSPA1 (HSP70) permet la protection des membranes lysosomiales et, préviendrait aussi les cellules de la mort par autophagie, mécanisme ayant cours là aussi dans les cellules cancéreuses [134].

1.1.2 Hyperthermie en oncologie

Afin de comprendre les bases de l'hyperthermie en oncologie, à l'intrication des effets de la chaleur au niveau cellulaire doivent être ajoutés les degrés de complexité supplémentaires en relation avec les niveaux correspondants aux tissus, organes, et organisme, en tenant compte de la physiopathologie, avant d'envisager son application thérapeutique.

Les modalités de traitement par hyperthermie

La thérapie thermique ou thermothérapie comprend tout traitement basé sur le transfert d'énergie thermique dans le corps, intérieurement ou extérieurement [135]. L'hyperthermie induite, (le terme induite est à préciser selon le contexte pour en dénoter l'usage thérapeutique et la séparer d'hyperthermies pathologiques), consiste à augmenter la température, soit du corps entier, que l'on peut appeler hyperthermie corporelle (« whole body hyperthermia »: WBH); soit d'une partie du corps, alors appelée hyperthermie régionale (« regional hyperthermia »); soit, plus localement, d'un tissu, et elle est alors appelée hyperthermie locale (« local hyperthermia ») [136]. Les températures permises par ces modalités vont croissantes dans l'ordre mentionné et, en conséquence, les effets biologiques et les effets thérapeutiques possibles varient. D'intérêt constant en recherche et pratique clinique, l'hyperthermie induite est principalement indiquée comme thérapie adjuvante en oncologie [38,137-141]. Une modalité particulière, la thermoablation, est plus souvent utilisée en extension de la chirurgie pour traiter des hyperplasies d'un abord difficile. Elle consiste à augmenter considérablement, mais très localement, la température au-delà de 47°C pour déclencher une intense nécrose et coagulation tissulaire [142]. L'approche de l'hyperthermie corporelle induite est opposée. S'appliquant à tout le corps, l'élévation de température se limite à 41°C pour des raisons évidentes de toxicité (le grand maximum que l'on peut atteindre serait 42°C lors de l'induction d'hyperthermie corporelle extrême, « extreme WBH »). Entre ces deux modalités, pour les modalités d'hyperthermies régionales ou locales, des températures jusqu'à 46°C peuvent être envisagées. En thérapeutique, des ralentissements de croissance tumorale avec délai peuvent être observés à une température aussi modeste que 39°C [10], alors que *in vitro*, comme nous l'avons vu, seules des températures au-delà de 42-43°C permettent à la chaleur d'entraîner avec certitude une diminution importante de la survie cellulaire et une mort cellulaire directe. Cela suggère deux hypothèses en

rapport avec la physiopathologie des tumeurs solides: i) la sensibilité thermique de cellules tumorales, ou toute autres cellules, est plus élevée dans l'environnement tumoral, exclusivement [143]; ii) la chaleur peut avoir des effets toxicogéniques et antitumoraux indirects. L'hyperthermie douce (« mild hyperthermia ») correspond aux modalités se limitant à des températures inférieures ou égales à 42°C, qui, c'est important, peuvent être atteintes pour la plupart des dispositifs actuellement disponibles en clinique. Pour des températures supérieures à 43°C jusqu'à environ 46°C on parle d'hyperthermie modérée (« moderate hyperthermia »). Les effets antitumoraux de la chaleur augmentent substantiellement avec la température mais il faut noter par ailleurs une dépendance au volume tumorale à traiter [44]. On observe aussi fréquemment que l'hyperthermie de tumeurs de localisation profonde peut avec succès augmenter leur température dans l'intervalle efficace alors que les tissus sains environnants sont épargnés, leur température demeurant bien inférieure [4,43,144,145]. Un chauffage et un effet quasi sélectif sur les cellules de la tumeur peut même être obtenu quand les tissus ciblés renfermant la lésion sont chauffés entre 40 et 44°C [146]. Ainsi, quand l'hyperthermie est conçue comme agent sensibilisant à d'autres thérapies, dans le cadre de protocoles modernes du traitement des tumeurs recourant à de multiple thérapies et modalités, cet effet de chauffage différentiel s'associe avec un gain thérapeutique substantiel et très profitable [6,10,38,147,148]. Des essais cliniques avec l'association hyperthermie et radiations ionisantes ont bien établi le potentiel radiosensibilisateur de l'hyperthermie [6]. Concernant le niveau cellulaire, il s'explique alors par la complémentarité de sensibilité en termes de phases du cycle cellulaire et par une synergie de leurs effets respectifs sur l'ADN, aboutissant plus facilement à son endommagement. Cependant l'effet de radiosensibilisation ne pourra être pleinement compris qu'après considération des modifications du microenvironnement tumoral par la chaleur que nous traiterons bientôt [149]. La chaleur peut sensibiliser les tumeurs et les cellules tumorales à certaines chimiothérapies, de façon variable selon le mécanisme d'action de la drogue. Ceci repose sur des interactions pharmacodynamiques et/ou pharmacocinétiques parfois très sophistiquées qui font l'objet d'intenses recherches [6,147,150]. Il est aussi à noter que l'hyperthermie sous sa forme locale a un énorme potentiel pour cibler l'action de drogues et de formulations [6]. Les modulations de la réponse immunitaire contre la tumeur par la chaleur sont également très intéressantes. De mieux en mieux comprises, elles expliquent actuellement l'intérêt de certains effets indirects de l'hyperthermie corporelle ainsi que de l'hyperthermie locale au sein d'un organisme, suggérant un fort potentiel, notamment en association avec des protocoles immunothérapie.

Hyperthermie et physiopathologie des tumeurs solides

Parmi les divers aspects de la physiopathologie tumorale, pour laquelle l'importance de hétérogénéité intratumorale est encore sous-estimée, les particularités anormales de la vascularisation tumorale et du microenvironnement tumoral sont tout particulièrement influentes pour l'hyperthermie [149,151-156]. Au premier égard, la sensibilité thermique est dépendante de l'environnement tumoral au travers de sa bioénergétique, de son métabolisme, du pH, des taux de nutriments et d'oxygène; le tout étant fortement sous l'influence des microcirculations lymphatique et sanguine. Soulignons l'importante donnée actuellement au microenvironnement dans l'étiologie du cancer, en rappelant que des cellules normales comme des cellules mutées adoptent un phénotype semblable dans une tumeur donnée, qui, de surcroit, favorise l'instabilité génétique et épigénétique, et l'accumulation sélective de mutations, phénomène appelé phénotype mutateur [157]. Au deuxième égard, la température atteignable est dépendante des dissipations de chaleur par convection, notamment par convection forcée au travers des mouvements de fluides et de leur régulation, c'est-à-dire principalement de la perfusion sanguine. Pour une tumeur de localisation

profonde, une corrélation inverse entre la température de cette tumeur et le taux de perfusion moyen a même été démontrée [158]. Aussi, une méthode d'évaluation du flux moyen sanguin global appelée clairance thermique, ou méthode « washout », consiste en la mesure de la diminution de température dans les premiers instants suivant l'arrêt d'un chauffage [159-164]. D'autres techniques de mesure du flux sanguin permettent une détermination plus ou moins précise, limitée au flux sanguin moyen global ou au flux régional. Les plus précises peuvent définir la distribution du flux sanguin dans un tissu [159]. La perfusion tumorale diffère fréquemment significativement de celle des tissus normaux. Le flux sanguin tumoral (« tumor blood flow », TBF) moyenné en conditions basales n'apparaît pas corrélé au volume tumoral, bien que le TBF basal moyen de petites tumeurs semble peut-être plus élevé. On ne peut donc pas distinguer les tumeurs à flux sanguin basal élevé de celles à flux sanguin basal bas, sur des critères de taille ou d'autres critères que la mesure de ce flux sanguin. La distribution de flux sanguin basal montre une importante hétérogénéité, spécialement pour les grandes tumeurs avec une perfusion en périphérie plus élevée que dans le centre [43,146,165,44]. Les variations inter-tumorales sont dépendantes de la méthode de détermination et de la précision, et se différencient parfois difficilement des variations intra-tumorales. Tout bien considéré, le TBF moyen est de 0.01 à 1-2 ml·g⁻¹·min⁻¹. Les valeurs les plus élevées sont rapportées pour les métastases hépatiques, les cancers du sein ou parfois les cancers colorectaux, et sont en fait alors supérieures aux valeurs de perfusion de la plupart des tissus sains [165]. Généralement, la microcirculation tumorale montre une distribution mal appropriée et déficiente, qui ne permet pas une irrigation et un drainage adéquats de l'ensemble des tissus tumoraux. Certains tissus restent au-delà de la limite de diffusion pour les nutriments, petites molécules et pour l'oxygène, qui est d'environ 100-200 µm. Ainsi, certaines aires de la tumeur sont soumises à l'insuffisance chronique en nutriments et à une hypoxie chronique, alors qu'une cause pathologique parfois avancée pour être à l'origine d'une incapacité propre à utiliser l'oxygène, peut être le plus souvent exclue [43,123]. Notons que la distribution de la pO₂ reflète étroitement celle du TBF [44]. La microvasculature tumorale a des origines variées [43,166-168]: i) la co-option de vaisseaux normaux préexistants, et préservés lors de la colonisation tumorale (on parle de vaisseaux cooptés: « co-opted vessels »; ii) la vasculogénèse, qui repose sur la colonisation par des cellules endothéliales ou autres cellules souches de la moelle osseuse circulantes, pour laquelle les récentes avancées étiologiques soulignent l'importance [169]; iii) l'angiogénèse, ou la néoangiogénèse, qui permet la néoformation de vaisseaux, dits néovaisseaux, par bourgeonnement et prolifération de cellules endothéliales localement à partir des vaisseaux; et, iv) la pseudoangiogénèse qui est une architecture à lumen, formée et constituée uniquement de cellules tumorales, ces vaisseaux sont appelés pseudovaisseaux [170]. Intrinsèquement, l'angiogénèse est très fortement liée à HIF, en relation avec l'hypoxie. La microvasculature tumorale de néoformation est très tortueuse, avec des vaisseaux en cul-de-sac, des ramifications excessives et des shunts. Les vaisseaux sont très courbés, ont une structure en hélice et apparaissent très dilatés, avec une dilatation basale presque au maximum de leur capacité dilatatrice, pour répondre à la demande très élevée des tissus tumoraux irrigués [95]. L'alignement des cellules endothéliales et la membrane basale élastique sont fréquemment interrompus, ce qui occasionne le contact direct des cellules circulantes avec des cellules tumorales. Les néovaisseaux ne présentent ni cellules musculaires lisses ni péricytes [170]. La vascularisation tumorale montre une perméabilité accrue avec un important degré d'ouverture des fenestrations sinusoides, qui, dans le cas de tissus normaux, seraient fermées en conditions normothermiques [95]. Comme le drainage lymphatique est aussi peu important, les fluides interstitiels de la tumeur s'accumulent et peuvent occuper 30 – 60 % du volume tumoral [43,171-173]. Cette fraction volumique conséquente n'est plus négligeable comme cela est possible pour les tissus normaux, où l'on sait que l'eau extracellulaire représente 20-25% de l'eau tissulaire totale [171,172]. Les fluides interstitiels de la tumeur, notamment ceux des zones nécrosées, sont riches en

collagène et ont des caractéristiques biochimiques propres. Au sein de la tumeur, le sang représente 1-10% du volume tumoral [174], a une viscosité accrue, associée à une hémococoncentration et une diminution de l'élasticité érythrocytaire en lien avec une diminution du pH. Des arrêts microcirculatoires fréquents sont alors générés par le blocage et l'agrégation des érythrocytes, ainsi que par des agrégations plaquettaires, par des caillots et par la prolifération cellulaire intense qui collabent les vaisseaux [43,170]. La pression interstitielle tumorale élevée (55 mmHg) s'associe avec la diminution de la diffusion (des nutriments, mais c'est aussi malheureusement des drogues) [172], des collapsus vasculaires transitoires et parfois l'inversion de la direction du flux sanguin [43]. La vascularisation tumorale montre une altération de sa régulation. Le TBF n'est pas régulé comme le flux sanguin dans les tissus normaux, où il s'adapte à la demande métabolique [43,151]. En plus des arrêts circulatoires réalisant le phénomène d'ischémie/reperfusion durant lequel sont générées dans les zones de la tumeur irriguées, une déficience en nutriments et une hypoxie aiguë et transitoire, aboutissant en sommant les périodes d'ischémie à un temps en hypoxie conséquent. Cela reste distinct de l'hypoxie chronique qui concerne les autres zones tumorales situées plus à distance de vaisseaux. Concernant la thermorégulation vasculaire, les capacités vasodilatatrices des vaisseaux tumoraux néoformés sont inférieures à celle des vaisseaux co-optés et des vaisseaux de tissus sains [95]. Ceci est attribué au fait que les néovaisseaux sont dépourvus de cellules musculaires et non innervés et de plus constamment remaniés et en intense développement [95,165]. Durant un traitement hyperthermique, le TBF peut être augmenté, diminué ou rester inchangé, selon la tumeur et son flux sanguin basal préalable, selon la dose thermique, la technique et la vitesse de chauffage. Les mécanismes exacts ne sont pas encore entièrement compris. De plus, des variations de TBF peuvent apparaître au cours d'un même traitement hyperthermique. Ceci se réalise le plus souvent, après que le flux ait initialement augmenté, par une stase. Il est important de prendre en compte que les changements induits par la chaleur peuvent aussi persister au-delà de la période de chauffage. À noter également que pour une tumeur avec de faibles taux de perfusion sanguine, on peut s'attendre à ce que la chaleur occasionne plus de dégâts tissulaires, mais, dans une autre mesure, aussi vasculaires, que pour une tumeur à taux de perfusion plus élevés [44]. La réponse vasculaire à l'hyperthermie en termes de TBF moyen et de sa distribution sont cependant difficiles à prédire et leur implication dans la réponse tumorale n'est pas triviale [44]. Quand le TBF est diminué en réponse à la chaleur (disons au-delà de la valeur indicative de 43°C), les dégâts tumoraux seront plus grands, car la souffrance tumorale par carence s'ajoute et empire son microenvironnement. Ceci diminue encore les effets de perte de chaleur par convection sanguine, et augmente la température et la toxigénicité effective de la chaleur. Alors, les vaisseaux étant par la même endommagés, le TBF diminue jusqu'à la stase [38]. Par opposition, quand le TBF augmente en réponse à l'hyperthermie (ce qui est généralement observé initialement lors d'hyperthermies modérées, en dessous de 43°C), cet accroissement n'est pas d'un facteur supérieur à 1.5 - 2.0, alors que le flux sanguin de tissu sain peut s'accroître lui d'un facteur 10 à 15 [146]. Les modifications du TBF peuvent aussi se renverser en cours de traitement. Ceci s'observe toujours à la suite d'une augmentation du TBF dans un premier temps, qui peut alors diminuer plus ou moins rapidement en fonction de la dose thermique, avec une sensibilité qui est fonction de la tumeur (grossièrement pour l'intervalle de températures entre 41 et 43°C). En fin de compte, le TBF peut alors décliner au point d'obtenir une stase, alors qu'elle n'est jamais observée dans les tissus sains pour des températures inférieures à 45-47°C, des durées inférieure à 30-60 min et une vitesse de chauffage inférieure à 0.7°C·min⁻¹ [95,165]. À côté des caractéristiques concernant la thermorégulation, les autres anomalies de la vascularisation tumorale évoquées peuvent être impliquées dans des événements vasculaires plus complexes en réponse à l'hyperthermie [43]. Pour expliquer une augmentation du TBF dans la tumeur, en regard du défaut de sa régulation thermique et de la vasodilatation basale élevée, les mécanismes suivants ont été avancés: i) implication des vaisseaux co-optés, ii) dilatation mécanique ou passive par

augmentation de l'influx sanguin depuis les tissus sains adjacents, iii) une augmentation de la fraction d'éjection cardiaque. Cette dernière est souvent observée même lors d'hyperthermie locale et impliquerait la sécrétion de molécules vasomotrices telles que la bradykinine ou l'histamine [95]. Alternativement, pour expliquer une diminution du TBF et la stase en réponse à l'hyperthermie, d'autres mécanismes sont suggérés: i) le gonflement des cellules endothéliales; ii) l'embolisation par l'adhésion de leucocytes, qui a été très bien observée au niveau des post-veinules par microscopie intravitale; iii) une augmentation de la viscosité sanguine et une fréquence élevée d'anomalies rhéologiques au niveau des érythrocytes reposant sur la modulation du pH par l'hyperthermie; iv) des réflexes vasoconstricteurs focalisés qui concernent de courts segments de la vascularisation des tissus sains, juste en amont de la vascularisation tumorale pour la géométrie en série, et/ou des effets de spoliation en géométrie de vascularisation parallèle ou mixte; v) des effets dégénératifs, tels que la lyse de cellules endothéliales (ou tumorales luminales, pour les pseudovaisseaux) avec hémorragies [43,95,146,165]. Les mécanismes correspondant à iv) et v) sont prééminents pour expliquer toute diminution immédiate du TBF lors du chauffage [95]. La vascularisation tumorale est généralement plus vulnérable à la chaleur que la vascularisation saine [43,146] (rappelons qu'il n'y a aucune raison de penser que les cellules tumorales soient intrinsèquement plus sensibles que les cellules saines, notamment celles dont elles dérivent). En cas de stase, les effets dégénératifs apparaissent remarquablement dose-dépendants. Ces effets dégénératifs sont aussi possiblement associés à une diminution du seuil toxique pour la chaleur et seraient préférentiellement dirigés contre les cellules endothéliales en prolifération. Le contraste avec la vascularisation des tissus sains, épargnée jusqu'à 45-47°C, suggère une résistance générale de leurs cellules endothéliales à la chaleur mais aussi un effet refroidissant protecteur du sang circulant dans leur lumen, qui plus est, toujours accru dans ces conditions de température (facteur 10 à 15). Au sujet de l'endommagement vasculaire, il doit être rappelé ici que les solutions de solvants organiques concentrées sont des agents sclérosants, notamment utilisés en radiologie interventionnelle [175]. Conçues pour se préserver des particularités et des variabilités associées à la tumeur, des études systématiques dans des modèles animaux reproductibles ont permis d'aborder la cinétique des changements du TBF induits par un traitement de 1 h à températures variées [176,177]. Lors du chauffage à 42.5°C, le TBF a été augmenté pendant le traitement et diminua après, pour recouvrer la valeur contrôle dans les 5 h suivantes. Le chauffage à 43.5°C a produit une augmentation initiale du TBF pendant les premières 30 min, suivie d'une réduction prononcée, en deçà des valeurs contrôles, durant le reste du traitement. Finalement, 24 h après ce traitement les valeurs contrôles n'étaient pas encore retrouvées. Pour les traitements à températures supérieures à 44.5°C, on observe une diminution immédiate du TBF, s'accroissant même après la fin du chauffage. De manière contrastante, le flux sanguin dans la vascularisation de tissus normaux recouvre ses valeurs basales plus rapidement après l'hyperthermie. Par ailleurs, lorsque les chauffages sont répétés, les vaisseaux sanguins tumoraux ont montré la capacité d'acquiescer une adaptation thermique pour les chauffages ultérieurs, qui consiste en une capacité accrue de régulation positive du flux sanguin en réponse au stress thermique. Ce phénomène a été appelé par son auteur « thermotolérance vasculaire » en référence précisément à l'observation faite que le flux sanguin dans les vaisseaux tumoraux augmente en réponse à un second chauffage, en lieu de la réduction observée lors du premier chauffage [177,178]. La thermotolérance vasculaire reste mal comprise et quelque peu spéculative [43], et surtout elle doit être distinguée absolument de la thermotolérance cellulaire [13], qui se définit, rappelons-le, en respect de la capacité accrue de résistance à la mort cellulaire induite par la chaleur. Ceci n'exclut pas que les cellules constituant les vaisseaux tumoraux puissent développer une thermotolérance cellulaire. D'autres caractéristiques des réactions tumorales à l'hyperthermie sont l'infiltration inflammatoire péri-tumorale par les leucocytes, après recrutement et extravasation, ainsi qu'un œdème interstitiel avec une pression interstitielle encore augmentée [43]. Les explications en sont la

régulation positive des molécules d'adhésion, usuellement sous-exprimées dans les cellules endothéliales tumorales [179], et des fuites en conséquence de l'augmentation générale de la perméabilité de la paroi vasculaire, qui est due à un réarrangement des fibres de stress et qui est variable en fonction de la proportion de tissus connectif associé [43]. L'association de cette perméabilisation vasculaire par l'hyperthermie à celle des membranes cellulaires précédemment évoquée, nous semble d'un intérêt majeur pour les formulations pharmaceutiques visant à l'extravasation sélective dans une tumeur suivie d'une délivrance intracellulaire. Pour les considérations à venir qui concernent plus précisément les effets de la chaleur sur les tissus tumoraux, l'importance respective de facteurs très intriqués: flux sanguin, métabolisme, oxygène et pH, est toujours ouverte au débat. Les caractéristiques basales de la tumeur à relever, du moins pour certaines zones cruciales, sont l'acidose, la restriction en substrat, l'accumulation de déchets métaboliques, la déplétion énergétique et l'hypoxie. Le rôle de l'hypoxie, dans le sens général de la définition physiopathologique [123] (non simplifiée en terme de pression partielle en oxygène), est fondamentale dans l'altération fonctionnelle du métabolisme tumoral qui caractérise et fait la tumeur. Ça l'est encore plus pour comprendre la thermosensibilisation. Une anomalie métabolique surprenante des cellules cancéreuses, ayant cours exclusivement au sein du microenvironnement tumoral, est leur capacité à métaboliser les carbohydrates principalement par la voie anaérobie stricte et ce même en aérobie [43]. Ce comportement métabolique est le fruit de l'adaptation à l'hypoxie et de la régulation positive *HIF1*-dépendante de nombreuses enzymes impliquées dans les réactions intermédiaires de la glycolyse (discutées précédemment en détail, voir page 13). Ainsi, de nombreux déchets métaboliques acides: acide acétoacétique, β -hydroxybutyrate, acide lactique et H^+ , s'accumulent-ils dans de larges zones d'interstitium tumoral mal drainées, desquels sont d'ailleurs observés en histologie les précipités caractéristiques [43,44]. Le taux de lactate intratumoral médian augmente notablement avec la taille tumorale, la fraction de cellules hypoxiques s'élève. Des pH_e de 5.7 à 7.6 peuvent alors être observés, la valeur physiologique étant 6.8 [43,44,180]. L'acidification cytosolique est un trait commun associé à l'hypoxie aiguë [123], mais les cellules adaptées à l'hypoxie chronique montrent, elles, une adaptation régulatrice intracellulaire du pH_i pour rejoindre les valeurs physiologiques. Pour partie, l'acidose dans les tumeurs contribuerait à la mort cellulaire spontanée à l'état basal (c'est-à-dire en l'absence de thérapie) [44]. Les capacités de régulation de l'homéostasie des ions H^+ différenciant profondément tumeur et tissus sains, le gradient de pH entre pH_e et pH_i doit être considéré comme la caractéristique biochimique la plus spécifique pour distinguer les tissus sains et tumoraux [181]. En règle générale, dans les tissus tumoraux $pH_i > pH_e$ alors que dans les tissus sains, $pH_i < pH_e$. Les conditions acides sont connues pour augmenter le délai et diminuer l'amplitude de la thermotolérance, ce qui est profitable pour l'hyperthermie [95]. Rappelons des études de survie *in vitro* et *ex vivo* précédemment traitées qu'un pH acide peut augmenter le thermosensibilité. Ceci apparaît spécialement quand les changements sont aigus, par opposition à l'acidification chronique tumorale et l'adaptation des cellules en lien qui rétablit les valeurs plus faibles de thermosensibilité de l'état basal. Ajoutons que, *in vivo*, les mécanismes de thermosensibilisation sont plus complexes [43]. Une remarquable réponse, commune à de nombreux traitements par hyperthermie locale, consiste en l'acidification de la tumeur pendant et après le traitement, indépendamment des effets de ce traitement hyperthermique sur le TBF et l'oxygénation tissulaire, et indépendamment de la dose et de l'intervalle de température. Cet effet est en fait même plus prononcé pour des intervalles de température faibles, correspondant à l'hyperthermie douce (« mild hyperthermia », entre 38 et 42°C) par contraste avec les intervalles de températures plus élevées correspondants à l'hyperthermie modérée (« moderate hyperthermia », entre 42 et 46°C) [43]. De plus, la diminution maximale de pH après la fin de traitement s'observe après un délai de 5 h [95]. C'est exactement de l'ordre du délai déjà discuté à propos de la thermosensibilisation. Ceci explique l'avantage observé, notamment

en termes de thermotolérance, de séquences de traitement avec fractionnement de dose spécifiquement adaptées. Ces considérations étant si centrales pour comprendre les bases de l'hyperthermie constatées *in vivo* et en clinique, qu'elles doivent être approfondies, quand bien même ces constatations bousculent les certitudes. À côté d'importants effets favorables par limitation de la dissipation de chaleur, quand l'hyperthermie cause une diminution du TBF, c'est-à-dire grossièrement pour des températures relativement élevées, du domaine de l'hyperthermie modérée, on pense que l'intensification de l'endommagement thermique repose sur la diminution du pH_e et/ou pH_i , qui se superpose avec la répartition des zones hypoxiques (les zones en hypoxie chronique plus les zones adjacentes en hypoxie aiguë qui grossissent au cours de ce traitement) et des zones de destruction tissulaire tumorale, principalement par nécrose, les deux contribuant plus en avant à l'acidification aiguë de la tumeur [43]. Quand l'hyperthermie entraîne l'augmentation du TBF, disons, à titre indicatif, pour des traitements correspondants à l'hyperthermie douce, l'apport en oxygène et en nutriment augmente, ainsi que la fraction d'oxygène dissoute, réalisant une oxygénation tumorale, spécifiquement des zones préalablement hypoxiques. Cette propriété de l'hyperthermie douce a été très souvent constatée. Alors, la levée lors de l'hyperthermie des limitations qu'exercent les trop faibles pO_2 intratumorales à l'état basale sur la respiration, sur la phosphorylation oxydative et finalement sur le catabolisme glycolytique dérégulé (le catabolisme physiologique n'étant intrinsèquement inhibé que pour des températures plus élevées), aboutit *in fine* à une production de déchets acides très élevée dans les conditions hyperthermiques [44]. Les catabolites acides sont dans la mesure du possible excrétés par les cellules. Mais du fait du drainage anormal de l'interstitium tumoral profond, même en présence d'un flux sanguin tumoral élevé (*nota bene*: le volume d'interstitium augmente en réponse à l'hyperthermie), le taux de lactate interstitiel se retrouve très élevé et explique en bonne part la diminution du pH_e [4,43,44,146]. Un accroissement du ratio lactate/pyruvate général reflète une acidification intracellulaire [4]. La phase aiguë de diminution du pH_e et/ou du pH_i , concomitante précisément avec le traitement hyperthermique, pourrait expliquer spécifiquement le thermosensibilisation des tumeurs *in vivo* lors d'une exposition simple à la chaleur, alors que par opposition aucune thermosensibilisation est observée pour des modèles *in vitro* ou des modèles *in vivo* de tumeur sans aucun flux sanguin [92]. Il est encore à noter qu'une augmentation d'oxygénation plus élevée se couplera avec l'augmentation des dégâts occasionnés par les radiations ionisantes, mais il doit être remarqué que l'oxygénation en lien avec la perfusion sanguine est souvent plus élevée dans les tissus normaux, abolissant tout gain thérapeutique par préservation des tissus sains que l'on aurait pu espérer (les séquences où l'hyperthermie suit les radiations sont de ce fait préférables, les radiations permettant d'ailleurs une possible thermosensibilisation par endommagement vasculaire) [6,95]. Sans rentrer trop dans le détail des altérations métaboliques induites par la chaleur, qui prennent cependant une importance grandissante, il faut citer le rôle central des nucléotides triphosphates, spécialement de l'ATP. La concentration intratumorale d'ATP chute immédiatement lors du chauffage, atteignant son nadir 12 h après traitement [44]. Par ailleurs, une inhibition de l'angiogenèse, effet antitumoral indirect d'un traitement hyperthermique, a été démontrée et est attribuable à l'induction par la chaleur de l'inactivation de l'activateur de l'inhibiteur du plasminogène: « Plasminogen Inhibitor Activator I » (PAI-I), ou plus justement nommé: serpin peptidase inhibitor 1 SERPINE-1. Ceci contrecarre *in fine* la formation de plasmine et la fibrinolyse subséquente des nombreux caillots sanguins, caillots qui favorisent l'angiogenèse [182]. Finalement, au sujet des perturbations de l'hémostase, de la thrombolyse et de la fibrinolyse induites par la chaleur, il doit être attendu des interactions avec les formulations pharmaceutiques qui relarguent transitoirement des solvants organiques, et donc génère un état d'hypocoagulabilité, comme c'est connu pour l'éthanol [183,184].

L'hyperthermie est connue pour son action radiosensibilisante, très remarquable au niveau cellulaire [185-187]. Ceci est mis à profit de façon toujours plus adaptée avec la meilleure compréhension des effets de la chaleur, et l'adaptation adéquate des séquences de thermoradiothérapie pour favoriser cette combinaison d'effets. Un des effets de la chaleur qui se prête à une adaptation de séquence facile avec la radiothérapie est l'inhibition des mécanismes de réparation de l'ADN. Les bases moléculaires de ce mécanisme ne sont pas encore entièrement comprises mais génèrent un intérêt

Tableau 1: Influence du pH et de la température sur l'activité de chimiotoxiques

| conditions de température | 37°C | | | Hyperthermie | | | |
|---|------|-------|---------|--------------|-------|---------|------|
| | pH | < 7,0 | 7,0-7,4 | >7,4 | < 7,0 | 7,0-7,4 | >7,4 |
| Composés: | | | | | | | |
| Cyclophosphamide | | ++ | + | | | | |
| 4-hydroxyperocyclophosphamide | | ++ | + | | | | |
| Mafosamide | | ++ | + | | | | |
| Meclorethamine | | ++ | + | | | | |
| Melphalan | | ++ | + | | | | |
| Chlorambucil | | ++ | - | | | | |
| Nor-Moutarde azotée | | ++ | + | | | | |
| Ifosfamide | | + | + | | | | |
| Triéthylènemélamine | | ++ | + | | | | |
| Thiophosphamide | | ++ | + | | | | |
| Méthylméthane sulfonate (MMS) | | + | + | + | +++ | ++ | |
| Bis-chloroéthylnitrosourée (BCNU) | | + | + | + | ++++ | ++ | + |
| Cyclohexylchloroéthyle-nitrosourée (CCNU) | | + | ++ | | | | |
| Thiotepa | | ++ | + | | | | |
| Méthotrexate | | + | + | + | ++ | + | + |
| 5-fluorouracil | | ++ | + | | | | |
| Bléomycine | | + | + | + | ++++ | ++ | + |
| Mitomycine C | | ++ | + | | | | |
| Amphotéricine B | | + | + | + | +++ | ++ | +++ |
| Doxorubicine | | + | ++ | | | | |
| Mitoxantrone | | + | ++ | | | | |
| Vinblastine | | + | ++ | | | | |
| PtCl ₂ (Fastblack) | | ++ | + | | +++ | ++ | |
| Cisplatine | | +++ | + | | ++++ | ++ | + |
| 1,2-diamono-r-nitrobenzène)dichloroplatine(II) (Plato) | | + | + | | + | ++ | |
| trans-bis(2-amino-5-nitrothiazole)dichloroplatine(II) (Plant) | | ++ | + | | ++ | + | |
| Paclitaxel | | + | + | | + | ++ | |

Légende: Ce tableau présente comment les variations de pH et de température peuvent moduler l'activité d'agents chimiotoxiques divers. Il doit être rappelé que ces paramètres varient au sein de la tumeur selon les régions de sa microstructure, le compartiment considéré: intra- ou extracellulaire, sachant que l'hyperthermie permet encore leur modulation. Aussi, certaines variations au niveau subcellulaire doivent être prise en compte. Par exemple, une explication de certaine formes de résistance à la doxorubicine, une drogue basique, impliquerait son confinement dans les vésicules acides de la cellule tumorale.

En vue du traitement des régions acides, avec le méthylméthane sulfonate (MMS), le bis-chloroéthylnitrosourée (BCNU), la bléomycine et l'amphotéricine B, il est possible d'attendre un bénéfice de l'ajout de l'hyperthermie. Aussi, ces principes actifs seraient particulièrement indiqués pour les intégrer dans des formulations capables de générer une hyperthermie modérée. Adapté de la référence [194].

grandissant [6,188]. La plupart des protocoles de thérapie combinant radiations et hyperthermie se base sur la modulation positive de l'oxygénation tumorale avec recherche d'une amélioration des ratios d'oxygénation entre tissus sain et tumeur, pour accroître l'index thérapeutique des radiations

ionisantes. Pour les radiations externes, en conditions hyperthermiques, les modulations des flux sanguins et leur cinétique différentielle entre tumeur et tissus sains reposent alors spécifiquement sur le choix de la séquence pour obtenir un gain thérapeutique avec non seulement des effets additifs maximaux mais aussi de possibles effets synergiques [189-191]. La thermotolérance vasculaire peut apparaître avantageuse au niveau tumoral, en prolongeant l'intervalle de dose thermique pour lequel l'on observe une augmentation du TBF en repoussant l'occurrence de la stase sanguine et de la diminution du TBF. Dans l'option de traitements confinés à la lésion, l'association avec la brachytherapie apparaît la plus indiquée, mais les possibilités d'adaptation de séquence et de fractionnement sont plus restreintes, même si l'invasivité de ces techniques est en constante minimisation [192,193]. D'autres combinaisons de l'hyperthermie avec la chimiothérapie, appelées thermochimiothérapies, peuvent être très avantageuses pour certains chimiotoxiques [10,147]. Pour la thermochimiothérapie, la combinaison d'effets avec la chaleur est bien plus complexe et moins connue, et fonction de nombreux paramètres, bien diversement influencés par l'hyperthermie, comme le pH, le métabolisme tumoral et celui des chimiotoxiques, ainsi que les paramètres pharmacodynamiques et pharmacocinétiques pour lesquels la prédiction est difficile. L'influence du pH est cruciale pour de nombreux principes actifs (Tableau 1) [194]. En ce qui concerne la photochimiothérapie ou thérapie photo-dynamique, qui combine les dépendances au taux d'oxygène avec la dépendance du photosensibilisateur aux paramètres pharmacodynamiques et pharmacocinétiques, on peut obtenir une des plus importantes et prééminentes synergies avec l'hyperthermie, qui est d'ailleurs souvent intrinsèquement générée par l'appareillage [44,195,196]. Finalement, l'hyperthermie peut se révéler très utile en clinique face au problème des zones tumorales hypoxiques qui sont à l'origine d'échecs de nombreux traitements et de rechutes. Ainsi, pour les zones tumorales hypoxiques qui échappent encore au traitement hyperthermique ou à d'autres méthodes d'oxygénation des tumeurs [197,198], les toxines dites hypoxiques sont actuellement d'un grand intérêt [199,200]. Leur sélectivité repose sur le fait qu'après internalisation, leur conversion métabolique intracellulaire en forme active n'est possible que en conditions réductrices, soit lors du manque en oxygène, que l'hypoxie engendre. Remarquons que la tirapazine, une cytotoxine hypoxique bien établie, voit ses effets inhibés en présence de DMSO, qui est utilisé comme piègeur de ROS, dans des études s'intéressant à décomposer les mécanismes moléculaires sous-jacents [199]. Réciproquement, des méthodes de modulation des paramètres physiologiques et/ou du microenvironnement tumoral ont été conçues plus récemment comme adjuvant de l'hyperthermie. Les manipulations systémiques du flux sanguin ont ainsi donné de bons résultats [201]. Il convient aussi de présenter les techniques locales de manipulation du flux sanguin qui intéressent des formulations pharmaceutiques présentées ci-après. Les procédures de clampage, qui stoppent l'irrigation sanguine de la tumeur, ont démontré une diminution profitable de la dose iso-effet (EM43) de traitements hyperthermiques. Les tumeurs ainsi traitées apparaissent plus sensibles à la chaleur, grossièrement d'un facteur 2. L'observation de la disparition de la transition à 42.5°C en représentation d'Arrhenius suggère que le développement de thermotolérance est empêché [43,202]. En termes de réponse tumorale complète et définitive, un délai de 60 min entre le clampage et le chauffage subséquent apparût être plus bénéfique que 30 min. Par opposition, aucune réponse complète et définitive ne put être observée lorsque le chauffage a été appliqué immédiatement avant le clampage ou après le retrait du clamp. Lorsque le clampage n'est pas envisageable, des résultats similaires ont pu être obtenus avec l'embolisation, une technique alternative de choix que nous détaillerons dans le paragraphe 3.

L'interaction des HSFs avec d'autres facteurs de transcription explique les régulations complexes de la réponse au choc thermique (voir page 23) [97,121]. L'activation de HSF1 par le facteur de transcription NF-IL6, associé à la production d'IL-6, ou avec le facteur de transcription STAT1 par opposition à STAT3, tous deux associés à la production d'INF- γ , expliquerait la capacité de la chaleur à induire la sécrétion de ces deux cytokines [203]. Par contre, les facteurs de transcription HSFs peuvent inhiber la translocation nucléaire activatrice du facteur de transcription NF- κ B [204], qui régule la transcription de plusieurs cytokines et chemokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 et IL-8). Ceci est réversible 6 h après le choc thermique, en concordance avec le retour des HSFs (principalement HSF1) dans leur état inactif. NF- κ B étant central dans les processus inflammatoires [205,206], la plupart des effets protecteurs anti-inflammatoires documentés pour être associés avec les gènes de la réponse au choc thermique peuvent être reliés à cet effet anti-inflammatoire des HSFs activés soit par des composés chimiques, soit par des facteurs stressants, incluant l'hyperthermie elle-même [129]. Par ailleurs, les HSPs, notamment HSPA8 et/ou HSPA1A et HSPA1B (HSC70 et/ou isoformes de HSP70), se conçoivent à présent comme d'incontournables pivots intracellulaires et extracellulaires dans la biologie des cellules cancéreuses [157,207], dans la réponse immunitaire, notamment anti-tumorale [208], ainsi que dans les pathologies inflammatoires, neurodégénératives [209], ou dans le rejet de greffe [210]. Les HSPs apparaissent de plus en plus utiles comme marqueurs thérapeutiques, en tant que cibles pharmacologiques et immunoadjuvants [211]. L'augmentation des concentrations de HSPs a aussi un certain degré de corrélation avec des traits pathologiques [97]. Les HSPs sont impliquées dans des contextes physiopathologiques distincts: inflammatoire, auto-immunitaire ou cancéreux. Les pathologies inflammatoires telles que l'asthme reposent sur une présentation d'antigène trop importante. Dans ces circonstances, l'aspect pro-inflammatoire qui est associé avec les HSPs, apparaît en fait plus comme une conséquence de concentrations cellulaires élevées en HSPs qui augmentent la viabilité des cellules impliquées dans la dérégulation délétère de la réponse immunitaire et l'entretien du processus inflammatoire. Au contraire, dans le contexte de pathologies cancéreuses, qui intéressent plus directement l'hyperthermie, les tumeurs sont certainement inflammatoires, mais un échappement de la tumeur au système immunitaire est une constante de la physiopathologie tumorale. Des taux élevés de HSPs et des localisations inattendues à la surface externe de la membrane plasmique sont de très notables caractéristiques des cellules cancéreuses [129]. Il a été mis en évidence que la plupart des lymphocytes infiltrant la tumeur, les TIL (« tumor infiltrating lymphocytes »), sont en fait dirigés contre HSPA1A (HSP70, l'isoforme canoniquement induite par la chaleur). Aussi, l'expression basale de HSPA1A (HSP70) à la surface des cellules tumorales est capable d'induire une réponse immunitaire non spécifique impliquant une lyse cellulaire MHC-indépendante par les cellules lymphocytaires à TcR $\gamma\delta$ et/ou NK, toutes deux non MHC-restreintes. La mort cellulaire programmée déclenchée par les cellules NK implique la production de granzymes ou la voie du Fas-ligand, et ceci a été démontré comme indépendant des concentrations cellulaires en HSPs, alors que les mécanismes apoptotiques peuvent être affectés, comme nous l'avons déjà discuté. Comme il en va de HSPA8 (HSC70; HSC71; HSP71; HSP73) et de nombreuses autres HSPs, les isoformes HSPA1A (HSP70-1; HSP72; HSPA1) et HSPA1B (HSP70-2) ne présentent pas de séquence d'adressage hydrophobe, nécessaire pour adresser les protéines à la membrane plasmique, et les mécanismes de leur localisation à la surface extracellulaire sont mal connus [129]. Ce phénomène doit être néanmoins potentialisé par l'hyperthermie au travers de l'induction ou de la régulation positive des HSPs et au travers de la cytotoxicité et des altérations de la morphologie des

membranes et de la structure et localisation des protéines induites par la chaleur. Un mécanisme controversé de la relocalisation des HSPs au niveau membranaire extracellulaire, attribué à la mort cellulaire et à la rupture membranaire [212], pourrait être considérablement favorisé lors de l'hyperthermie. En conjonction avec l'induction de HSPs, ce mécanisme pourrait être d'autant plus potentialisé si des élévations focales de température supérieures au seuil directement cytotoxique sont atteintes durant un traitement hyperthermique local. Par ailleurs, les interactions des HSPs du groupe HSPA (HSPs du groupe des HSP70) avec les protéines normales ou aberrantes se révèlent un aspect moléculaire unificateur de l'arrimage des protéines à la membrane [129]. Dans le contexte de la thérapeutique du cancer, un bénéfice potentiel des HSPs extracellulaires réside dans leur étonnante capacité à lier des peptides pour former un complexe qui peut très efficacement déclencher une réponse immunitaire. Les complexes peptides-HSPs sont intensivement étudiés comme vaccins anti-cancer qui permettraient une réponse immunitaire spécifique non restreinte par le MHC, cf théorie de l'homonculus [213]. Ceci revêt finalement une importance toute particulière pour le traitement hyperthermique du cancer, étant donné les importantes modulations de la réponse immunitaire contre les tumeurs qu'elle peut produire et qui en expliqueraient les effets indirects et l'avènement de son efficacité anti-tumorale.

1.2 Technologie de l'hyperthermie induite, modalités diverses et d'induction magnétique

1.2.1 Les diverses modalités physiques pour induire une hyperthermie

L'hyperthermie corporelle totale (WBH) est généralement réalisée grâce à des enveloppes en contact avec la surface corporelle ou des bains chauffants. L'hyperthermie régionale se base le plus souvent sur des perfusions chauffées ou sur l'interaction, au niveau de la partie du corps concernée, des molécules avec des radiations électromagnétiques non-ionisante (EM), telles que: les radiofréquences (RF, de l'ordre de quelques centaines de kilohertz à quelques megahertz), les microondes (« microwaves »: MW, de l'ordre de centaines de megahertz à 10 gigahertz approximativement) ou les ultrasons (US) [135]. L'interaction des composantes électrique et/ou magnétique des radiations électromagnétiques avec les tissus corporels dépose de l'énergie qui se transformera *in fine* en chaleur, c'est-à-dire en énergie cinétique emmagasinée au niveau moléculaire. Cet effet thermique nécessite l'exposition à des champs électromagnétiques (« electromagnetic field » (EMF) élevés, et s'associe alors aux effets biologiques significatifs de la chaleur que l'on recherche. Les effets biologiques plus marginaux, associés avec des modes dits athermiques et non-thermiques, spécifiquement observés pour des expositions de bas grade, sont le sujet de débats passionnés mais peu clairs menés pour la protection environnementale de sujets exposés [135,214]. Pour des fréquences inférieures à 1 MHz, le mécanisme d'action dominant des EMF repose sur l'induction de courants électriques dans le corps. Un effet potentiel des EMF à basse fréquence, qui repose sur l'induction magnétique, pourrait être relié à leur capacité de générer des courants de Foucault (« eddy currents » en anglais) au niveau de la membrane cellulaire et dans les fluides tissulaires (voir galvanothérapie) [135]. Les réserves généralement émises à l'endroit des modalités basées sur les radiations EM et les ultrasons sont qu'elles se prêtent mal au confinement de la déposition de chaleur dans le volume de tissus ciblé et qu'elles peuvent difficilement atteindre des sites profonds dans le corps humain. L'utilisation des EMFs est limitée par des effets inductifs indésirables (points chauds, brûlure en surface corporelle, phénomène s'amplifiant pour de plus larges rayons corporels) [86]. Les anciens dispositifs à source simple pour la génération de RF, MW et US (datant de 1980) ont évolué vers des dispositifs plus complexes à sources multiples, avec

lesquelles on peut générer des interférences constructives précisément dans un espace plus confiné. Certains appareillages sont déjà utilisés ou en fin de développement.

Les approches alternatives capables de confiner la déposition d'énergie produite par une source externe font usage de matériaux implantables ou injectables spécifiques. Les microbulles d'air ou de gaz, déjà utilisées comme agent de contraste pour échographie, peuvent être utiles pour déposer l'énergie véhiculée par les US en réalisant leur cavitation [215]. Des nanoparticules d'or peuvent améliorer la conversion en chaleur des énergies associées aux RF et à la photochimiothérapie [216]. La déposition d'énergie peut être rendue plus efficace par des matériaux ferro- et ferrimagnétiques qui concentrent le flux magnétique, bien plus que ne le peuvent les tissus corporels qui sont paramagnétiques, pour des sources externes basées sur des champs électromagnétique EMF, mais alors aussi basées sur des champs purement magnétiques alternatifs, AMF (« alternative magnetic fields ») ou rotatifs, qui peuvent être très avantageux par rapport aux EMFs [217]. Cette technique est souvent dénommée hyperthermie induite magnétiquement ou à médiation magnétique (« magnetically induced or mediated hyperthermia »). Lors de l'application clinique de l'hyperthermie à médiation magnétique, les effets indésirables des AMFs, brûlures des couches graisseuses externes et points chauds, sont à associer aux champs électriques magnétiquement induits et les courants électriques qui s'y rapportent et sont fonction de la physiologie du patient. En première approche, la densité de courant ainsi induit peut être considérée comme proportionnelle au produit de l'amplitude du champ magnétique H et de la fréquence f . Le produit $H \cdot f$ est généralement considéré comme le plus prédictif de ces effets indésirables. En situation clinique, quand les AMFs ont été appliqués pour le traitement de tumeur de prostate chez l'homme, des valeurs de $5 \cdot 10^8 \text{ A} \cdot (\text{m} \cdot \text{s})^{-1}$ ont été associées avec des points chauds localisés dans le pli pelvien, qui est anatomiquement particulièrement sensible [218-221]. Dans d'autres zones anatomiques, des valeurs supérieures, de $13.5 \cdot 10^8 \text{ A} \cdot (\text{m} \cdot \text{s})^{-1}$, ont pu être appliquées cliniquement, pour le traitement de glioblastomes par exposition crânienne, sans engendrer d'effets indésirables [220,222]. Des valeurs encore plus élevées ont été appliquées dans un contexte expérimental moins pertinent: chez la souris ou *ex vivo* [223,224]. Ces limites sont importantes pour considérer le potentiel de formulations à l'aune du traitement hyperthermique que l'on peut envisager en clinique. Accessoirement, des valeurs expérimentales de $H \cdot f$ élevées ($81 \cdot 10^8 \text{ A} \cdot (\text{m} \cdot \text{s})^{-1}$), chez la souris, ont pu être atteintes sous la forme de pulses de très haute amplitude, sans générer d'effets indésirables [225].

1.2.2 Modalités inductives pour l'hyperthermie induite

Les premières approches inductives ont été basées sur l'échauffement par effet Joule de courants de Foucault induits dans un conducteur métallique par la composante magnétique d'un champ électromagnétique externe (EMF). Ceci a été appliqué à des éléments métalliques utilisés pour une autre indication (éléments orthopédiques, stents par exemple), puis à des matériaux conçus spécifiquement à cette fin, les thermosources métalliques, plus connus sous le nom anglais: « thermoseeds » [226]. Les céramiques et verres, déjà utilisés en chirurgie orthopédique, peuvent par incorporation de constituants métalliques acquérir la capacité d'être chauffés par induction. Ceci apparaît particulièrement utile pour une meilleure prise en charge de pathologies néoplasiques de l'os. Des baguettes implantables ont aussi été développées pour être indiquées dans le traitement hyperthermique de pathologies tumorales de tissus mous. *In situ*, une thermosource agit comme une source de chaleur focalisée, atteignant rapidement de très hautes températures, ce qui s'associe avec un gradient élevé de température dans les tissus environnants. Dès lors, un nombre adéquate de

thermosources dans une disposition *ad hoc* doit être inséré pour obtenir un chauffage homogène du volume tissulaire à traiter. La limite de cette approche consiste en le peu de contrôle de la distribution de la chaleur, avec des points sous-chauffés et d'autres surchauffés. Des matériaux magnétiques ont alors été développés spécifiquement pour l'induction par EMF, ou par AMF de basses fréquences [217,227,228]. Parmi ceux-ci, les oxydes de fer ferro- et ferrimagnétiques (maghémite et magnétite) sont reconnus comme les matériaux les plus biocompatibles. De plus, le développement d'appareillages générateurs d'AMF validés pour usage clinique, au même titre que les générateurs d'EMF haute fréquence déjà établis, permet de bénéficier de l'avantage des AMFs (champs purement magnétiques) qui permettent d'atteindre des localisations anatomiques plus internes, sans trop d'effets indésirables. Aussi, les champs AMF ne donnent pas lieu à l'induction de courants indésirables aux interfaces des tissus ou organes, qui limitent souvent l'application d'EMFs. Le processus de magnétisation de tout matériau, et plus particulièrement les matériaux magnétiques qui nous intéressent, dépend de sa perméabilité magnétique, grande par définition pour les matériaux magnétiques, mais qui dépend par ailleurs de la température. Pour un matériau ferro- ou ferrimagnétique, au-delà d'une température spécifique, dite point de Curie (ou température de Néel), correspondant au seuil d'énergie thermique nécessaire pour vaincre l'énergie interne liée au réseau cristallin qui organise les spins, la perméabilité du matériau magnétique, auparavant élevée, tombe à une valeur très faible, similaire à celle d'un matériau paramagnétique. La magnétisation et les interactions magnétiques sont annihilées, et la dissipation de chaleur est impossible. Ceci s'observe pour les matériaux magnétiques communs à haute température, par exemple, l'hématite, la magnétite et la maghémite ont un point de Curie à 956, 850 et 820 – 986 °C, respectivement. Mais pour certains alliages le point de Curie peut être diminué à plus basse température en fonction de la composition. Les thermosources auto-régulées (« self-regulating thermoseeds ») ont été développées sur ce principe pour une application clinique. Ces thermosources sont constituées d'alliages spécifiques, présentant un point Curie correspondant à la température désirée que l'on ne souhaite pas excéder [229,230]. Les alliages contenant du baryum sont préférés à cette fin. Bien qu'il soit utilisé chez l'homme de par sa faible solubilité comme agent de contraste gastro-intestinal baryté, le baryum reste toxique pour une utilisation parentérale.

Traisons à présent plus en détail des interactions magnétiques dans un AMF et considérerons les interactions magnétiques aux niveaux mésoscopique et microscopique sur lesquelles reposent les mécanismes de chauffage. L'observation de différents échantillons de matériaux magnétiques, notamment les matériaux ferri- ou ferromagnétiques, en l'absence de champ magnétique, révèle des régions à magnétisation uniforme. Elles sont appelées domaines magnétiques et ont une orientation et une proportion aléatoire [231]. La meilleure description physique fait appel à la mécanique statistique [231]. Un domaine dans le réseau cristallin est représenté par une population de dipôles moléculaires avec une orientation isotrope d'une taille finie, délimité par une population frontière de dipôles moléculaires avec une orientation anisotropique, dénommée paroi de domaine magnétique ou « domain wall » [231]. Au niveau macroscopique, la résultante magnétique de la disposition aléatoire des différents domaines magnétiques peut très bien être nulle, et donc la magnétisation globale résultante être nulle. Un domaine isolé, appelé domaine simple, ou « single-domain », n'est possible que pour une taille inférieure à celle permettant aux parois de domaines de se former, sous entre autre influences celle de la composition de la maille cristalline [217]. Au-delà de cette taille critique, les parois de domaine magnétiques divisent le réseau cristallin en structure à multiples domaines (« multi-domain »). Aussi les matériaux ferri- et ferromagnétiques doivent-ils être distingués au niveau mésoscopique selon leur structure à domaines multiples ou à domaines simples, ce qui modifie grandement le processus de magnétisation en condition de champs magnétiques statiques et dynamiques. En conséquence, les mécanismes de pertes ou dissipations de

chaleur par stimulation magnétique, sous-entendus mécanismes de transformation d'énergie en chaleur dans un AMF (alternatif ou rotatif), sont à considérer séparément [232].

1.2.3 Pertes de chaleur par stimulation magnétique

Pertes par hystérèse

Un matériau à microstructure présentant de multiples domaines magnétiques se caractérise par des pertes de chaleur liées aux phénomènes d'hystérèses, dites pertes par hystérèse. Le processus de magnétisation repose sur le déplacement des parois de domaines, de telle sorte que les domaines orientés préférentiellement le long de l'axe de l'induction magnétique croissent aux dépens de ceux qui ne sont pas orientés préférentiellement. Les déplacements des parois de domaines sont réalisés par la rotation de chacun des dipôles atomiques ou moléculaires constitutifs. Lorsque le champ magnétique d'induction est retiré, l'échantillon reste magnétisé ou du moins ne retourne pas à son état initialement non magnétisé. C'est le fait d'une coercibilité. Il en résulte au niveau macroscopique une magnétisation rémanente axiale. L'amplitude de cette magnétisation rémanente dépend de l'amplitude du champ magnétique d'induction jusqu'à une limite appelée saturation magnétique (M_s), caractéristique de chaque réseau ferro- et ferrimagnétique. Si la direction du champ magnétique axial d'induction est inversée, comme c'est périodiquement le cas dans un champ magnétique alternatif, AMF, le même processus de magnétisation sera alors dirigé dans la direction opposée à la magnétisation rémanente, qui diminuera en conséquence. L'amplitude du champ magnétique nécessaire pour diminuer la magnétisation macroscopique à zéro est appelée excitation coercitive (H_c). Dépassée cette amplitude d'induction magnétique, l'échantillon se remagnétise dans la même direction que l'induction actuelle et donc opposée à sa direction de magnétisation avant annulation, sur le même principe de réarrangement des parois de domaines magnétiques. Ceci définit un cycle d'hystérèse. L'hystérèse est expérimentalement le plus souvent mesurée par magnétométrie statique en boucle (certaines techniques plus difficiles à mettre en œuvre font appel à des conditions de champ magnétique dynamiques). Graphiquement (voir Figure 10 C, p 45), la courbe en boucle obtenue délimite une aire appelée aire d'hystérèse. Les paramètres caractéristiques d'une boucle d'hystérèse sont la magnétisation rémanente, l'excitation coercitive et l'aire d'hystérèse. L'aire d'hystérèse peut être reliée à un travail, en conditions de champ dynamiques, c'est-à-dire une perte énergétique, notamment sous forme de chaleur, pour laquelle on parle précisément des dites pertes par hystérèses. L'aire d'hystérèse, et donc les pertes énergétiques, dépendent ainsi de l'amplitude de l'AMF, laquelle doit être rigoureusement stipulée pour toute caractérisation. L'énergie thermique apparaît dissipée spécifiquement lors du mouvement des parois de domaines magnétiques. D'origine quantique, cette dissipation de chaleur peut être assimilée à la friction des orbitales qu'elle occasionne la réorientation des dipôles moléculaires. Bien qu'elle soit caractérisée, comprendre et modéliser plus en avant la dissipation de chaleur de systèmes aussi complexes que ceux développés pour application clinique reste un défi.

Pertes par relaxations magnétiques

Dans le cas de domaines magnétiques simples, la réorientation des dipôles moléculaires est collective, en réaction à l'induction magnétique. On peut représenter globalement ce domaine simple

comme équivalent à un unique moment magnétique. Cette représentation permet alors de bien comprendre les relaxations magnétiques d'un domaine simple après réorientation du moment magnétique. On peut ainsi expliquer deux caractéristiques étonnantes de matériaux ferri- ou ferromagnétiques qui sont constitués de domaines simples isolés et non interagissants, dans un AMF, aux fréquences et échelles de temps intéressantes les applications pour l'hyperthermie (température ambiante ou corporelle pour une fréquence jusqu'à un ou quelques MHz). Premièrement, le moment dipolaire magnétique global de chaque domaine peut se relaxer librement après retrait de l'induction magnétique, et aucune rémanence de magnétisation ou excitation coercitive n'est observée. De tels matériaux, de base ferri- ou ferromagnétique, semblent adopter un comportement pseudo-paramagnétique, que l'on appelle à ce titre superparamagnétisme. Pour les applications pharmaceutiques, ce comportement superparamagnétique présente l'avantage d'éviter des agrégations indésirables *in vivo* par suppression de la possibilité d'interactions magnétiques de rémanence. Ceci est particulièrement critique lorsque l'on considère ces particules au sein du flux sanguin. Les relaxations magnétiques sont aussi à l'origine de la capacité de dissiper de la chaleur dans un AMF, modalité qui est d'ailleurs particulièrement efficace [233]. Cela comprend en fait deux types de relaxations, celles de Néel et les relaxations Browniennes [234]. Les relaxations de Néel sont basées sur la rotation simultanée de chaque moment magnétique moléculaire appartenant au réseau statique qui forme le domaine simple, qui se réorientent de manière collective (tel le super moment unique décrit précédemment), mais dans une orientation aléatoire pour chacun des domaines simples éparpillés constituant l'échantillon. L'énergie thermique a pour origine les frictions d'orbitales déjà évoquées, et se dissipe dans l'environnement direct. Il est important de noter que les relaxations de Néel ne nécessitent aucun déplacement du domaine simple dans le maillage ou dans l'espace, si tant est que ce domaine simple corresponde à une particule libre. Par opposition, dans un environnement visqueux, et ce concernant exclusivement les matériaux particuliers, le deuxième type de relaxation, les relaxations Browniennes sont purement basées sur le déplacement du domaine simple dans son ensemble, sans faire intervenir la rotation d'aucun dipôle magnétique moléculaire ou atomique individuel. Les relaxations browniennes sont impossibles du moment que les domaines simples sont immobilisés [234]. L'énergie dissipée lors de relaxations browniennes se base quant à elle sur les frictions visqueuses dans le milieu, dont la température augmente en conséquence. L'importance des relaxations browniennes diminue lorsque le rayon hydrodynamique des particules augmente ou lorsque la viscosité du milieu augmente [235], en faveur des relaxations de Néel [236]. Les oxydes de fer magnétiques, tels que la maghémite ou la magnétite [237], sont les deux matériaux ferrimagnétiques acceptés actuellement pour usage clinique. Les particules formées d'un domaine simple, et plus exactement les particules dites mono-domaine, sont le plus souvent appelées nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétique, soit en anglais: « superparamagnetic iron oxides nanoparticles », SPIONs, terme acceptable bien qu'un peu simplificateur du point de vue du micromagnétisme. Des méthodes reproductibles de synthèse des SPIONs sont maintenant bien développées [237], mais la synthèse de dispersions de particules magnétiques mono-domaine avec une distribution de taille très étroite et contrôlée reste un défi. En pratique, cela a de fortes répercussions sur leur capacité de chauffage [238,239]. Dans le cas des SPIONs de magnétite brutes, la protonation et déprotonation des groupes oxygène de surface et l'adsorption de OH⁻ [240] expliquent les variations du potentiel zêta avec le pH (0 mV à pH=6.5, positif à pH inférieur et négatif à pH supérieur, comme c'est le cas au pH physiologique des fluides biologiques) [241]. De par leur énergie surface élevée, les SPIONs s'agglomèrent rapidement (4h) et irréversiblement, ce qui mène à la perte du superparamagnétisme par interactions dipolaires, retrouvant alors le comportement ferrimagnétique caractéristique des particules plus larges et du matériau constitutif non réduit en particules. La cytotoxicité des SPIONs brutes a été mise en évidence [242], mais peut être évitée par un revêtement de surface adéquate. Ceci montre

l'importance de recourir à des agents stabilisant et/ou à la chimie de surface pour le contrôle des interactions biologiques (voir la référence [243]). La « Food and Drug Administration », FDA, a approuvé l'utilisation clinique de SPIONS de magnétite (Fe_3O_4) avec revêtement de surface comme produit de contraste en imagerie par résonance magnétique, IRM, sous les noms commerciaux de EndodermTM, Feridex® et Resovist®. De nombreuses formulations contiennent des particules magnétiques mono-domaine pour permettre l'interaction avec des champs magnétiques statiques [244]. Si les SPIONS ne sont pas durablement piégés dans la formulation et/ou n'ont pas un revêtement durable, leur dissémination au sein du corps doit être considérée avec précautions. L'hyperthermie par fluides magnétiques, « magnetic fluid hyperthermia », MFH, est actuellement la modalité de médiation magnétique de l'hyperthermie la plus avancée, elle se base sur l'injection de dispersions aqueuses de SPIONS recouverts par le dextran (« fluide magnétique » ou « ferrofluides ») qui dissipent de la chaleur dans des conditions d'AMF bien contrôlée pour assurer une exposition humaine sûre (Mag-Force®). Cette technique, qui ne sera pas traitée ici, a été déjà abondamment décrite [220,245,246].

Comme ce sera le cas dans les sections à venir, les deux types de microstructures: à domaines simples mais aussi à domaines multiples, peuvent participer de formulations complexes pour l'hyperthermie à médiation magnétique dans la variété des situations physiopathologiques envisagée. Des céramiques, verres, céramique vitrifiées ou céramique-verre (« glass-ceramic ») et des ciments à propriétés magnétiques ont été développés en vue du traitement hyperthermique des pathologies tumorales des tissus durs. Les formulations véhiculant des particules magnétiques intéresseront l'hyperthermie à médiation magnétique principalement dans le cas de tumeurs des tissus mous, bien qu'elles soient proposées dans certaines approches pour tissus durs. Les formulations de type liposome, très étudiées pour les tumeurs dans ces deux types de tissus, seront réunies dans une dernière partie.

2 Formulations pour le traitement hyperthermique local des tumeurs des tissus durs

Verres, céramiques, céramiques vitreuses d'un côté, et ciments d'un autre, forment deux groupes de biomatériaux utilisés pour le traitement orthopédique qui peuvent être indiqués en cas de lésions tumorales [247].

Le premier groupe, verre/céramique, inclut classiquement une large variété de compositions comprenant des éléments inorganiques et non métalliques. Premièrement, ces matériaux peuvent être synthétisés par procédés thermiques. Cinq classes sont distinguées en fonction de critères microstructuraux [248]: i) les verres (la vitrification résulte du refroidissement brutal depuis l'état fondu); ii) les céramiques polycristallines moulées ou préparées par spray de plasmas (les températures sont élevées mais le temps d'exposition court); iii) les céramiques frittées en phase liquide (« liquid-phase sintered ») qui sont très résistantes; iv) les céramiques frittées en phase solide et; v) les céramiques vitreuses polycristallines. Deuxièmement, les méthodes de synthèse chimique en milieu liquide permettent de produire des verres et des céramiques très homogènes, à des températures très inférieures à la température du frittage d'éléments denses, pour obtenir une microstructure uniforme [249]. Les deux méthodes principalement utilisées sont la précipitation de suspensions colloïdales (le « spray-drying » est particulièrement efficace) et les transitions de phase « sol-gel » à température ambiante, comme dans le cas des verres sol-gel. La macroporosité et la microporosité interconnectée sont des paramètres importants pour l'ostéo-intégration [248], et des porogènes peuvent être utilisés pour introduire et contrôler les porosités, notamment la

microporosité interconnectée. Cependant, quand la porosité augmente, la résistance du matériau diminue rapidement [248]. Le matériau est souvent représenté par la composition finale du matériau après avoir subi les procédés synthétiques, que l'on appelle souvent le système de composition, parfois simplement le système. Par exemple, un système standard tel que: SiO_2 , CaO , P_2O_5 , et Na_2O , peut être obtenu par traitement thermique de composants précurseurs tels que: Na_2CO_3 , CaCO_3 , SiO_2 et CaHPO_4 . Certains systèmes de composition ont la capacité de se lier à l'os (même au tissu mou pour certains verres de composition particulière) et sont dit alors bioactifs [250] (Figure 10A, p.45&46). Ceci est bien connu des phases minérales telles que les phosphates de calcium (monetite, brushite, whitlockite, tricalcium phosphate, hydroxyapatite) et le calcium ionsilicate (Wollastonite). Dans un environnement biologique, des réactions chimiques de surface très localisées, principalement la dissolution et la précipitation en lien avec les groupes silanols et/ou les cristallites qui contiennent du calcium principalement, forment *in fine* une couche riche en hydroxyapatite, responsable de la liaison de l'implant à l'os (osteo-intégration). On sait aussi que de très petits changements dans la composition peuvent affecter dramatiquement le spectre de bioactivité. Les cations multivalents, tels que Al^{3+} , Ti^{4+} et Fe^{3+} , interfèrent avec les chaînes de réactions subtiles qui permettent finalement la bioactivité, même s'ils sont présents à l'état de traces seulement [248]. Ainsi, les composants contenant du fer doivent d'être très précautionneusement introduits dans des systèmes de composition bioactifs [251]. Seulement 3% de Fe_2O_3 en masse peuvent largement diminuer la vitesse de formation de la couche de pseudo-hydroxyapatite participant au lien avec l'os et à la bioactivité des céramiques usuelles [252]. La versatilité de ces matériaux, en fonction de la composition et des procédés de synthèse, permet une infinité de matériaux magnétiques originaux. Cependant, il reste délicat de contrôler précisément la cristallisation en phases magnétiques adéquates pour applications *in vivo*, qu'il s'agisse de phases magnétiques éprouvées comme la magnétite ou la maghémite, ou de phases magnétiques plus originales pour l'efficacité de leur capacité de chauffage. Parmi les nombreuses phases moins désirables, on peut citer l'hématite (qui est anti-ferromagnétique) et les phases mineures ou contaminantes responsables de relargage de Fe^{3+} au détriment de la bioactivité. Après le processus de synthèse, on peut retrouver le fer des oxydes précurseurs impliqué dans des phases moins désirables à l'état paramagnétique, Fe^{2+} , lorsqu'il n'a pas été exclusivement impliqué dans la formation des éléments magnétiques recherchés, que ce soit de propriétés ferrimagnétiques, ferromagnétiques ou superparamagnétiques, en fonction du volume des cristallites [253]. Historiquement, le fer a été introduit à l'état de métal, exactement comme pour les premières thermosources, ou dans des verres ou céramiques, certes biocompatibles mais non bioactifs, qui ont permis de valider l'utilité de cette modalité. Dans un AMF, ces matériaux généraient d'ailleurs des pertes de chaleur par hystérèse limitées [254]. Les améliorations constantes des systèmes de composition et des procédés de synthèse peuvent aujourd'hui rendre ces matériaux magnétiques bioactifs, par confinement de la phase magnétique constituée de cristallites d'oxydes de fer (en prévention du relargage d'ions fer), dont les caractéristiques sont bien plus contrôlées pour permettre un chauffage en AMF très efficace, au travers de pertes par hystérèse et/ou de relaxations superparamagnétiques. Les verres ou céramiques en masse sont implantés par chirurgie. L'invasivité est réduite avec leur utilisation sous forme de particules, qui peuvent être injectées dans certains espaces, montrant d'excellentes capacités d'empilement sous cisaillement (bonne injectabilité) et pouvant résister à des stresses mécaniques modérés. De plus, la forme particulière augmente l'ostéo-intégration par augmentation de la surface de contact entre implant et os [248]. Ici, les méthodes de chimie en solution apparaissent plus appropriées que le broyage pour obtenir des particules de distribution de taille définie et contrôlée (notamment par spray drying) [249]. Le potentiel des matrices de céramiques et de verres formulées sous forme de microsphères est aussi étudié [255]. Elles peuvent être aussi mixées avec une phase organique, comme dans le cas des organoapatites,

conçues pour reproduire certains aspects de la matrice osseuse naturelle [249]. La plupart de ces matériaux ont été étudiés comme système de délivrance de principes actifs [256], mais peu pour la délivrance locale de chaleur pour l'hyperthermie à médiation magnétique. Les matériaux biphasés céramique/verre pour hyperthermie magnétique, sous forme de pièces implantables ou sous forme de particules, sont rassemblés synthétiquement dans la Figure 10 (p.45&46) et discutés dans les deux prochaines sections.

Les ciments injectables, qui forment un deuxième groupe, permettent une injection d'invasivité réduite dans l'os ou les tumeurs osseuses, avec des propriétés d'ostéo-induction. Ils seront l'objet du troisième et dernier paragraphe concernant les formulations pour le traitement hyperthermique local des tumeurs des tissus durs.

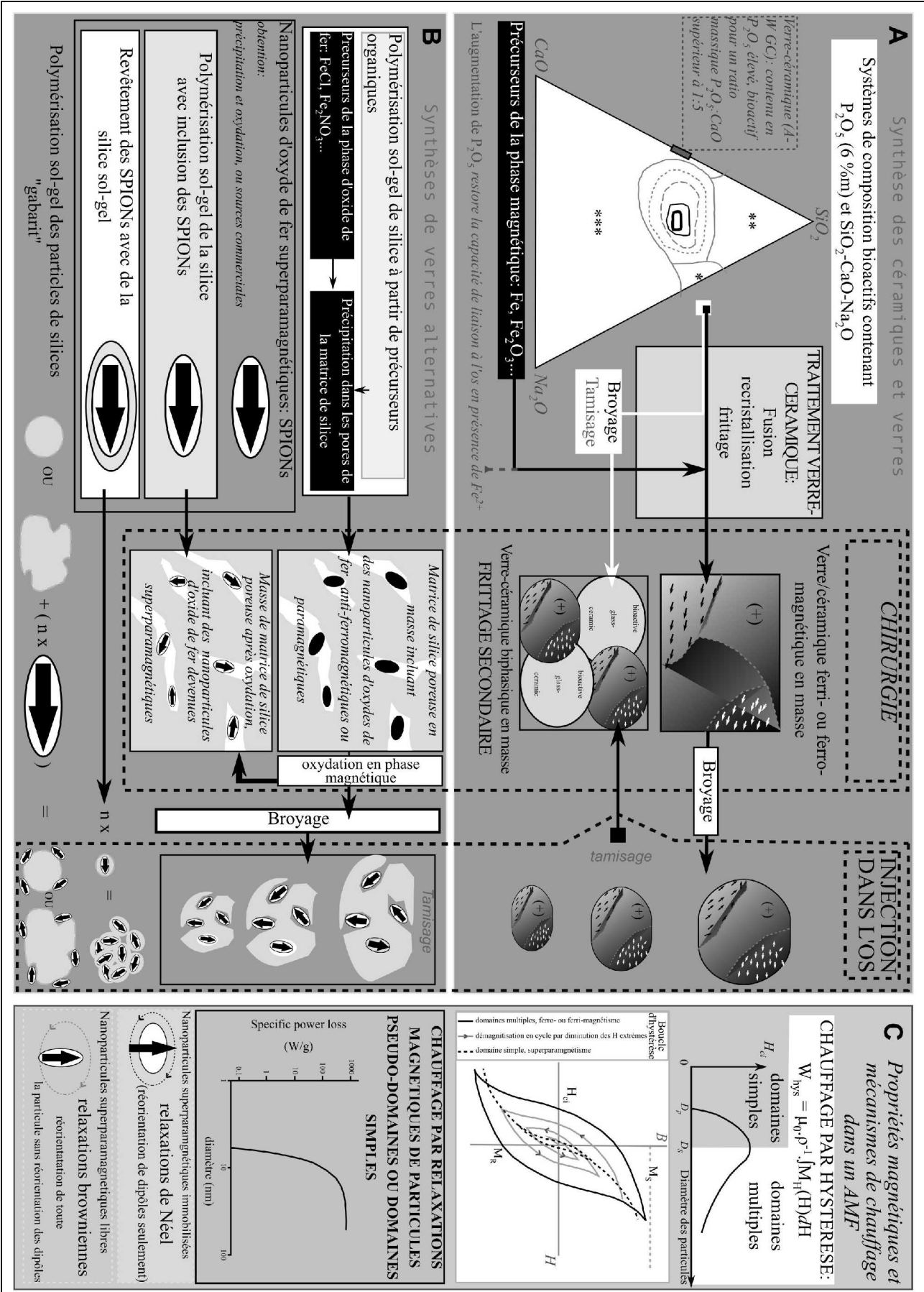


Figure 10, titre et légende ci-contre

Figure 10 (ci-contre): Fabrication, microstructure et propriétés magnétiques des verres, des céramiques, et des composites verres-céramique, en masse ou sous forme particulière, indiqués pour le traitement de tumeur solides par hyperthermie locale magnétiquement induite.

Cadre A. En haut, à droite: Diagramme ternaire illustrant l'influence de la composition dans le système $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2$, incluant une proportion quaternaire fixée à 6 % de P_2O_5 en masse, sur les capacités de liaisons à l'os et aux tissus mous, c'est-à-dire une approche de la bioactivité (adapté de [247]); et schéma de fabrication de matériaux dérivés à propriétés magnétiques intéressants, que ce soit en masse, sous forme de particules et sous forme composite.

Les courbes en cercle du diagramme ternaire correspondent aux courbes à iso-index de bioactivité (I_b). La courbe en ligne continue grise correspond à limite pour observer une bioactivité ($I_b = 0$), limitant donc l'ensemble des systèmes bioactifs. La ligne grise pointillée correspond à $I_b = 2$. La ligne grise en tirets correspond à $I_b = 5$. La ligne noire fine correspond à $I_b = 8$, ce qui est assez élevé pour permettre la liaison aux tissus mous. La ligne noire épaisse correspond à $I_b = 10$. La signification des régions du diagramme ternaire marquées par étoile est: *) verres résorbés en 10 jours (leur bioactivité se limite à un type I ou II, c'est-à-dire à une hydratation des couches SiO_2); **) matériaux pratiquement inertes; ***) matériaux techniquement difficiles et donc non testés comme implants. Sur la base de ces matériaux, des précurseurs de fer sont ajoutés pour obtenir après traitement la phase magnétique. Les matériaux ferromagnétiques en masse ainsi obtenus présentant des microstructures magnétiques de type multi-domaines (une flèche simple désigne un moment moléculaire au sein des populations constituant ce matériau multi-domaine) peuvent être utilisés comme implant en chirurgie. Le cas d'une solution solide est marqué par (+). Une fois broyés, ces mêmes matériaux peuvent alors être injectés ou incorporés dans des matériaux biphasés. Ces matériaux produiront en AMF la chaleur par pertes d'énergie due au phénomène d'hystérèse, voir **cadre C**. Le chauffage dues aux pertes dites par hystérèse dépend de l'aire sous la courbe d'hystérèse. La microstructure magnétique multi-domaine apparaît pour un diamètre supérieur à D_s (diamètre d'un domaine simple, qui dépend de la phase magnétique). La courbe de magnétisation d'un matériau magnétique multi-domaine est représentée par une ligne noire dans le diagramme de magnétisation: ($B = f(H)$). La courbe grise correspond à une démagnétisation en cycles pour lesquels l'amplitude du champ magnétique statique est progressivement diminuée, illustrant comment l'hystérèse dépend fortement des conditions et de l'histoire de la mesure.

Cadre B. Fabrication de matériaux magnétiques faisant intervenir des procédés de synthèse de silice sol-gel: les précurseurs de fer sont précipités dans les pores de la matrice de silice, directement en oxydes de fer magnétiques ou en oxydes de fer non magnétiques qui sont ensuite oxydés pour devenir magnétiques. La mésoporosité de la silice ainsi fabriquée par procédés sol-gel permet en particulier d'obtenir des oxydes de fer de distribution de taille contrôlée et assez petits pour être superparamagnétiques, c'est-à-dire des SPIONS (« superparamagnétique iron oxide nanoparticles »). La courbe de magnétisation correspondante est présentée dans le graphique de B en fonction de H au sein du **cadre C** par une ligne noire pointillée. Cette courbe, avec une excitation coercitive "nulle", est typique d'un comportement superparamagnétique, pour des particules d'un diamètre inférieur à un diamètre critique, D_p (dépendant de la nature de la phase magnétique et inférieur à D_s). Une nanoparticule superparamagnétique est représentée par une flèche inscrite dans un cercle, suggérant que tous les moments moléculaires la composant réagissent tous ensemble comme un seul dipôle résultante, libre de rotation. Le plus souvent, une étape finale de broyage est réalisée, résultant en microparticules de verres incluant plusieurs SPIONS. Alternativement, des nanoparticules superparamagnétiques pré-synthétisées peuvent aussi être incorporées dans une matrice de silice par procédé sol-gel. Dans une dernière approche, les microparticules de silice pré-synthétisées servent de gabarits, c'est-à-dire de supports, auxquels sont greffés en surface les SPIONS. Tous ces matériaux montrent un comportement superparamagnétique. En AMF, la génération de chaleur à partir de ces nanoparticules superparamagnétiques repose sur deux types de relaxations magnétiques: i) les relaxations browniennes et, ii) les relaxations de Néel. i) Les particules avec un rayon hydrodynamique petit peuvent dissiper de la chaleur par relaxations browniennes, qui impliquent les frottements visqueux lors de la réorientation de la particule dans son ensemble. Les relaxations browniennes diminuent lorsque le rayon hydrodynamique et la viscosité du milieu augmentent. ii) Lorsque l'on considère des particules immobilisées, seules les relaxations de Néel sont désormais possibles. Dans ce cas, les dipôles peuplant le mono-domaine se réorientent d'ensemble de manière synchrone dans une direction libre après excitation, ce qui est souvent symbolisée comme la libre rotation du dipôle global résultante. Ceci s'applique aux larges microparticules qui incluent plusieurs SPIONS de manière à ce que l'interaction magnétique (couplage) entre eux soient impossible.

2.1 Matériaux céramiques, verres et verre-céramiques magnétiques

Le premier matériau verre-céramique inerte à propriété ferrimagnétique introduit pour induire magnétiquement un traitement hyperthermique, l'a été chez l'animal dans un modèle syngénique et hétérotopique sous-cutané de carcinome mammaire, connu pour ses fréquentes métastases osseuses. Ce verre-céramique contenait de l'hématite et une ferrite de lithium [254]. Broyé en particules d'un diamètre de 1.5 μm ($\rho = 3.5 \text{ g/cm}^3$), l'injection par seringue est possible avec des aiguilles de 22 à 26 G, et bien tolérée (jusqu'à 1g intramusculaire). Après injection directement en intra-tumoral de 0.1 g et exposition à un haut champ magnétique alternatif (10 kHz, 39.8 $\text{kA}\cdot\text{m}^{-1}$), la température a pu être augmentée de 9 °C (à ~ 43.5 °C) en 10 min. Cette augmentation de température fut encore limitée car les capacités de chauffage étaient encore faibles pour application *in vivo*, avec un taux spécifique de conversion de l'énergie en chaleur, « specific loss power », SLP, de seulement 1 W/g, pour ces conditions de champs magnétique (SLP que l'on retrouve parfois dans la littérature en correspondance avec le terme moins approprié de « specific absorption rate » ou SAR). Aucune évidence de cytotoxicité n'a été rapportée pour les particules, alors que l'approche hyperthermique a été encouragée par une augmentation significative des taux de survie et de quelques réponses complètes. Les travaux suivants furent axés sur le développement de matériaux bioactifs à capacités chauffantes accrues. Les propriétés d'un matériau verre-céramique ferrimagnétique à base CaO , SiO_2 , B_2O_3 , P_2O_5 et Fe_2O_3 (hématite) comme précurseur de Fe_3O_4 (magnétite) ont été étudiées pour l'induction magnétique de l'hyperthermie dans l'os d'animaux sains [257]. La synthèse incluait deux traitements par la chaleur consécutifs puis le broyage en granules qui furent utilisés après compactage pour insertion dans l'os. Le verre-céramique ainsi préparé contenait de la Wollastonite et des cristallites de magnétite (Fe_3O_4) d'un diamètre de 10 nm dispersées dans la matrice vitreuse de CaO-SiO_2 . Sa magnétisation à saturation était 32 $\text{A}\cdot\text{m}^2\cdot\text{kg}^{-1}$ ou $\text{emu}\cdot\text{g}^{-1}$, l'excitation coercitive de 9.5 $\text{kA}\cdot\text{m}^{-1}$, soit 120 Oe (pour une boucle de mesure de $\pm 796 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ soit 10 kOe) et un pouvoir de perte spécifiques, SLP (dans le texte SAR), de $10^{-2} \text{ W}\cdot\text{kg}^{-1}$, mais plus souvent exprimé en $\text{W}\cdot\text{g}^{-1}$, soit de 10 $\text{W}\cdot\text{g}^{-1}$ (dans un AMF de 23.9 $\text{kA}\cdot\text{m}^{-1}$ ou 300 Oe alternant à 100 kHz). *In vivo*, les os implantés ont atteint la température cible de 45°C, qui fût maintenue pendant 30 min en modulant l'amplitude du AMF. La température des muscles environnants et les parties de l'os distantes n'a pas dépassé 42 °C. A propos de la bioactivité, aucune couche d'hydroxyapatite n'a été formée, car des ions de fer se sont probablement dissous comme indiqué précédemment [252,251]. Une légère bioactivité a pu être observée *in vivo*, résidant en une certaine liaison à l'os et en l'accroissement de résistance à la fracture en charge pour des temps d'implantation de 8 à 25 semaines, par opposition au matériau sous sa forme basique de verre. La dissolution de la wollastonite depuis la matrice vitreuse hydratée et les interactions avec les fluides biologiques ont été suggérées comme mécanisme de liaison à l'os. Cependant, cette lente liaison à l'os n'apparaît pas adéquate en face de la rapidité de croissance des tumeurs. Le potentiel antitumoral de la chaleur produite par induction magnétique par de tels verres-céramiques a alors été testé après implantation dans un modèle animal de métastase osseuse (tumeur de carcinome à cellules squameuses indifférenciées, greffé dans le canal médullaire de tibias de lapins) [258]. Les verre-céramiques du système précédent [257] ont été synthétisés pareillement [259], et ont été étudiés rétrospectivement plus en détails [260]. Expérimentalement, des broches de ce matériau ont été insérées dans le canal médullaire tibial greffé avec la tumeur. Les groupes constitués étaient le groupe traité par hyperthermie, un groupe témoin sans traitement par hyperthermie (« sham »), et un groupe contrôle sans implantation. L'induction magnétique par AMF a été appliquée 50 min, la surface du verre-céramique a atteint la température plateau de 50 °C pendant 10 min, alors que la température de la surface extra-corticale de l'os était de 42.5 °C. Cinq jours après le traitement, une nécrose importante du tissu tumoral pouvait être observée en

histologie, avec respect des tissus sains, alors que les deux groupes: témoin « sham » et contrôle, montraient des tissus tumoraux vitaux en cours d'invasion de l'os. Lors du suivi radiologique, l'incidence de fractures a été significativement plus basse dans le groupe traité par hyperthermie que dans les autres groupes. En comparaison au groupe contrôle, l'ampleur de déplacement après fracture a été diminuée significativement dans les deux groupes implantés avec ou sans traitement hyperthermique. Ces résultats ont pour avantage de différencier la valeur intrinsèque de l'hyperthermie pour le contrôle local de la tumeur de celle des bénéfices fonctionnels des céramiques, à attendre dans les lésions cancéreuses de l'os.

La microstructure, les propriétés magnétiques et la bioactivité des matériaux céramiques-verres dans le système de composition: (45)SiO₂, (45)CaO et (10)Fe₂O₃ (mol%), additionné de Na₂O à 3 % en masse, ont été particulièrement étudié par Real *et al* [261]. Ce matériau céramique vitreux avait la wollastonite pour phase cristalline dominante et ϵ -CaSiO₃ comme phase mineure, les deux constituées par des cristallites de petites tailles. La diffraction de rayons X révélait l'absence d'une quelconque phase cristalline d'oxyde de fer, possiblement sous forme amorphe. Les tests *in vitro* ont démontré peu de relargage d'atome de fer et une bioactivité effective à 20 et 40 jours. Sur la base des résultats d'analyses cristallographiques et d'investigations par spectroscopie Mössbauer, les auteurs ont assigné la ferroan-wollastonite CaSiO₃·Fe^{II}SiO₃ et ϵ -(Fe^{II},Ca)SiO₃, respectivement comme la phase principale, de caractéristique magnétique douce, et la phase mineure, de caractéristique magnétique dure. Le Fe^{III} serait lui piégé dans la matrice vitreuse durant l'étape de fusion initiale à 800°C, justement du fait de son état d'oxydation. Aucune aire d'hystérèse ou taux de dissipation énergétique: SLP ou SAR, dans un AMF n'a été rapporté. Selon une autre approche de formulation, un matériau biphasé, aux propriétés de bioactivité accrues, a été préparé en ajoutant à une phase vitreuse magnétique, telle qu'obtenue précédemment, une phase supplémentaire constituée de verre sol-gel bioactif [262,263]. La première phase, responsable des propriétés magnétiques, se composait comme précédemment de (45) SiO₂, (45) CaO et (10) Fe₂O₃ (mol%), additionné de 3 % en poids de Na₂O. La deuxième phase de verre sol-gel, responsable de la bioactivité, avec la composition: (58) SiO₂, (6) P₂O₅ et (36) CaO (mol%), était obtenue par hydrolyse et polycondensation du tetraethyl orthosilicate et triethyl phosphate (TEP), avec Ca(NO₃)₂·4H₂O. Chaque phase a été pulvérisée puis tamisée, les fractions de particules de diamètre entre 32 et 64 µm furent sélectionnées. La poudre de matériau sol-gel fut soumise à une dernière étape de chauffage à 700°C pour stabilisation. Le matériau biphasé a été finalement obtenu par mélange pulvérulent de la phase magnétique et de la phase bioactive sol-gel, dans des rapports massiques de 5:1, 2:1 et 1:1, suivi par une compression puis un chauffage. Le matériau final, que l'on peut, après ce dernier chauffage, qualifier de céramique biphasée verre-verre, était micro- et méso-poreux, avec une surface spécifique plus proche du premier verre préparé par fusion, que de celle du second verre préparé par transition sol-gel (14 m²/g). La wollastonite (diamètre de cristallite de 50 nm) a été la seule phase cristalline révélée et aucune phase cristalline dérivée d'oxyde de fer ne pu être détectée. Ceci suggère fortement qu'une solution solide, CaSiO₃·FeSiO₃ (ferroan wollastonite), soit la phase magnétiquement ordonnée principale. Seul le matériau biphasé au rapport de phase 1:1 a montré une bioactivité. La faible fraction d'atomes de fer dans le matériau final a conduit à une magnétisation à saturation entre 0.012 et 0.021 A.m².kg⁻¹, unité du SI, directement équivalent dans le système non rationalisé *cgs* à emu.g⁻¹. C'est à peu près inférieur d'une décade en prenant comme modèle la céramique-verre magnétique de développement juste préalable, ou en se référant à un calcul sur la base un taux extrapolé de 5% en masse d'une maille cristalline de magnétite. Une excitation coercitive de 24 kA.m⁻¹, soit 400 Oe a été rapportée (boucle d'hystérèse ± 1.6·10³, soit ± 20 kOe). Ces données laissent présager d'une possibilité limitée de perte par hystérèse en vue d'applications de chauffage *in vivo*. Les auteurs proposent donc d'augmenter la fraction d'oxyde de

fer dans la phase verre magnétique en vue d'accroître la magnétisation à saturation pour améliorer les capacités de chauffage. Rappelons néanmoins que ceci appelle de fait à de plus grandes amplitudes d'induction et que ces dernières restent limitées pour application clinique, *cf* page 38, limites déjà dépassée dans les présentes investigations *in vitro*.

Des études *in vitro* plus récentes avec des matériaux verre-céramique ferrimagnétiques, du système de composition bioactif: $\text{SiO}_2\text{-Na}_2\text{O-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-FeO-Fe}_2\text{O}_3$, ont contribué à révéler l'importance de la structure du matériau et de ses propriétés magnétiques à l'échelle nanométrique pour les capacités de dissipation de chaleur en fonction du AMF [264-267]. Les importants résultats en sont résumés dans le Tableau 2 (p.50), notant que l'AMF de $40 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ à 440 kHz, n'est pas encore applicable en clinique. Dans la référence [264], est décrite la préparation de matériaux verre-céramiques ferrimagnétiques par coprécipitation de précurseurs solubles dans l'eau en milieu basique, suivie de fusion à $1500 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 30 min, puis du « quenching » par refroidissement rapide à température ambiante. Pour deux concentrations de précurseurs d'oxyde de fer distinctes: 35 et 45 % en masse, des différences manifestes ont été rapportées pour la microstructure (par les techniques de microscopie à balayage, de diffraction de rayons X et d'analyse thermogravimétriques différentielles), les propriétés magnétiques à température ambiante (par la technique VSM, « Vibrating Sample Magnetometry ») et finalement de capacité à dissiper de la chaleur dans un AMF. Le matériau céramique contenant 45 % en masse de précurseur d'oxyde de fer révéla que l'unique phase d'oxyde de fer finalement obtenue après synthèse était constituée de nanoparticules de magnétite d'un diamètre d'environ 54 nm. Le matériau céramique à base de 35 % m de précurseurs d'oxydes de fer était constitué en l'état final de 20 % en masse de nanoparticules de magnétite d'un diamètre d'environ 34 nm, composant une première phases d'oxyde de fer en laissant supposer que le reste de précurseurs avaient formé une solution solide à hauteur de 35 % (soit 15 %). L'augmentation de concentration en magnétite est intuitivement reliée à l'augmentation de la magnétisation à saturation, mais elle est aussi à relier à une diminution de l'excitation coercitive par les effets anisotropiques qui se manifestent lors de l'empilement de nanoparticules [217]. La diminution de l'excitation coercitive peut aussi être notée pour des tailles de cristallites croissantes et un plus faible stress interne à la phase cristalline, que l'on sait être généré lors du refroidissement [217]. La détermination expérimentale des capacités de chauffage dans un AMF n'est le plus souvent pas en adéquation avec les valeurs acceptables pour la clinique des paramètres AMF. Du paragraphe 1.2.1, page 38, rappelons que chez l'homme, les valeurs acceptables du produit $H\cdot f$ (l'amplitude par la fréquence du AMF) admettent une limite entre 5 et $13.5 \cdot 10^8 \text{ A}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, au-delà de laquelle les courants de Foucault induits non sélectivement sont responsables de graves effets indésirables (points chauds et brûlure des tissus adipeux sous-cutanés). Ainsi, la valeur calculable de $H\cdot f$ du AMF utilisé ici par Bretcanu *et al*, i.e. AMF d'amplitude $40 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ (500 Oe) et d'une fréquence de 440 kHz, est de $176 \cdot 10^8 \text{ A}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, ce qui ne paraît pas applicable en clinique. Cependant, les auteurs questionnent de manière très pertinente le lien entre les pertes de chaleur déterminées expérimentalement par calorimétrie, dans ces conditions de champ magnétique dynamiques, avec les propriétés des courbes d'hystérèses obtenues en champ magnétique statique par deux types de mesure en boucle: une première boucle qui présente de grandes valeurs extrêmes, $\pm 796 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ (10 kOe), correspondant au type de mesure le plus souvent utilisé pour la caractérisation de ces matériaux; et une deuxième boucle, bien moins fréquente, de valeurs extrêmes moins importantes $\pm 398 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ (500 Oe), et, quoique que encore élevées, se rapprochant plus d'un ordre de valeurs transposables en clinique. À $\pm 796 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ (10 kOe), la magnétisation du matériau céramique ferrimagnétique atteint la saturation, l'aire intégrée sous la courbe d'hystérèse fut supérieure pour le matériau à 45 % en masse de précurseurs d'oxyde de fer que pour celui à 35 % (Tableau 2, p.50), du fait de la prédominance des effets liés à la saturation en magnétisation. Inversement, à $\pm 398 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$

Tableau 2: Résumé des travaux de Bretcanu *et al* en ingénierie de matériaux verre-céramique magnétiques.

| Méthode de synthèse | Co-précipitation a) | | Traditionnelle b) | | | | Co-précipitation c) | | | | Co-précipitation d) | |
|--|---------------------|------------|-------------------|------------|------------|------|-----------------------|------------|-------|------------|---------------------|------------|
| | 35 % m | 45 % m | 45 % m | | | | 45 % m | | | | 45 % m | |
| Proportion de précurseurs d'oxydes de fer * | 1500 | 1500 | 1400 | 1450 | 1500 | 1550 | 1400 | 1450 | 1500 | 1550 | 1500 | 45 % m |
| Température de fusion (°C) | Principale | Principale | Composite | Principale | Principale | Pure | Principale | Principale | Pure | Principale | Principale | Principale |
| magnétite | 8 | 14 | 3 | 5 | 7 | 9 | 4,5 | 5 | 6 | 4 | 4 | ** |
| Intensité indicative du pic principal | - | - | Composite | Mineure | Mineure | - | Mineure | Mineure | - | Mineure | - | - |
| hématite | - | - | 4 | 3,5 | 1 | - | 1 | 0,5 | - | >0 | - | - |
| Intensité indicative du pic principal | - | - | - | Mineure | Mineure | - | - | - | - | - | - | - |
| Ca Silicate | - | - | - | 0,1 | 0,1 | - | - | - | - | - | - | - |
| Intensité indicative du pic principal | oui | oui | oui | oui | oui | oui | oui | oui | oui | oui | oui | oui |
| Amorphe à angles faibles | 20 | 45 | 20 | 22 | 24 | 34 | 36 | 39 | 46 | 42 | 42 | 53 |
| Quantité de phase magnétique (%m) | 34 | 54 | 56 | 59 | 79 | 83 | - | - | - | - | - | 34 |
| Taille moyenne des cristallites en nm par DFX | 15 | 33 | 18,6 | 20,5 | 22,3 | 31,5 | 26 | 28 | 33 | 30 | 30 | 4000 |
| Magnétisation à saturation, Ms (emu/g) | 4000 | 2000 | 4000 | 4000 | 4000 | 4000 | Non spécifiée (~4000) | | | | 4000 | |
| Champs magnétique pour saturation (Oe) | 144 | 82 | 83 | 122 | 180 | 35 | 151 | 147 | 82 | 220 | 85 | 85 |
| Excitation coercitive, Hc (Oe) | 4.45 | 2.45 | 1.62 | 2.8 | 7.4 | 1.07 | 3.86 | 3.73 | 2.45 | 5.83 | 2.4 | 2.4 |
| Magnétisation rémanente, Mr (emu/g) | 6150 | 14 400 | 4900 | 7400 | 9100 | 4200 | 12000 | 13600 | 14450 | 20250 | 14500 | 14500 |
| Aire d'hystérèse interpolée (erg/g de céramique) pour: | 3850 | 1750 | 1500 | 2050 | 5150 | 900 | 2300 | 2700 | 1750 | 3000 | 1700 | 1700 |
| Boucle ± 10 kOe (796 kA/m) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 15 |
| Boucle ± 500 Oe (39.8 kA/m) | 93 | 36 | 40 | 41 | 87 | 27 | 39 | 40 | 36 | 41 | 35 | 35 |
| Boucle ± 60 Oe (4.8 kA/m) | 65 | 20 | 28 | 29 | 61 | 19 | 27 | 28 | 25 | 29 | 25 | 25 |
| ΔT °C/g de céramique (1g dans 20ml H ₂ O) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | oui |
| SLP (specific power loss) en W/g de céramique dans un AMF: 40kA/m, 440 kHz | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Bioactivité <i>in vitro</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Légende: Références correspondantes: a) [264], b) [266], c) [265], d) [267]. Toutes les propriétés magnétiques ont été mesurées à température ambiante. * composition du système de précurseurs correspondant: i) pour 35% en précurseur d'oxyde de fer: Na2O (15.9), CaO (15.9), SiO2 (29.3), P2O5 (3.9), FeO (10.9), Fe2O3 (24.1) (% en masse). ii) pour 45% en précurseur d'oxyde de fer: Na2O (13.5), CaO (13.5), SiO2 (24.7), P2O5 (3.3), FeO (14), Fe2O3 (31) (% en masse). ** caractérisation par diffraction de rayons X (XRD) très détaillée, cf ref. [265]. § intensité de la réflexion (311) à 35 ° de la magnétite en XRD. Induction magnétique, Oersted: 1 Oe=79,6 A/m

(500 Oe), la magnétisation de ce matériau céramique ferrimagnétique n'atteint plus la saturation et l'aire intégrée sous la courbe fut alors plus grande pour le matériau à 35 % en masse de précurseurs d'oxyde de fer que pour celui à 45 % (Tableau 2, p.50) car les effets de l'excitation coercitive devinrent prédominants. De plus, ceci résulta pour le matériau céramique à 35 % en masse de précurseurs d'oxyde de fer en un plus grand SLP que pour celui à 45 % (65 contre 20 W/g). Les tailles de cristallite plus petites se révèlent ainsi plus adéquates, alors que les plus larges s'adaptent elles à des AMFs de plus large amplitude. Trois publications font suite à propos d'études détaillées de l'impact de la température de fusion, variant entre 1400 et 1550°C sur la microstructure, les propriétés magnétiques et sur les capacités de chauffage, ayant opté pour le matériau verre-céramique ferrimagnétique avec 45 % en masse d'oxyde de fer, pour deux méthodes de synthèse: (i) par fusion de précurseurs coprécipités (comme précédemment) [265,267] et, (ii), la méthode traditionnelle consistant en la fusion de précurseurs de grade chimique, plus grossier [266] (Table 2, p.50). Les précurseurs coprécipités, de très grande pureté et réactivité, sont entièrement convertis à 1500°C en magnétite [264], sous forme de cristallite d'un diamètre moyen de 54 nm [267]. Ceci permet une magnétisation à saturation élevée, de $(33 \text{ A}\cdot\text{m}^2\cdot\text{kg}^{-1})$, ou encore $\text{emu}\cdot\text{g}^{-1}$, en contraste avec le matériau de facture traditionnelle dont la phase magnétite est constituée de particules d'un diamètre croissant avec la température appliquée lors de la fusion: entre 56 à 83 nm, les précurseurs n'étant pas entièrement convertis en magnétite à cause de la formation de solutions solides [262,263]. Concernant la facture traditionnelle, pour une température de fusion de 1500 °C, et non aux autres températures, l'excitation coercitive et la magnétisation rémanente du matériau obtenues étaient les plus élevées: 180 Oe (soit $14.3 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$) et $7.4 \text{ A}\cdot\text{m}^2\cdot\text{kg}^{-1}$ (ou $\text{emu}\cdot\text{g}^{-1}$), respectivement. L'aire intégrée sous la courbe d'hystérèse, déterminée en champ magnétique statique avec des amplitudes extrêmes correspondant à celle du champ magnétique alternatif utilisé pour les investigations calorimétriques, s'est révélée très prédictive des pertes énergétiques, SLP, pour chaque type de matériau verre-céramique ferrimagnétique incorporant 45 % en masse de précurseurs d'oxyde de fer. Dans cette composition et parmi la variété des procédés de synthèse étudiés [265,266], les matériaux verre-céramique obtenus par coprécipitation et fusion à 1550°C présentèrent l'excitation coercitive la plus élevée mais une magnétisation rémanente intermédiaire. Lorsque mesurée par boucle $\pm 796 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ (10 kOe), l'aire sous la courbe d'hystérèse pour ce matériau est la plus élevée alors qu'elle n'est qu'intermédiaire lorsque mesurée par boucle $\pm 398 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ (500 Oe), en accord avec la mesure d'un SLP intermédiaire. Ces observations sont à relier à l'importance de la taille des particules magnétiques, point largement développé par Hergt [239], ainsi qu'à l'importance de l'excitation coercitive, qui apparaît empiriquement comme le paramètre principal pour les pertes par hystérèse. Éventuellement, ceci peut être raffiné en intégrant la magnétisation à saturation, M_s [238].

De tous ces résultats, Bretcanu *et al* concluent par d'importantes remarques au sujet des matériaux et des caractéristiques magnétiques statiques. Premièrement, les variations de SLP sous AMF sont liées, au travers de l'excitation coercitive magnétique, aux variations de la phase cristalline, de la taille des cristallites, de leur nombre et de l'homogénéité des domaines magnétiques (statiques) [264]. La coïncidence de capacités maximales dans la dissipation de chaleur avec une excitation coercitive élevée peut être expliquée par la microstructure. Les auteurs suggèrent que les cristallites de 79 nm, qu'ils notent être alors à limite entre une microstructure magnétique faite de pseudo-domaines simples et une de multi-domaines, sont particulièrement efficaces [266]. Notons que ces tailles se comprennent comme relevant de domaines magnétiques statiques, qui sont toujours plus larges que les domaines dynamiques (plusieurs centaines et 170 Å, respectivement [217]). Considérant les domaines magnétiques en conditions dynamiques, les cristallites d'environ 10 nm observées par TEM [267] correspondent à un pseudo-domaine simple dynamique et, en accord avec

[217], les relaxations magnétiques changent substantiellement. Il apparaîtrait que les relaxations de Néel, très efficaces, doivent alors entrer en considération (la rotation des cristallites et donc les relaxations browniennes sont impossibles). Outre les différences liées aux processus de fabrication, les auteurs proposent de manière pertinente que les courants de Foucault et les pertes anormales soient à l'origine de pertes de chaleur en AMF. Les pertes anormales s'expliquent par des inhomogénéités de structure des domaines magnétiques et des irrégularités de mouvements des parois de domaines, à relier aux impuretés et au stress au sein de la maille cristalline [264]. Finalement, d'autres études intéressantes ont contribué à la compréhension de la microstructure et des caractéristiques du magnétisme des céramiques-verres magnétiques, mais malheureusement sans être directement mise en perspective avec les capacités de chauffage [268-272]. De nombreux travaux ont visé à incorporer dans les céramiques-verres des phases magnétiques présentant de larges magnétisations à saturation, et présentant comme pour les thermosources autorégulées (« self-regulating thermoseeds ») un point de Curie T_c , soit une température au-delà de laquelle les dissipations de chaleurs sont abolies, adapté pour prévenir les surchauffages. Ces phases ne sont encore que très expérimentales [273].

2.2 Particules et microsphères de verre/céramique

Les matériaux céramiques peuvent se trouver sous des formes particulières variées: broyats, granules, microparticules et microsphères; destinées à être utilisées directement ou comme agent de remplissage pour certaines procédures chirurgicales de l'os à caractère invasif réduit. Ces formulations ont été développées pour les avantages de leur injectabilité, tout en préservant les propriétés *in situ*, notamment la bioactivité. Comme précisé en introduction du paragraphe 2, il est avantageux d'utiliser tous les matériaux verre-céramiques sous cette forme, bien que les travaux, préalables ou non, concernent encore bien souvent le matériau non divisé. Malheureusement, peu d'études étudient l'injectabilité et la plupart se concentrent sur la caractérisation structurale du matériau non divisé en fonction des paramètres de synthèse. Dans la plupart des études *in vivo* de particules de verre-céramique, celles-ci sont comprimées pour reformer des échantillons massiques qui seront insérés chirurgicalement et non injectés, aux fins de limiter la variabilité qui peut être associée à l'injection. Les systèmes à particules micrométriques ont de grands avantages en terme d'injectabilité. Leur taille est assez large pour permettre de bonnes propriétés d'empilement et d'écoulement, mais assez petite pour être compatible avec les dispositifs médicaux d'invasivité minimale, tels que les cathéters très fins.

Une poudre injectable de matériau céramique contenant une phase magnétique a été testée *in vitro* dans un modèle constitué de sphères d'agar [274]. La phase magnétique, attendue biocompatible, était la suivante: $Mg_{1+x}Fe_{2-2x}Ti_xO_4$, qui, pour des stœchiométries avec x ayant pour valeurs 0.35 ou 0.38, a un point de Curie d'environ 77 ou 42 °C, respectivement. Insistons sur l'intérêt pour la régulation du chauffage de la perte des propriétés magnétiques quand la température atteint le point de Curie. Les précurseurs: MgO, Fe_2O_3 et TiO_2 ont été pré-frittés pendant 22 h à 703 °C, « pelletisés », puis comprimés en disque pour frittage à 1200 °C. Les particules finales d'un diamètre de 8 μm ont été obtenues par broyage dans un mortier. Les particules ont été dispersées dans un modèle artificiel de tumeur constitué par une sphère d'agarose, qui fut ensuite insérée dans un plus large gel d'agar représentant les tissus environnants, puis soumis à un AMF à une fréquence de 230 kHz et une amplitude variant entre 1.6 à plus de 16 $kA \cdot m^{-1}$ (soit de 20 à plus de 200 Oe). Les pertes par hystérèse ont été calculées en utilisant l'aire des courbes d'hystérèse magnétiques obtenues par mesure dans un champ magnétique statique en boucle, mais aucune valeur de champs

magnétique n'est décrite. Le SLP (« specific loss power ») a été obtenu à partir de la détermination expérimentale du gradient de température. La magnétisation à saturation et le point de Curie diminuent lorsque le paramètre stœchiométrique x augmente. Soumise à des AMFs d'amplitude croissante, la poudre céramique atteint des températures d'équilibre approchant asymptotiquement T_c . En dessous de $8 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ (100 Oe), le calcul des pertes par hystérèse étaient très proche du SLP déterminé, suggérant que la perte par hystérèse représente le seul mécanisme de génération de la chaleur. Indépendamment de l'amplitude du AMF, les pertes par hystérèse et le SLP diminuent linéairement lorsque dans la composition la proportion d'atomes Ti augmente, c'est-à-dire avec x s'accroissant, et donc T_c décroissant. Ceci est lié à la diminution linéaire des capacités de magnétisation: la susceptibilité magnétique. Dans cette situation expérimentale artificiellement idéale, avec une distribution homogène de telles particules dans la sphère d'agar de 2 cm de diamètre représentant la tumeur, l'équation de la chaleur permet la prédiction précise de l'élévation de température. Des températures supérieures à $44 \text{ }^\circ\text{C}$, qui sont bien adaptées pour le traitement par hyperthermie, ont pu être obtenues près de la surface de la sphère.

Les microsphères de matériau verre-céramique sont des particules sphériques produites par des procédés spécifiques qui permettent un contrôle précis de leur taille, tels que la chimie en milieu liquide assistée par aérosol. Le développement de matériaux céramiques ferri ou ferro-magnétiques sous cette forme particulière est très récent.

Les microsphères verre-céramiques avec un diamètre de 20-30 μm ont déjà trouvé des applications biomédicales [275]. Notamment, des microsphères de céramique radioactives sont autorisées pour usage thérapeutique dans le traitement du cancer. Elles permettent alors la combinaison de la radiothérapie avec les procédures thérapeutiques d'embolisation, dont nous viendrons bientôt aux détails. Des microsphères de céramiques ferrimagnétiques d'un diamètre adapté pour l'embolisation: de 20 à 30 μm , sont actuellement développées pour permettre la possibilité supplémentaire d'induire magnétiquement une hyperthermie locale [276,277]. Kawashita *et al* [276], ont préparé ces microsphères en soumettant une poudre de magnétite (Fe_3O_4) pour fusion à un plasma thermique par induction à haute fréquence, ou en précipitant le fer sur la surface de microbilles de silice d'un diamètre de 10 μm . Ces deux méthodes comprennent alors une étape synthétique de traitement par la chaleur pour oxyder complètement la phase contenant le fer en phase d'oxyde de fer magnétique, principalement la magnétite. La méthode de synthèse par plasma aboutit à des microsphères purement constituées de Fe_3O_4 sous la forme de cristallites d'un diamètre de 1 μm . La méthode par précipitation aboutit à des microsphères avec une couche surfacique de couleur rouille composée de FeOOH , dont l'épaisseur peut être modulée par le temps de séjour dans le milieu de précipitation (24 jours permettent d'atteindre un diamètre de 25 μm). En vue d'un usage pour hyperthermie, en comparaison avec la méthode par plasma, la méthode par précipitation a conduit à des caractéristiques magnétiques et des capacités de chauffage plus appropriées: une excitation coercitive de $9,5 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ (120 Oe) au lieu de $4 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ (50 Oe), une magnétisation à saturation, M_s , de 53 au lieu de $92 \text{ A}\cdot\text{m}^2\cdot\text{kg}^{-1}$ ($\text{emu}\cdot\text{g}^{-1}$), avec un SLP calculé pour un AMF à 100 kHz, $23,9 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ (soit 300 Oe) de $41 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$ au lieu de $10 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$. Seules les microsphères produites par précipitation ont été sélectionnées pour poursuivre l'étude *in vivo* de leur capacité pour l'hyperthermie [277]. De petites adaptations du protocole de synthèse s'ajoutèrent pour prévenir le craquelage de surface par déshydratation trop rapide. La microscopie électronique par transmission, TEM, a montré des cristallites cubiques, dont la phase magnétique est vraisemblablement la maghémite. Les cristallites présentaient des tailles variant de 100 à 300 nm, avec une moyenne estimée à 206 nm. Dans un AMF (100 kHz, amplitude d'environ $23,9 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$, soit 300 Oe), lorsque les microsphères à 2% en masse furent uniformément dispersées dans la sphère d'agar modèle de tumeur, une augmentation limitée de la température de $2 \text{ }^\circ\text{C}$ a été enregistrée. Par contre, quand les microsphères ont été

concentrées dans un volume bien plus restreint au sein de ce gel d'agar, la température put être augmentée de 20°C. Cette expérimentation soulève l'importance, pour les matériaux injectables, des considérations en lien avec leur distribution *in situ* et, ainsi, avec la distribution de la chaleur qu'ils produisent. Les deux distributions extrêmes précédentes reflètent l'ampleur maximale d'une variabilité inhérente à la voie par injection, mais absente lors de l'implantation des matériaux en masse. Le SLP attendu de 41 W·g⁻¹ n'a pas été confirmé par calorimétrie. Les auteurs soulignent que la taille des cristallites de maghémite a pu être réduite de manière optimale à celle d'un domaine simple sous la forme de cristallites sphériques, ce qui leur a conféré une excitation coercitive maximale, confirmant les résultats de Bretcanu *et al* à propos des matériaux verre-céramique contenant de la magnétite (voir ci-dessus, [266]). Des particules de magnétite creuses plus larges (500 µm de diamètre) ont été préparées par décomposition enzymatique de l'urée au sein de particules-gabarits d'alginate [278]. Une solution aqueuse, contenant du nitrate de fer, de l'uréase et de l'alginate d'ammonium, fut ajoutée par gouttes dans une solution aqueuse de nitrate de fer et d'urée. À la surface de la goutte, la décomposition enzymatique de l'urée déclenche la précipitation du fer en un oxyde amorphe et aboutit à des particules creuses larges, avec un diamètre de 2 mm. L'étape de cristallisation qui suit cette première phase, consistant en traitement à chaud dans une atmosphère riche en CO₂ et H₂, cause une contraction des particules creuses à un diamètre de 500 µm, et quelques fissurations. Un autre point intéressant est que les particules creuses ainsi préparées ont une densité inférieure que les plus petites microsphères préparées dans le travail précédent [276,277]. L'importance de cette remarque est en relation avec le comportement lors de l'injection dans un lit vasculaire et concerne en premier lieu les capacités d'embolisation, car les particules se comportent dans le flux sanguin très différemment en fonction de leur densité. Par contre, cela pèse peu sur leur injection dans l'os. Les particules traitées à 800°C dans une atmosphère de CO₂ - H₂ à 50 - 50 % révélèrent une magnétisation à saturation relativement élevée, 52 A.m².kg⁻¹ (emu.g⁻¹) et une excitation coercitive de 14,6 kA.m⁻¹ (183 Oe). Sur la base de leur caractérisation magnétique en condition statique, ces particules ont été considérées comme capables des pertes par hystérèse les plus élevées dans un AMF. Un SLP de 45 W.kg⁻¹ a été calculé, mais aucune étude calorimétrique ne fut faite. Pour les particules traitées à 600 °C et 700 °C au lieu de 800 °C, grâce à la diffraction à rayons X, XRD, l'oxyde de fer Fe₃O₄ apparaît être très probable et l'élargissement des pics est typique d'une structure nanocristalline, le tout en faveur de propriétés superparamagnétiques. Ces dernières particules n'ont pas été retenues de par leur faible magnétisation à saturation et excitation coercitive, qui laissent les auteurs envisager de faibles capacités de chauffage en AMF. Cependant, ceci ne concerne au premier chef que les pertes par hystérèse, et d'autre relaxations magnétiques telles que les relaxations de Néel, pourraient parfaitement résulter en la génération significative de chaleur.

Parmi les nombreuses particules initialement dédiées à un autre usage: séparation, catalyse ou « drug delivery », certaines peuvent être prometteuses pour l'hyperthermie à médiation magnétique. Ainsi, des matériaux à base de silice mésoporeuse aussi appelés véhicules magnétiques mésoporeux (« mesoporous magnetic carriers »), de structure nanocomposite incorporant des éléments magnétiques, méritent considération pour le traitement de tumeurs osseuses. Par exemple, des noyaux ferromagnétiques de 3 µm de diamètre (M_s = 80 A.m².kg⁻¹ or emu.g⁻¹) peuvent être enveloppés par de la silice mésoporeuse (100 nm d'épaisseur) [279], ou, inversement, des particules de silice mésoporeuse peuvent être enveloppées de nanoparticules de magnétite [280] (voir Figure 10B, p45&46). De très intéressantes particules constituées par des noyaux magnétiques (Fe₃O₄ et Fe) de 120 nm de diamètres enveloppés de silice mésoporeuse ont été récemment synthétisées [281]. Ces particules sphériques, d'un diamètre de 270 nm au final, ont une magnétisation à saturation de 27,3 A.m².kg⁻¹ (soit emu.g⁻¹), pour une large aire d'hystérèse, telle que déterminée par mesure en

boucle $\pm 397 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ (5 kOe).

Jusqu'ici, les matériaux verre-céramiques développés pour hyperthermie par AMF se basent en fait sur les pertes par hystérèse pour produire la chaleur. Une alternative à ce paradigme est de synthétiser des microparticules de silice superparamagnétiques. Grâce à la souplesse des procédés recourant à la chimie sol-gel de la silice, plusieurs SPIONS (« superparamagnetic iron oxide nanoparticles ») peuvent être incluses uniformément dans une matrice de silice. Ceci est réalisé en veillant à préserver les SPIONS du couplage de leur moments magnétique et donc préserver le superparamagnétisme (Figure 10B, p.45&46). Deux approches ont déjà été utilisées à cette fin [282]. Dans la première, le nitrate de fer a été mélangé avec les précurseurs de silice qui furent alors hydrolysés à 50°C pour former un gel de silice poreux. Le nitrate de fer précipite dans les pores de cette matrice de silice, ce qui permet un contrôle de la taille des cristallites d'oxydes de fer. La matrice, en masse, a alors été broyée en microparticules par la suite traitées thermiquement sous atmosphère non particulière: l'air (24 h à 500°C ou 1h à 700°C), afin d'oxyder *in situ* les cristallites d'oxyde de fer précipitées, en l'état non magnétiques, en nanoparticules d'oxydes de fer magnétiques, constituées très probablement de maghémite (Figure 10B, p.45&46). Cette synthèse aboutit à des microparticules faites d'une matrice de silice renfermant des cristallites d'oxydes de fer magnétiques avec une diamètre de 13 nm selon les déterminations par XRD et magnétique. Selon la seconde approche, les microparticules superparamagnétiques ont été obtenues en dispersant des SPIONS, préalablement synthétisés par la méthode classique de coprécipitation, dans une solution de précurseurs. La gélification de la silice s'est opérée comme précédemment à 50°C. La matrice de silice obtenue fut broyée en microparticules, ensuite soumises à traitement thermique à 800 °C pendant 1 h. Les diamètres des SPIONS étaient d'environ 11 nm selon les caractéristiques XRD, TEM et magnétiques. Avec de telles microparticules superparamagnétiques, les mécanismes de production de chaleur en AMF se basent maintenant sur la relaxation magnétique de domaines simples (connue pour être particulièrement efficace) et non plus sur les pertes par hystérèse qui étaient associées à un micromagnétisme dit multi-domaine. Dans le cas de ces microparticules superparamagnétiques, la réorientation des spins dans l'espace ne se fait que par la réorientation collective du système de spin au sein du réseau cristallin, c'est-à-dire par relaxations de Néel exclusivement. Les relaxations browniennes ne sont possibles que pour des particules avec un rayon hydrodynamique inférieur à 1 μm (tels que des SPIONS en y adjoignant leur possible revêtement) en dispersion dans un milieu liquide de faible viscosité, c'est-à-dire des ferrofluides. Elles ne sont pas envisageables dans le cas de SPIONS solidairement inclus dans une matrice de silice de plus grande dimension. Des microsphères de silice mésoporeuse incorporant des SPIONS, d'un diamètre de 5 à 7 nm, ont été synthétisées par auto-assemblage lors d'évaporation assistée par aérosol à partir d'un mélange de ferrofluides aqueux avec des précurseurs de silice et un tensioactif: Pluronic®, dissous dans l'éthanol [283]. Les microsphères obtenues se sont révélées avoir une excellente sphéricité, avec une distribution de taille, comprise entre 0.3 et de 3 μm en diamètre. De plus, leur surface lisse pourrait être un avantage pour l'injectabilité en vue d'un usage clinique. Les SPIONS ont pu être inclus jusqu'à 40 % de maghémite en masse. Le superparamagnétisme fut étudié par mesure d'hystérèse à $\pm 795 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ ($\pm 10 \text{ kOe}$) et, pour l'échantillon représentatif à 10 % en masse de maghémite, la magnétisation à saturation était de $57 \text{ A}\cdot\text{m}^2\cdot\text{kg}^{-1}$ (or $\text{emu}\cdot\text{g}^{-1}$), 62 pour le ferrofluide brut. Les microsphères ont pu être chargées par diffusion dans les mésopores avec de l'ibuprofène comme principe actif modèle. Un comprimé de telles microsphères chargées, testé *in vitro* dans un fluide simulant les fluides corporels, le SBF (« simulated body fluid »), libéra 50 % du principe actif pendant la première heure (effet de jaillissement ou « burst effect »), suivi par une libération soutenue durant 100 h, atteignant un plateau pour une valeur asymptotique de libération correspondant à 70 % de la quantité chargée.

De façon originale, des microsphères polymériques bioactives, c'est-à-dire capable de développer une couche d'apatite en surface dans le SBF, ont été préparées par enrobage avec une solution de calcium silicate puis trempage en SBF [284]. Les travaux dans le domaine des particules magnétiques et polymériques étant très nombreux, cette approche peut se révéler très fructueuse en vue du traitement de tumeurs osseuses par l'hyperthermie à médiation magnétique.

Finalement, il y a de nombreuses voies de recherche et développement possibles pour les matériaux verres/céramique avec l'espoir d'obtenir des matériaux efficaces dans des conditions d'AMF plus acceptables pour application clinique.

2.3 Matériaux magnétiques pour ciments orthopédiques

Les ciments injectables sont constitués de composants minéraux, ou de composants organiques pouvant se polymériser, ou encore du mélange de ces deux composants. Les ciments minéraux à calcium sont simplement composés de poudre de calcium et/ou sels de phosphate, qui, réunis dans une phase liquide, avec un certain rapport poudre/liquide, à température ambiante et/ou corporelle, réagissent et forment un précipité de phosphate de calcium qui se consolide par enchevêtrement de cristaux d'hydroxyapatite proches de ceux présent physiologiquement dans l'os. Les ciments organiques se basent souvent sur le polyméthacrylate de méthyle, PMMA (« polymethyl methacrylate »), sous forme d'un mélange de monomères et de pré-polymères, dont l'étape finale de polymérisation, déclenchée avant l'injection par le mélange avec l'initiateur de polymérisation, se produit pendant l'injection et s'achève *in situ*. Les injections de ciments sont particulièrement adaptées au traitement de vertèbres avec les techniques dites de vertèbroplastie (« vertebroplasty ») et de cyphoplastie (« kyphoplasty ») [285]. Des particules de céramique, verre ou verre-céramique broyées sont utilisées comme agents de remplissage dans les ciments (comme c'est le rôle du PMMA pré-polymérisé), ou dans des mélanges avec des polymères en ce qui concerne la dernière génération de matériaux composites, tels que Cortoss® (Orthovita Inc, Malvern, PA, USA) par exemple. Les ciments ferromagnétiques basés sur une résine de bis- α -glycidylméthacrylate et de triéthylène-glycol diméthyl-acrylate, mélangée avec un mélange pulvérulent de particules de magnétite (Fe_3O_4 , 13 μm de diamètre) et de particules de silice (SiO_2 , 3 μm de diamètre) comme matière de remplissage ont été développés [286]. La polymérisation est initiée en réunissant une moitié de la pâte résultante à laquelle est incorporée par dissolution l'initiateur de polymérisation (peroxyde de benzoyle, 0.1 % m) avec l'autre moitié de pâte à laquelle est incorporé par dissolution l'activateur (N,N-diméthyl-p-toluidine, 0.1 % m), avant de réaliser enfin rapidement le moulage. L'injectabilité n'a pas été étudiée ici. *In vitro*, dans un AMF à 100 kHz pour une amplitude de 6.4 $\text{kA}\cdot\text{m}^{-1}$ (80 Oe) le ciment contenant 80 % en masse de magnétite a atteint une température maximale de 61 °C, mais lorsque la concentration en magnétite était inférieure à 50 % en masse, la température maximale ne fut que de 40°C. Pour en connaître le potentiel *in vivo* pour l'hyperthermie, les ciments formés ont été insérés chirurgicalement dans un modèle de tibias de lapins inoculés avec une tumeur VX2, pour être ensuite soumis à un AMF de 100 kHz avec adaptation de l'amplitude sous contrôle thermométrique pour atteindre et maintenir une température du ciment implanté entre 50 et 60 °C. L'os entourant l'implant pu ainsi être maintenu dans un intervalle de température de 43 - 45 °C, ce qui révéla un effet tumoricide, alors que les tissus sains ne furent pas endommagés, sur des périodes de temps de 1 jour, 1 mois et 3 mois après traitement. De plus, la résistance mécanique de l'implant mise en évidence permettrait la stabilisation de fracture osseuse pour consolidation. Ce dernier travail démontre que la chaleur délivrée par

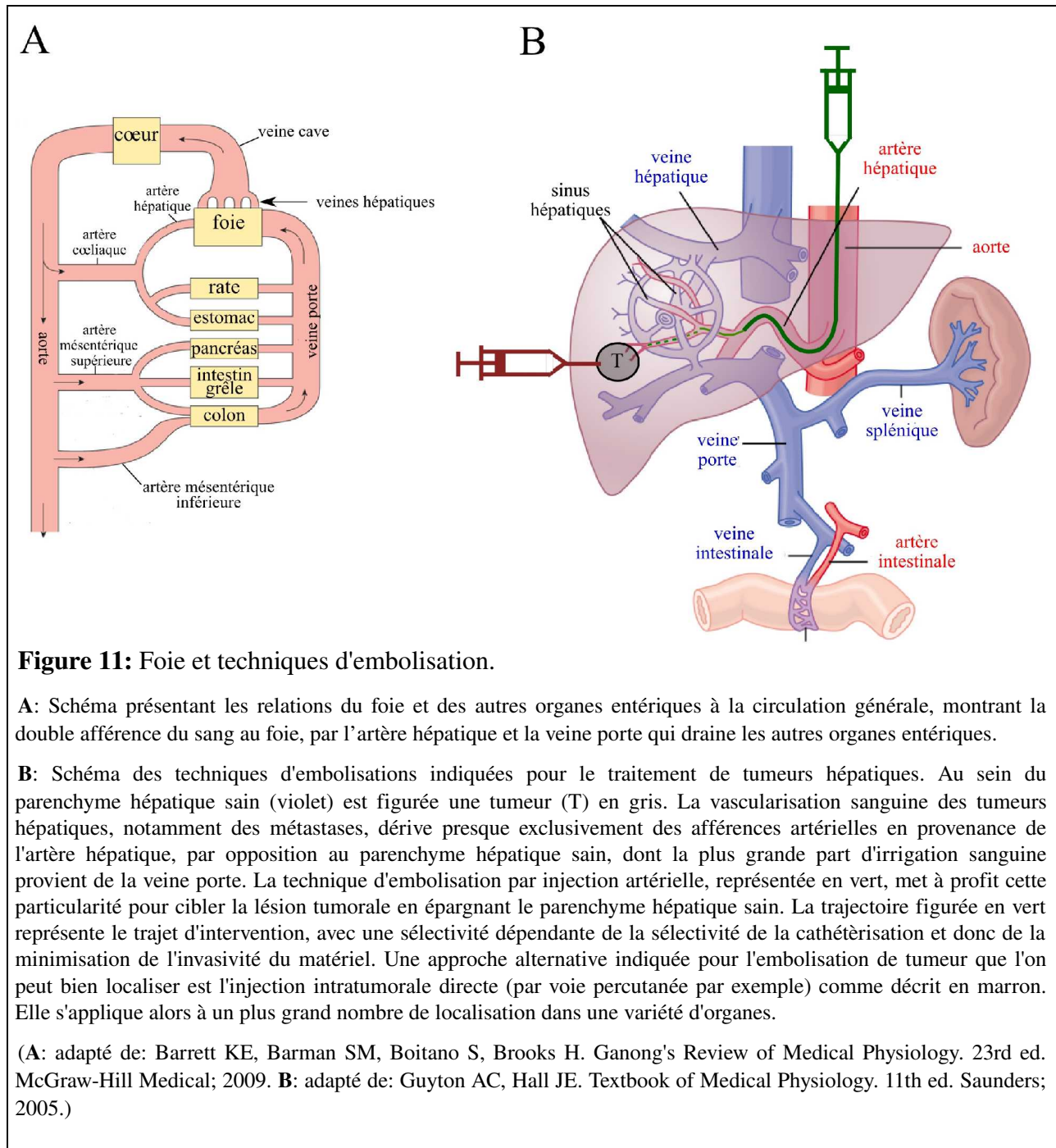
l'implant aux tumeurs osseuses, ici greffées, diminue considérablement les fractures induites des suites de l'évolution de la pathologie tumorale ainsi que la destruction de la corticale des os [287].

Dans un essai clinique non randomisé récent, l'effet du traitement par hyperthermie répété de métastases osseuses dans les extrémités d'os longs provenant de tumeurs primaires variées après chirurgie reconstructive a été étudiée. Cette chirurgie reposait pour un groupe sur le ciment calcium phosphate Biopex®-R (Pentax Corp., Tokyo, Japan; [288]). Ce ciment a été mélangé extemporanément avec 40% en masse de particules de magnétite (Fe_3O_4 , 13 μm de diamètre). Ce matériau magnétique est de premier intérêt, mais d'autres matériaux aussi à propriétés magnétiques, de nature métallique, ont bien souvent été utilisés lors de cette chirurgie reconstructive: des éléments prothétiques, plaques et clous [289]. Malheureusement, le ciment ferromagnétique n'a pas été testé isolément. Par ailleurs, la portée de cette étude est aussi affectée du fait d'une éligibilité restreinte sur critères peu clairs, et de l'impossibilité technique de traiter les localisations fémorales les plus proximales. Deux groupes témoins ont été constitués, comportant des patients pour lesquels l'intervention chirurgicale a été pratiquée seule ou, pour le deuxième groupe témoin, en association avec une radiothérapie. Dans le groupe traité par hyperthermie, les lésions furent traitées par exposition de 15 min renouvelée à 10 reprises à un AMF à 1.5 MHz avec ajustement de la puissance de sortie du générateur sous contrôle thermométrique de la température de la corticale osseuse pour y imposer une température de 43 °C. Après suivi clinique et radiographique, sur critères intermédiaires, cette étude n'a pas révélé de différence entre le groupe traité par hyperthermie et le groupe témoin traité par radiothérapie, mais, pour ces deux groupes, les résultats sont apparus meilleurs que pour le groupe témoin opération seule.

Ailleurs, selon une approche toute différente, un ciment injectable à base de sulfate de calcium, composé d'un mélange de la base minérale dégradable de CaSO_4 en poudre avec 3 % en masse de nanoparticules magnétiques brutes (70 nm de diamètre) dans l'eau, a été testé *in vivo* pour injection dans des métastases osseuses [290]. Le début de la dégradation de la matrice minérale a été observé à jour 8 post-implantation, la matrice a été remplacée après 2 semaines, par un tissu fibreux cellularisé, contenant de nombreux monocytes et des cellules multinuclées. Les nanoparticules magnétiques relarguées ont été retrouvées internalisées, notamment avec les particules de CaSO_4 , et concentrées principalement dans les cellules de lignée monocyttaire, impliquées dans le remaniement osseux par leur transformation en ostéoclastes responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire de l'os. Ces cellules ont pu alors être tuées sélectivement par hyperthermie induite magnétiquement, résultant en une limitation de l'expansion de la tumeur, but et fin avérés de cette approche [291]. Ici, cette approche pourrait particulièrement bénéficier des progrès de la chimie de surface et du revêtement des SPIONs pour parfaire leurs interactions avec les cellules ciblées [292,293]. Remarquons finalement, que les ciments à base de sulfate de calcium n'ont actuellement pas les caractéristiques mécaniques des ciments polymérisables, en particulier la résistance à la traction. Seuls les ciments polymérisables peuvent assurer une fonction de consolidation de l'os en clinique.

3 Formulations et procédures mini-invasives pour hyperthermie locale des tumeurs de tissus mous à médiation magnétique

Deux voies d'administration, et les formulations qui leur sont rattachées, seront successivement discutées en vue de l'association à l'hyperthermie: premièrement les injections intra-artérielles et procédures d'embolisation tumorale par voie artérielle (AEH: « arterial embolization hyperthermia »); deuxièmement les injections intratumorales directes.



3.1 Injections artérielles et embolisation artérielle hyperthermiques: AEH

L'embolisation artérielle consiste en l'occlusion d'un lit vasculaire pathologique, ou en lien avec une zone pathologique, par l'injection dans l'artère afférente d'une formulation dite embolisante de par ses propriétés spécifiques. L'indication modèle est le traitement de métastases hépatiques éligibles, en l'absence de contre-indications, car des particularités physiopathologiques de vascularisation au niveau du foie se prêtent tout particulièrement à cette technique [294,295]. L'irrigation du parenchyme hépatique sain est à 80% dérivée de la veine porte, alors que l'irrigation du parenchyme cancéreux d'une lésion tumorale dérive principalement de l'artère hépatique [296]. C'est ce particularisme qui permet qu'une procédure ciblant le tissu tumoral intra-hépatique au travers de ses afférences artérielles soit très avantageusement sélective, préservant au maximum le parenchyme hépatique sain et ce même si la localisation de la tumeur n'est pas connue précisément (Figure 11, p.58). Bien moins évidente et de loin moins utilisée en ce qui concerne le foie, l'embolisation par voie intra-artérielle peut être indiquée pour d'autres organes tels que le rein, le pancréas, le poumon [297] ou généralement en cas de tumeur hyper-vasculaires, au bénéfice des progrès de techniques de cathétérisation super-sélectives. Dans ces autres cas, les avantages thérapeutiques du contexte physiopathologique hépatique ne sont pas présents. L'embolisation artérielle et la chimiothérapie ou la radiothérapie ont déjà été combinées avec succès à cette approche.

3.1.1 Microparticules

Les systèmes de particules d'échelle micrométrique sont capables de se déposer dans les vaisseaux d'un diamètre donné, en relation avec celui des microparticules et les caractéristiques rhéologiques locales [298]. Les microparticules ayant un diamètre de plus de 10 μm sont capables de se déposer dans les vaisseaux pré-capillaires artériels. Les microsphères commercialisées, objet de la référence [299], ont un diamètre de 40 à 1200 μm . Pour l'embolisation intra-tumorale ou la chimioembolisation, l'intervalle idéal en taille dépend de la tumeur et doit être déterminé par l'opérateur. Pour la radio-embolisation, les SIR-spheres® (Sirtex Medical Ltd, Lane Cove NSW, Australie) et les Teraspheres® (MDS Nordion, Kanata, ON, Canada) sont des microsphères radioactives constituées respectivement de céramique ou de verre (avec un diamètre de 30 μm ou un peu moins, respectivement). Elles sont utilisées comme véhicule radio-pharmaceutique pour la radio-embolisation artérielle de lésions tumorales hépatiques [295]. Il faut noter que ces méthodes se basent non pas sur l'effet d'ischémie, mais sur les effets anti-tumoraux des radiations ionisantes émises par ces microsphères, dont la déposition est réalisée sélectivement par adéquation entre formulation et physiopathologie tumorale d'une lésion hépatique. Des particules ferromagnétiques fines: sub-domaine (SPIONs) ou multi-domaines, qui ont un diamètre inférieur à 1 μm , sont capables de circuler dans les capillaires. Bénéficiant de nombreux travaux de formulation dans le domaine des microparticules biopharmaceutiques, particulièrement la micro-encapsulation de SPIONs pour les systèmes de délivrance de principes actifs, « drug delivery », la combinaison de l'embolisation artérielle par microparticules avec l'hyperthermie magnétiquement induite dans un AMF, proposée très tôt [300], a été à l'origine de grands efforts. Jones et ses collaborateurs ont développé des microsphères d'un diamètre de 20 - 45 μm de Biopol®, un copolymère d'acide (R)-3-hydroxybutyrique avec l'acide (R)-3-hydroxyvalérique, encapsulant des nanoparticules ferromagnétiques. Ces auteurs en ont alors étudié les capacités pour l'embolisation artérielle suivie d'induction par AMF d'hyperthermie locale dans le rein, dans un modèle animal, ce qui est

comparable pour la vascularisation à une tumeur [301], ainsi que dans des modèles animaux de tumeurs hépatiques [302]. Ce dernier travail démontre la sélectivité de l'embolisation pour la tumeur hépatique, puisque les microsphères se sont localisées principalement dans et autour de la couche périphérique de la tumeur, qui inclut la néovascularisation, alors que seules quelques microsphères se retrouvèrent dans le parenchyme hépatique sain. L'injection des microsphères a eu peu d'effets secondaires et n'a pas affecté la croissance tumorale en l'absence d'hyperthermie. Leur distribution fut le paramètre le plus influant sur l'efficacité de traitement hyperthermique subséquent par induction magnétique en AMF [302]. L'embolisation par les microsphères peut de plus limiter le refroidissement par le flux sanguin [301].

3.1.2 Formulation formant un dépôt

Les formulations de dérivés iodés d'huile de graines de *Papaver somniferum*, en émulsion avec un agent de contraste pour rayons X soluble dans l'eau, sont indiquées pour lymphographie et pour la rétention de longue durée dans les carcinomes hépatocellulaires. Ces formulations se distinguent par la taille des globules de l'émulsion et par la viscosité. On peut citer, d'une part le Lipiodol®, ou Ethiodol® aux États Unis, dont la viscosité est de 430 mPa·s et d'autre part, le Lipiodol Ultra-Fluid®, produit de premier choix pour l'embolisation artérielle de carcinomes hépatiques ou de métastases hépatiques de cancer colorectal, a une viscosité de 25 mPa·s (globules d'émulsion d'un diamètre de 20 à 200 µm) [294]. Ces formulations de dérivés iodés ont été utilisées aussi pour la délivrance à des tumeurs hépatiques d'agents antinéoplasiques lipophiles ou d'iode radioactif [303]. Une certaine proportion d'internalisation cellulaire a été rapportée après déposition et émulsification au niveau de la surface cellulaire [304]. La radioembolisation est possible lorsque l'iode radiopharmaceutique ¹³¹I est incorporé (Lipiocis®) [295]. Le Lipiodol® a été étudié, pour embolisation artérielle *in vivo*, comme véhicule de SPIONs en vue de l'induction magnétique d'hyperthermie par AMF avec succès. Dans un modèle de tumeur hépatique chez le lapin, la tumeur embolisée soumise à AMF a pu être chauffée à 42 – 43°C, conduisant au développement d'une nécrose tumorale, tout en préservant les tissus adjacents, et permet un excellent contrôle local de la tumeur [305,306]. Augmenter la dose de particules d'oxydes de fer de 25 à 100 mg a conduit par contre de façon désavantageux à une diminution du ratio de concentration en oxyde de fer entre tumeur et tissus hépatiques sains, plus distants. Les auteurs ont trouvé que la déposition de cette formulation de Lipiodol® à particules ferromagnétiques était confinée aux lumens vasculaires, excluant même la possibilité de déposition extra-vasculaire dans des travaux suivants [307]. Cette procédure a été cependant associée avec une embolisation non spécifique du système biliaire extra-hépatique dépendant de l'artère hépatique, comme c'est le cas de la vésicule biliaire. En situation clinique, ceci nécessiterait de placer le cathéter au plus proche du foie, ce qui est possible par une cathétérisation super-sélective de l'artère hépatique, avec ligature en amont de l'artère gastro-duodénale et/ou cholécystectomie prophylactique [294]. De manière marginale, des aires de nécroses du tissu hépatique sain, même en l'absence de formulation, sont dues à des carences en oxygène et nutriments connexes à la procédure d'embolisation. Récemment, Takamatsu *et al* ont mixé le Lipiodol® avec une suspension de SPIONs, le Ferrucarbotran®, ayant révélé de bonnes capacités de chauffage en AMF et dont l'usage médical comme agent de contraste en IRM est autorisé. En étude pré-clinique, les auteurs ont ainsi clairement démontré un meilleur contrôle de la lésion tumorale après traitement associant embolisation et hyperthermie [308]. De plus, ils soulignent que la formulation de ces mêmes SPIONs avec des microparticules de gélatine: Gelfoam®, en lieu du Lipiodol®, a été moins efficace pour le chauffage de la tumeur modèle par

induction magnétique. Ils avancent que l'embolisation par microparticules se limite aux vaisseaux les plus larges et conduit à une distribution des particules magnétiques moins adéquate en comparaison avec le Lipiodol®, qui lui peut atteindre des capillaires plus fins. Concernant l'embolisation rénale artérielle, Mitsumori *et al* [309] ont réalisé chez l'animal une étude comparative de deux formulations contenant des particules de 70 nm en diamètre constituées de magnétite superparamagnétique en complexe avec le dextran (SPIONs de Fe₃O₄ d'un diamètre de 7 nm). Ces particules magnétiques ont été mélangé avec une émulsion de Lipiodol® pour la première formulation, *vs*, pour la seconde formulation, mélange avec des microsphères d'amidon de 40 nm en diamètre plus Iopamiron® comme agent de contraste (à noter qu'il ne s'agit pas d'encapsulation). Les auteurs rapportent une distribution équivalente pour les deux formulations, strictement limitée aux capillaires rénaux. Par ailleurs, par comparaison au cas des particules ferromagnétiques multi-domaines, l'utilisation de SPIONs semble aboutir à un SLP élevé et permettre une augmentation plus rapide de la température spécifique du rein, indépendamment de la formulation. Ceci conclut à l'équivalence de ces deux formulations pour une approche par embolisation artérielle en vue d'un traitement hyperthermique.

3.2 Injection intra-tumorale directe et hyperthermie (DIH: direct injection hyperthermia)

3.2.1 Formulation formant un dépôt

Pour le traitement local de tumeur, l'injection intra-tumorale peut être réalisée en plaçant une aiguille directement dans la tumeur, en alternative des abords proximaux au travers de l'artère afférente utilisé pour embolisation hépatique artérielle (Figure 11, p.58). Cette approche nécessite alors impérativement que la tumeur puisse être visualisée. Les formulations formant un dépôt *in situ*, telles que le Lipiodol®, utilisées précédemment pour embolisation artérielle, peuvent être utilisées pour injection intra-tumorale. Il en résulte le plus souvent une embolisation tumorale qui relève de la capacité du Lipiodol® à diffuser de l'interstitium vers le lumen de vaisseaux et de s'y déposer (peut-être, la capacité du dépôt à collaber les tissus serait aussi à envisager). Cette technique est dès lors classée sous la dénomination générale de « technique d'embolisation tumorale », qui ne fait que peu de cas des détails de cette embolisation, notamment la voie d'injection. Dans un modèle murin d'hépatocarcinome, après mise en place de l'aiguille en intra-tumoral et injection d'une formulation consistant en une suspension de particules magnétiques dans le Lipiodol®, Muraoka *et al.* ont pu emboliser le lit vasculaire tumoral et induire magnétiquement une hyperthermie locale [310]. Dans un AMF, les microparticules de ferrites de magnésium d'un diamètre de 2-5 µm utilisées produisent la chaleur par pertes par hystérèse, le chauffage étant borné par un point de Curie, T_c, de 77°C. Les auteurs ont ainsi pu chauffer les tumeurs à 42 – 43°C, en obtenant une nécrose spécifique et importante au sein du volume tumoral, de façon encore plus marqué si une injection systémique concomitante de doxorubicine était effectuée.

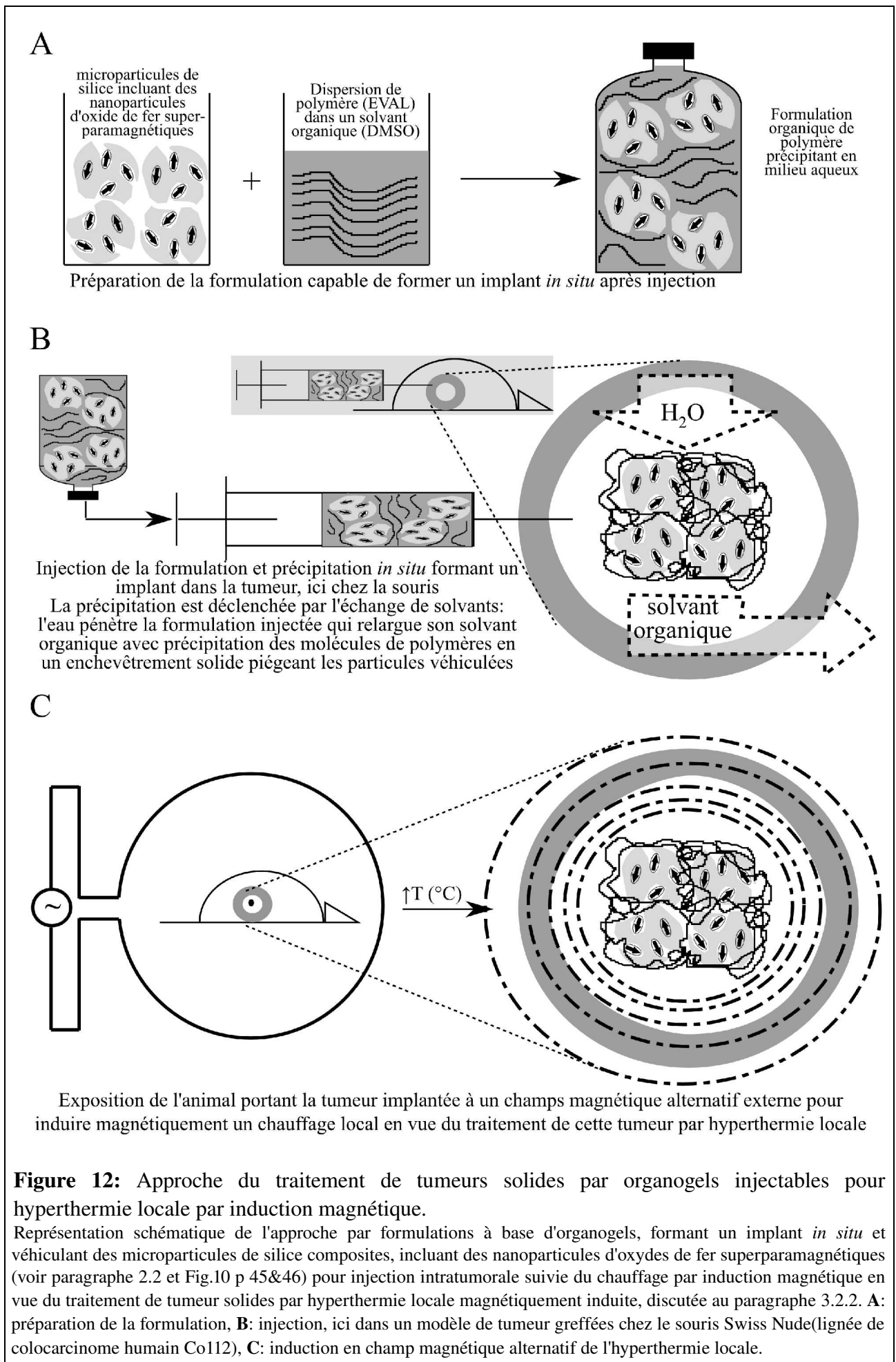
Dans un modèle tumoral constitué par la greffe de cellules de carcinomes VX2 dans le foie de lapins, Moroz *et al* ont comparé la réponse tumorale obtenue par traitement hyperthermique magnétiquement induit après embolisation artérielle par microparticules avec la réponse tumorale obtenue par le traitement hyperthermique magnétiquement induit après injection intra-tumorale directe d'une formulation pour embolisation à base de Lipiodol® [311]. Les nanoparticules de maghémite, d'une taille de 100 - 200 nm, qui confèrent les propriétés magnétiques aux formulations,

ont été dans le premier cas encapsulées dans des microparticules d'un diamètre de 32 μm , à base de polyesters d'acide butanoïque (acide butyrique) et pentanoïque (acide valérique), et, dans le second cas, mises en suspension dans un mélange d'Histoacryl® - Lipiodol® pour un rapport en volume de 2:1. Les auteurs concluent à la plus grande efficacité en terme de contrôle de croissance tumorale avec les microparticules pour l'embolisation artérielle qu'avec l'injection directe intratumorale de la formulation à base de Lipiodol®. La discussion de ces résultats concerne principalement la distribution des particules magnétiques et de la chaleur produite. Mais ils précisent que ceci doit être prolongé par la discussion des paramètres intrinsèques liés à chaque procédure d'injection, tels que la sélectivité et la spécificité pour le tissu tumoral, qui sont moindre en cas d'injection directe intra-tumorale. Le contrôle de croissance tumorale est aussi très directement dépendant des paramètres thermométriques et donc indirectement de la chaleur produite selon les mécanismes de pertes produisant la chaleur. Les relations subtiles entre procédure d'injection et chauffage doivent être prises en considération, avec encore plus de précautions en ce qui concerne la procédure d'embolisation artérielle. Premièrement, les effets de la diminution de l'apport en oxygène et en nutriment ne doivent pas être négligés, même si cela n'apparaît pas directement lors des injections contrôlées de particules [302]. Deuxièmement, une diminution des capacités de refroidissement s'associant avec la diminution du flux sanguin est très probable. Malheureusement, cette étude ne permet pas de différencier directement l'impact de la formulation de ceux associés à la procédure.

À cet égard, des études comparant exactement la même formulation, à base de Lipiodol® principalement, mais aussi de microparticules, administrée selon ces deux procédures, voie intra-artérielle ou intra-tumorale directe, apporteraient des informations cruciales pour mieux comprendre ces modalités (de dénominations anglaises abrégées: AEH et DIH, respectivement).

3.2.2 Formulations formant un implant *in situ*

D'autres formulations solidifiant *in situ*, d'usage moins répandu, peuvent être aussi utiles, aussi bien en injection intra-tumorale, qu'en injection intra-artérielle pour cibler une tumeur solide. De telles formulations ont déjà été développées pour le traitement d'anévrismes en radiologie interventionnelle [312], ainsi que comme alternative en vertèbroplastie, et comme agent de comblement en urologie [313]. Les formulations à base d'hydrogels ou d'organogels ont été testées pour l'injection intra-tumorale directe véhiculant des microparticules de silice, dans lesquelles des SPIONs sont inclus pour permettre l'induction magnétique d'hyperthermie en AMF [314]. Les mécanismes de formation des implants étudiés reposaient sur la précipitation d'un polymère, le cross-linking par interaction ionique ou la modulation thermique d'interactions hydrophobes. Pour en cerner *in vivo* les capacités de chauffage de tumeurs solides après injection intratumorale directe, une formulation d'organogel à base d'éthylène-alcool vinylique (« ethylene-vinyl alcohol », EVAL) dans le diméthylsulfoxyde (« dimethyl sulfoxide », DMSO) à 8% m/v a été retenue. Cette formulation, similaire au produit commercial: Onyx®, utilisé pour l'embolisation d'anévrismes, a été préférée de par la possibilité d'y incorporer la fraction de microparticules magnétiques la plus grande possible, jusqu'à 40 % m/v, tout en préservant une injectabilité et une viscosité acceptable [315]. Le mécanisme de formation de l'implant est ici la précipitation par désolubilisation lors de l'échange du solvant organique avec l'eau tissulaire (Figure 12, p.63). Cette précipitation occasionne l'enchevêtrement des molécules de polymère. Dans un modèle d'étude murin formé par greffe sous-cutanée de colocalcarinome humain, la toxicité systémique du solvant organique chez la souris limita le volume d'injection à 0.25 mL. Ce volume était cependant assez important en comparaison avec le



volume tumoral moyen: 200 mm³, bien qu'il faille tenir compte de la réduction de volume après précipitation, associée à l'enchevêtrement. Dans le groupe témoin subissant une injection intratumorale directe (comme pour l'injection de Lipiodol®, par opposition à la voie artérielle) sans chauffage, l'implant s'est localisé dans le cœur nécrotique de la tumeur avec des prolongements interstitiels en périphérie, dans les zones vitales de la tumeur et la capsule pseudo-stromale dans le cas des nodules tumoraux les plus petits. Les capillaires tumoraux n'ont été que rarement embolisés, par comparaison avec le Lipiodol®, de par la capacité de ce dernier à diffuser largement dans le lumen vasculaire et à occlure les capillaires. En addition de l'occlusion vasculaire, un effet de collapsus vasculaire ne peut être exclu. Les microparticules furent efficacement piégées dans la matrice polymérique *in situ* et leur dissémination presque totalement évitée. La réaction locale à l'injection intra-tumorale consista en un œdème du site tumoral, réversible en 24 h. Ceci peut être associé à l'inflammation de la bande de tissu en contact avec l'implant, siège d'une infiltration de phagocytes. D'ailleurs, cette réaction a été observée pour de proches formulations injectables formant à base d'organogels de nature variée, ainsi que d'hydrogels, formant aussi un implant *in situ* [314]. Le jour suivant l'injection de la formulation précipitante organogel à base d'EVAL 8% m/v dans le DMSO, les groupes de traitements ont été soumis à 20 min d'induction magnétique d'hyperthermie dans un AMF à 141 kHz pour des amplitudes d'induction: 9, 10, 10.5, 11 et 12 mT. La température intra-tumorale a augmenté rapidement (en 5 min) pour atteindre un plateau, en moyenne à 40, 42.5, 42.9, 43.5 et 47.8 °C, respectivement pour chaque amplitude d'induction, et ces températures restèrent constantes pendant toute la durée du traitement (Figure 13, p.65&66). En histologie, la nécrose induite par la chaleur était directement reliée à la distribution de l'implant. Une nécrose tumorale très importante (dépassant avec certitude l'étendue de nécrose spontanée) ne fût observée que pour le groupe soumis à une induction de 12mT. Une expérience de survie après traitement a été menée en parallèle dans cette étude, et des survies médianes de 12, 21, 27, et 37 jours ont été respectivement observées pour le groupe contrôle sans injection et sans chauffage, le groupe contrôle avec injection mais sans chauffage, et les groupes traités par hyperthermie pour des amplitudes d'induction de 10 et 12 mT. Pour les groupes traités à 10 mT et 12 mT, la proportion de réponses complètes était de 1 sur 7 et de 5 sur 11, respectivement (Figure 13, p.65&66). À la lumière de considérations biologiques précédentes, les effets des solvants organiques sur ces résultats peuvent être discutés. L'étude *in vitro* de survie cellulaire rapportée par Hahn [316] montre que des cellules cultivées dans un milieu contenant un solvant organique hydrophile, en l'occurrence le DMSO ou le diméthylformamide, aux doses de 1 ou 2% dans le milieu de culture (ce qui peut être extrapolé en cytotoxicité à une dose cytotoxique intermédiaire), acquièrent une thermotolérance à partir de 8 h de contact, se développant complètement en 18 à 24 h. Le mécanisme de l'induction de la thermotolérance semble plus complexe que celui de la thermotolérance induite par les solvants organiques aliphatiques, dont l'induction se déroule presque exclusivement au niveau de la membrane cellulaire. En effet, une normalisation des concentrations de solvants aliphatiques dans le milieu de culture nécessaires pour observer une induction de thermotolérance maximale par le coefficient de partage du solvant entre membrane et milieu de culture révèle une constance. Dans ce cas précis, la thermotolérance, déjà complètement développée dans les premières heures, est corrélée avec un taux de synthèse accru des HSPs: HSPA1 (HSP70), HSPC1 (HSP87) et HSPH2 (HSP110). Le coefficient de partition du DMSO dans la membrane n'est pas négligeable mais faible par contre, et les auteurs proposent pour de tels solvants organiques hydrophiles la possibilité d'un mécanisme cytosolique de l'induction de thermotolérance. Compte tenu de l'hydrophilicité du DMSO, et de la discussion menée en partie 1, on peut supposer que les gènes *HSPs* puissent être induits par interférence avec la synthèse protéique, conduisant à l'accumulation de protéines non natives, ce que l'on connaît comme stress protéotoxique principal avec l'éthanol. Les concentrations de HSPs n'ont pas été déterminées dans l'étude *in vivo* des organogels composés de ces solvants

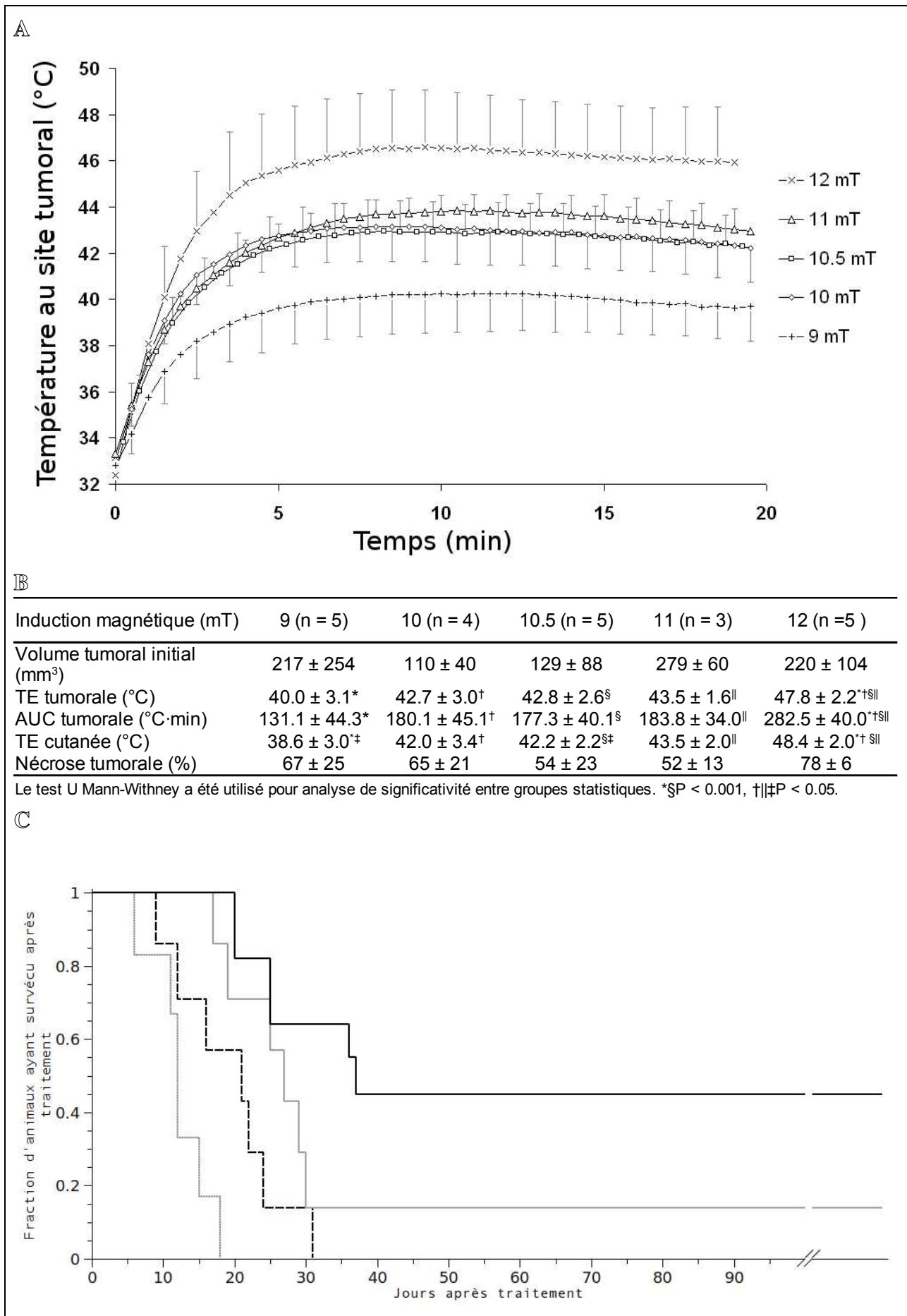


Figure 13: titre et légende page ci-contre

Figure 13: Étude *in vivo* des organogels formant un implant *in situ* piégeant les particules magnétiques véhiculées pour injection intra-tumorale en vue du traitement de dans un modèle de tumeur solide par hyperthermie locale induite magnétiquement.

Un volume de 0.25 ml de formulation d'organogel (éthylène-alcool vinylique dans le diméthylsulfoxyde à 8% m/v) a été injecté dans des tumeurs de colocalcarinoma humain Co112 greffées en sous-cutané chez la souris. Un jour après implantation fut pratiquée une séance d'hyperthermie induite magnétiquement de 20 min par exposition à champ magnétique alternatif (AMF) à la fréquence constante de 141 kHz pour des amplitudes d'induction croissante: de 9 à 12 mT. La thermométrie fut réalisée par sondes fluoro-optiques.

A. Thermogrammes représentant la température de la tumeur en fonction du temps, durant une simple exposition de 20 min à hyperthermie magnétiquement induite dans un AMF, pour des valeurs d'induction de 9 mT (n = 5), 10 mT (n = 4), 10,5 mT (n = 5), 11 mT (n = 3), 12 mT (n = 5). À noter le nivellement des températures moyennes d'équilibre autour de 43°C pour les inductions de 10, 10,5 et 11 mT. Ceci contraste avec la température de 46 °C obtenue pour une valeur d'induction de 12 mT. Une hypothèse en est le rôle important des effets de refroidissement par la néovascularisation en relation avec la probable thermotolérance induite par les solvants organiques (voir texte, paragraphe 3.2.2).

B. Tableau regroupant les résultats importants de cette étude (exprimés en moyenne ± déviation standard). TE est la température à l'équilibre définie dans cette étude comme la température moyennée pour les 15 dernières min d'induction de la séance d'hyperthermie. AUC est l'aire sous la courbe du thermogramme (« area under curve ») qui se rapproche d'une quantité de chaleur administrée.

C. Études parallèles de survie après traitement. Ligne pointillée grise: groupe témoin, n = 6; ligne noire en tirets: groupe contrôle implanté, n = 7; ligne continue grise: groupe traité par induction à 10,5 mT, n = 7; ligne continue noire: groupe traité à 12 mT, n = 11. Dans le groupe 12 mT, 5 des 11 souris ont survécu 12 mois après traitement sans rechutes.

Remarque: aucune élévation de la température corporelle périphérique n'a été enregistrée.

Adapté de la référence [315].

organiques (Figure 13) mais on peut supposer qu'elles sont élevées dans les 48 h suivant l'injection.

Un scénario similaire à celui rapporté par Hahn peut être réalisé après l'injection d'organogels car l'échange et l'élimination de solvant qui apparaît peu rapide *in vitro* doit être aussi lente *in situ*. De plus grandes doses de solvants peuvent être aussi atteintes localement avec pour corollaire une cytotoxicité directe. Ceci pourrait expliquer en partie l'œdème et le délai de recroissance tumorale observé pour le groupe injecté mais non traité par rapport au groupe témoin. Il est encore plausible que les cellules survivant à l'exposition au DMSO présentent HSPA1 (HSP70) au niveau externe de la membrane cytoplasmique, qui, comme décrit en introduction, déclenche une cytotoxicité par l'intermédiaire des cellules NK (il faut noter que ces cellules immunitaires sont encore présentes chez les souris immunodéficientes athymiques telles que les Swiss Nude utilisées dans ce modèle). Il est aussi important de considérer que l'ischémie et l'hypoxie induites par l'embolisation ou le collapsus vasculaire probable puissent contribuer à l'induction des HSPs [121] et que cela puisse aussi interférer avec les cinétiques d'induction de thermotolérances, tout comme la carence en nutriment connue pour diminuer la vitesse d'acquisition d'une thermotolérance *in vitro* [317]. Néanmoins, pour les groupes implantés et traités, au moment du traitement hyperthermique, il paraît raisonnable de penser que l'injection de l'organogel a de toute vraisemblance induit une thermotolérance. En fait, les résultats de cette étude suggèrent que le tissu tumoral semble bénéficier d'une protection contre l'hyperthermie modérée à température inférieure à 45 °C, alors que la nécrose se manifeste abruptement à température et dose de chaleur plus élevées. Ceci est à mettre en parallèle de la considération au sujet des cellules thermotolérantes, avec de hauts taux de HSPs, qui sont protégées contre l'apoptose à température modérée mais encore sensibles à la nécrose pour des températures plus élevées. Il faut cependant noter que ceci peut être protecteur pour les tissus sains. En fait, aucun endommagement n'a été observé pour les muscles ou le péritoine sous-jacent mais la peau fut endommagée de la même manière que la tumeur, et très parallèlement en terme de

température. Les températures élevées observées pour une amplitude d'AMF de 12 mT contrastent avec le nivellement des températures pour les valeurs d'induction inférieures à 12 mT. Ceci nous conduit à considérer les effets de la chaleur sur les vascularisations de la tumeur et des tissus sains avoisinants et sur la modulation des mécanismes de refroidissement associés en intégrant également la thermotolérance très probablement induite par l'injection intra-tumorale de l'organogel. Il peut être avancé que la thermotolérance de la vascularisation tumorale induit un décalage des seuils de sensibilité aux dégâts irréversibles occasionnés par la chaleur, de 42°C à 44 – 45°C. De même, selon ce point de vue, la thermosensibilité des tissus sains adjacents doit aussi être décalée. Au-delà de 44 - 45°C, l'effet nécrotique direct de la chaleur ne peut plus être contenu, même par un état de thermotolérance, indépendamment du taux de HSPs. L'endommagement irréversible de la vascularisation tumorale, avec abolition des effets refroidissant, pourrait alors permettre que les températures atteignent des valeurs très élevées, comme celles qui ont été effectivement observées pour un induction de 12 mT, jusqu'à 47.8°C en moyenne. Concernant les tissus sains proches, on peut postuler que la thermotolérance soit due à la certaine diffusion tissulaire des solvants organiques, mais cette possibilité ne peut être fermement assurée du fait d'une réponse divergente entre tissus sous-jacents et peau sus-jacente (à ce niveau peuvent être impliquées des particularités anatomiques et physiologiques en relation avec la sensibilité à l'endommagement par les solvants). Rassemblant ces considérations, des compléments d'étude des organogels en vue de l'hyperthermie apparaissent nécessaires. Les investigations des effets immunologiques en lien avec une telle complexité d'induction des *HSPs* nécessiteraient un modèle chez l'animal immunocompétent pour être pleinement instructives. Du point de vue du traitement par hyperthermie visant une cytotoxicité directe (à but cytoréductif) par le biais de cette formulation d'organogel, la séquence entre injection et chauffage doit être impérativement adaptée en tenant compte de la cinétique de thermotolérance. Alternativement, les formulations à base d'hydrogels et leur utilité en embolisation pourrait être intéressante, mais leur capacité de chauffage apparaissent pour lors plus limitées [314]. Les formulations d'organogels peuvent encore être adaptées par addition de co-solvants moins toxiques tels que le propylène glycol ou le polyéthylène glycol [314]. La fraction solide incorporable dans ces cas de figure, généralement inférieure, pourrait bénéficier des récents développements des systèmes particuliers de matériaux verre-céramiques pour augmenter les capacités de chauffage par induction magnétique. Les effets de thermotolérance au niveau de la vascularisation tumorale doivent être approfondis par des études de perfusion sanguine pour confirmer les effets de dissipation de chaleur suggérés. Les inconvénients pour un traitement hyperthermique isolé à visée cytoréductrice, flux sanguin et capacité de refroidissement élevés mis à part, ceci peut être extrêmement avantageux lorsqu'en retour on recherche une synergie avec la radiothérapie ou la photochimiothérapie, grâce à l'oxygénation associée [318], ou à la recherche d'effets pharmacocinétiques supra-additifs avec la chimiothérapie et d'effet de ciblage, notamment de formes galéniques spécifiques, par augmentation de la disponibilité tumorale. Après le déclin spontané de la thermotolérance, les capacités cytotoxiques du traitement hyperthermique seront intégralement retrouvées.

Pour conclure à propos du traitement sélectif de la tumeur par hyperthermie locale, en ce qui concerne les approches abordées ici, les travaux théoriques soulignent que l'impact de la formulation sur la génération de la chaleur est primordial [319,320]. Ceci s'axe principalement sur la distribution des particules magnétiques pour la qualité du chauffage et sur les modulations du flux sanguin quant aux refroidissements par dissipations de la chaleur générée. Ces études préliminaires ne permettent pas l'évaluation de la perfusion sanguine subsistant après injection intratumorale directe d'une formulation donnée. Cette connaissance permettrait d'adapter la formulation plus

précisément pour les besoins d'un traitement hyperthermique et pourrait contribuer à résoudre l'important problème du peu de contrôle dans la délivrance de doses cytotoxiques de chaleur.

4 Liposomes magnétiques et hyperthermie locale pour le traitement de tumeurs

4.1 Caractéristiques générales des liposomes

Les liposomes sont de petites vésicules (20 à 4000 nm) consistant en une bicouche lipidique (lipophile), uni- ou multi-lamellaire, qui sépare une cavité interne aqueuse (hydrophile) de l'environnement lui aussi aqueux (hydrophile) [321]. Des lipides de composition et charges variées sont utilisés, habituellement les glycéro-phospholipides et les lécithines. Trois catégories de liposomes sont distinguées en fonction de la charge de surface de la vésicule: liposomes neutres, anioniques et cationiques [322]. Classiquement, la phosphatidylcholine (lécithine) est le composant majeur des liposomes neutres. Le dimyristoyl-phosphoacylglycérol (DMPG) et le dipalmitoyl-phosphoacylglycérol (DPPG) sont souvent présents dans la composition des liposomes anioniques. L'octadécylamine (ou stearylamine) et le N-(2,3-dioléoyloxy-1-propyl)triméthylammonium méthylsulfate (DOTAP) représentent des composants de liposomes cationiques respectivement de première et seconde génération [323]. *In vivo*, il est connu que les liposomes adsorbent de nombreuses macromolécules biologiques, les protéines plasmatiques particulièrement (telles que la lipoprotéine A) et des composants protéiques participant à la réponse immunitaire comme les fractions du complément ou les immunoglobulines, notamment quand elles sont agrégées par la chaleur [324]. Pour application médicale, les liposomes sont largement utilisés comme véhicules pour les acides nucléiques ou certains principes actifs. Les principes actifs hydrophiles sont chargés dans la cavité aqueuse; les principes actifs neutres ou hydrophobes sont eux chargés par séquestration dans la ou les membranes lipidiques. Les liposomes sont aussi d'importants immunoadjuvants. Leur profil pharmacocinétique dépend de la taille et la charge du liposome (en tenant compte des phénomènes d'adsorption de surface) et de la voie d'administration [325]. Les particularités pharmacocinétiques de la formulation liposomale peuvent être présentées en référence aux généralités que l'on associe à la majorité des principes actifs en l'absence de formulation. Les liposomes ont notablement: i) un temps de circulation plus long (proportion gardée, notamment en référence avec des principes actifs de très longue demie-vie, tel que l'amiodarone), ii) subissent une large accumulation dans les tissus riches en cellules phagocytaires, iii) une rétention tissulaire accrue, et, iv) une protection contre la dégradation métabolique et l'élimination bien supérieure à ce qui est observé pour le principe actif seul. Principalement administrés par voie parentérale, les liposomes peuvent rester intacts pour des périodes de temps relativement longues, en relation avec la voie parentérale choisie. Cette propriété a été très utilisée pour l'infiltration synoviale, l'injection sous-cutanée (on les sait capables de persister dans la peau de souris jusqu'à 600 h) et pour l'injection intra-tumorale. Par voie intraveineuse, les liposomes conventionnels ont une demi-vie plasmatique courte à cause de leur capture non spécifique, avec un taux élevé de capture par le système phagocytaire [325]. La demi-vie plasmatique peut être améliorée par PEGylation, ce qui augmente aussi leur injectabilité, en prévenant leur agrégation [322]. La présence de charges négatives sur la surface des liposomes accroît leur capacité d'extravasation au travers des endothéliums fenestrés [326]. Les fenestrations sont présentes physiologiquement dans le foie, la rate et l'os, ainsi que dans certaines conditions pathologiques telles que dans l'inflammation ou dans les tumeurs solides et sont particulièrement ouvertes lors de l'hyperthermie. Les liposomes cationiques interagissent fortement avec les membranes chargées négativement et sont donc préférés

pour la délivrance intra-cytoplasmique, très utile pour les acides nucléiques. Ils se sont aussi révélés capable de cibler les cellules endothéliales de tumeurs [322]. Les formulations liposomales de principes actifs spécifiques combinées avec une technique d'hyperthermie pour moduler leur délivrance doivent être distinguées des formulations de liposomes en tant que véhicule de particules magnétiques qui permettront de générer une hyperthermie par induction magnétique. Ces dernières nous intéressent plus particulièrement et sont détaillées dans la référence [327]. Il est aussi important de garder à l'esprit que les interactions des liposomes avec les cellules impliquent des mécanismes bien distincts [328], tels que: i) fusion avec les membranes biologiques, ii) endocytose de vésicules intactes, iii) adsorption de vésicules ou fragments de vésicules à la surface cellulaire sans véritable incorporation des composants de la vésicule, iv) transfert ou échange de phospholipides (et, on peut le penser, de protéines) entre la vésicule et la membrane plasmique, et finalement, v) toutes combinaisons de ces mécanismes. Les liposomes multi-lamellaires se distinguent des liposomes uni-lamellaires puisque la fusion de leur couche externe avec la membrane plasmique résulte en l'introduction dans le cytoplasme du reste de la vésicule constitué de ses sous-couches lamellaires internes subsistantes, ce qui permet plus en aval l'interaction avec les organelles, principalement les lysosomes [328]. Avec certains liposomes de composition lipidique spécifique on peut même obtenir un ciblage de la mitochondrie [329]. Ces propriétés importeront pour l'explication des synergies d'effets cytotoxiques observés entre hyperthermie et liposomes cationiques vides multi-lamellaires mais non uni-lamellaires [330].

4.2 Magnétoliposomes et hyperthermie locale de la tumeur par induction magnétique

Les liposomes contenant des particules magnétiques, appelés magnétoliposomes (MLs), permettent d'induire une hyperthermie dans un AMF. Généralement, les procédures de préparation les plus directes de MLs résident en l'encapsulation d'un ferrofluide dans la cavité aqueuse. L'incorporation dans la membrane a été moins fréquemment décrite [241], alors qu'originellement suggérée pour déclencher un pic de relargage d'un principe actif encapsulé quand soumis à AMF, par rupture de la membrane liposomale [327].

Les nombreux travaux de Kobayashi *et al* intéressent de nombreux aspects de l'hyperthermie à médiation magnétique par les magnétoliposomes cationiques, CMLs, ou les magnétoliposomes neutres, NMLs.

Les CMLs peuvent être préparés en encapsulant des colloïdes de magnétite nanoparticulaire dans un liposome constitué de: N- α -triméthylethylammonioacetyl dododecyl-D-glutamate chloride/dilaurylphosphatidylcholine/ diolel-phosphatidylethanolamine, dans un rapport de 1/2/2, par sonication. Bien que non précisée, la structure multi-lamellaire est la plus probable selon ce mode de fabrication et en l'absence d'étape de criblage supplémentaire [331-333]. La taille des particules magnétiques encapsulées était de 35 nm dans les premiers articles puis de 10 nm dans les derniers [334-338]. Dans un gel d'agar, la concentration de magnétite (35 nm de diamètre) minimale requise pour élever la température au-delà de 42 °C fut de 5 mg de magnétite par gramme de la formulation de CMLs [334]. Après 4 h d'incubation de cette formulation dispersée dans le milieu de culture de cellules T9 de gliome de rat, à une concentration en magnétite de 22 mg par ml de milieu (au-delà de laquelle une cytotoxicité est observée), le culot cellulaire, après lavage et centrifugation, mettait en évidence une concentration de 5 mg·ml⁻¹, ce qui correspond à une concentration rapportée de 55 pg pour une cellule de la population comptée. Cette concentration est 10 fois supérieure que lorsque que l'on a recours à des magnétoliposomes neutres, du fait d'interaction plus favorable des CMLs

avec la membrane cellulaire négativement chargée. Quand le culot cellulaire fut soumis à AMF, en contrôlant l'amplitude pour maintenir une température de 42°C pendant 30 min, la survie cellulaire est très faible. Les auteurs ont noté que la courbe dose-effet ne suivait pas la relation d'Arrhenius contrairement à ce qu'on pouvait attendre des seuls effets de la chaleur [83]. Ceci est à relier à l'aptitude générale des liposomes à fusionner avec les membranes et à altérer la physicochimie du plasmalemme ou des membranes des organelles, en rappelant que cette dernière aptitude concerne les liposomes multi-lamellaires [330]. La synergie entre hyperthermie et liposomes au niveau de la déstabilisation et l'endommagement membranaire pourrait expliquer la cytotoxicité particulière observée. Après avoir injecté le culot cellulaire contenant les CMLs ainsi qu'obtenu précédemment chez le rat par voie sous-cutanée, suivi directement du chauffage induit par le régime précédent d'AMF, maintenu alors 60 min, pour exposition simple ou répétée trois fois à 12 h d'intervalle, la formation du nodule tumoral a été prévenue chez 80 % et 100% des animaux dans les cas d'exposition simple ou répétée, respectivement [335]. Tous les nodules tumoraux greffés se formèrent après 11 jours, alors qu'ils étaient présents 6 jour pour le groupe contrôle sans chauffage par AMF. Des études *in vivo* ont alors été conduites avec nodules tumoraux déjà développés par injection intratumorale directe de CMLs, pour s'assurer d'une concentration de CMLs et de capacités de chauffage suffisamment élevées. Dans ce modèle hétérotopique à cellule de gliome de rat T9, le schéma de traitement hyperthermique étudié consistait en une simple exposition à AMF (11 jours après l'injection de CMLs) dont l'amplitude était modulée afin de maintenir une température de 44°C au niveau de la peau subjacente, ceci étant répété une fois ou deux à 24 h d'intervalle [336,337]. La distribution intra-tumorale des CMLs se confina au trajet d'injection. Le chauffage efficace a permis d'atteindre la température cible rapidement, après quoi la nécrose développée après traitement par exposition simple concorda avec la distribution des CMLs, laissant les zones de la tumeur plus distantes intactes. Comme problématique récurrente dans la délivrance de chaleur, les inhomogénéités dans la distribution des CMLs s'associèrent avec une distribution de chaleur non uniforme. Néanmoins, après répétition de l'induction par AMF, la nécrose s'étendit à toute la tumeur. Il a été alors observé en parallèle un taux de réponse complète et une probabilité de survie accrus. Les CMLs semblent disparaître de leur confinement originel au trajet d'injection. La diffusion de la nécrose dans la tumeur après répétition du traitement a été attribuée par les auteurs à l'effet dit « thermal bystander effect », originalement décrit pour des nanoparticules de magnétite sous forme de ferrofluide et qui suppose que leur migration intra-tumorale et diffusion à l'ensemble de la tumeur soient spécifiquement induites par le traitement hyperthermique, en comparaison avec un cas de figure témoin injecté mais non traité par hyperthermie. Cela peut se comprendre comme la migration de proche en proche des particules magnétiques après mort cellulaire et libération pour internalisation par les cellules survivantes. Ici dans notre cas, qui concerne des CMLs, aucune évidence ne vient supporter cette hypothèse, puisque, malheureusement, aucune démonstration histologique univoque par coloration au Bleu de Berlin n'a été réalisée pour les tumeurs ayant subi une répétition d'induction par AMF, comme elle le fut fructueusement pour la recherche de migration de particules dans la rate. Le « thermal bystander effect » a été en fait décrit originalement pour la MFH (« magnetic fluid hyperthermia ») avec nanoparticules magnétiques recouvertes de dextran, mais non lorsque la couverture de surface fut à base d'aminosilane [245,339,340]. Au plan biologique, un mécanisme supplémentaire a été décrit dans la référence [341]. Cette étude *in vitro*, menée pour comprendre la propagation de brûlures à des zones non chauffées de la peau que l'on peut observer lors de certaines photochimiothérapies, démontre élégamment que pour les cellules non chauffées placées en co-culture par « insert » avec des cellules préalablement traitées par hyperthermie, un endommagement de l'ADN, l'apoptose et une diminution de la survie sont induits en l'absence de quelconques chauffages, diffusions de chaleur ou contact cellulaire. Cet effet « bystander » distinct, biologiquement fondé, qui est véhiculé par des

facteurs de milieu au travers d'une membrane a ainsi été appelé par ces auteurs « active thermal bystander effect », ATBE. Les médiateurs de cet ATBE ne peuvent encore être discriminés, mais les auteurs envisagent de futures expériences pour étudier le rôle des ROS (communication personnelle). Il faut encore envisager qu'un autre mécanisme basé sur la réponse immunitaire puisse permettre l'extension de la nécrose au travers de la tumeur sur lequel se fonde les concepts de « thermal bystander effect », et plus spécialement encore pour les expériences avec CMLs. En plus de la nécrose occasionnée par la cytotoxicité directe de la chaleur, la nécrose tissulaire inflammatoire concomitante et les dommages occasionnés par les cytokines ou autres médiateurs libérées par les cellules immunitaires ou autres, tout aussi bien que la lyse et mort cellulaire des cellules tumorales occasionnées par les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK, doivent être considérés. Questionnant le statut immunitaire, des épreuves de renouvellement de la greffe des mêmes cellules tumorales révèlent un état d'immunité occulte actif ou l'activation d'une réponse de l'immunité innée [337,338]. Presque tous les animaux pour lesquels une régression tumorale complète a été observée en réponse à l'hyperthermie magnétiquement induite par CMLs se sont révélés réfractaires à l'épreuve du renouvellement de la greffe par les mêmes cellules tumorales. Les animaux pour lesquels la réponse tumorale ne fut que partielle ou avec rechute après une période de régression se révélèrent sensible au test de la ré-épreuve par greffe des mêmes cellules tumorales, qui occasionna à nouveau le développement de nodules tumoraux [337,338]. De plus, l'immunité résiduelle induite par le traitement hyperthermique apparut spécifique des antigènes tumoraux de transplantation: les TATA (« tumor-associated transplantation antigens » [342]) spécifiques de la lignée cellulaire utilisée: glioblastome T9, puisque l'épreuve de renouvellement d'une greffe, cette fois par une autre lignée transformée (TATA négative), ne montra aucune réactivité croisée.

Dans ce même modèle expérimental chez l'animal, l'importance du système immunitaire fut encore soulignée par des études complémentaires avec greffe sous-cutanée bilatérale. Après régression de la tumeur traitée, la tumeur contralatérale non traitée (ni injection de CMLs, ni chauffage) régressa aussi. Avec exactement le même modèle de nodule tumoral greffés, mais cette fois chez le rat athymique, donc immunodéficient, ce résultat ne pu être obtenu. Ceci est un argument fort pour qu'intervienne une réponse immunitaire cellulaire chez les animaux immunocompétents. Des analyses immunohistochimiques font apparaître un scénario probable qui impliquerait l'activation au sein de la zone de nécrose comme de la zone vitale de la tumeur traitée de cellules NK et de lymphocytes T positifs pour les clusters de différenciation: CD-3,-4 et -8, alors capables de migrer et d'infiltrer la tumeur contralatérale, phénomène absent des contrôles. En clinique, l'infiltration par les lymphocytes est un critère de pronostic favorable [343-346]. Après avoir récolté les lymphocytes spléniques, l'étude *in vitro* de leur cytotoxicité s'est révélée spécifiquement induite et augmentée par le traitement hyperthermique. Deux mécanismes de présentation d'antigène important pour l'immunité spécifique, c'est-à-dire adaptative, ont été plus intensément étudiés en rapport avec l'hyperthermie à médiation par les CMLs [347,348], bien que l'on sache que l'immunité innée joue aussi un rôle important [342]. L'influence d'un traitement hyperthermique à résultante cytostatique, mais non nécrotique, a tout d'abord été étudiée sur la réponse immunitaire spécifique, au travers de deux médiateurs importants de la prise en charge des déterminants antigéniques restreinte par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I, CMH-I (équivalent au HLA-I chez l'homme) [347]: i) les protéines constituant le CMH-I en lui-même, et, ii) HSPA1, isoformes A et B, et HSPA8 (ce qui correspond aux deux isoformes HSP70 et à HSC70, qui sont respectivement :induites par la chaleur et constitutive) (Figure 14, p.75&76). Le CMH-I permet la présentation des antigènes et leur reconnaissance par le TCR des lymphocytes T CD8 cytotoxiques. On sait que la faible expression de HLA-I, ou CMH-I, dans les tumeurs est associée avec un échappement de la tumeur à la surveillance immunitaire [349]. Dans le modèle animal d'investigation de l'hyperthermie par CMLs,

qui n'est pas syngénique *stricto sensu*, il importe de noter que le MHC-I est en même temps impliqué dans la réponse immunitaire liée à l'histocompatibilité et la réponse immunitaire spécifiquement développée contre la tumeur [342]. Ainsi que discuté en partie 1, HSPA1, isoforme A comme B, induites par la chaleur, et HSPA8 (HSC70), constitutive, que nous regrouperons sous l'abréviation HSPA1/8, jouent un rôle important en hyperthermie et pour la thermotolérance, bien que différentes dans les détails moléculaires. Au niveau intracellulaire comme extracellulaire, HSPA1/8 ont une importance centrale dans la biologie cellulaire du cancer [157,350], dans la réponse immunitaire contre le cancer [208], dans le rejet après transplantation [210], et pour les effets immunoadjuvants [211]. Ito *et al* [347] se sont intéressés *in vitro* à l'impact du traitement hyperthermique par CMLs de cellules de gliome T9 sur les fonctions HSPA1/8, par immunochimie ne discriminant pas chaque isoforme, dans le chaperonnage et l'orientation des protéines ou peptides chaperonnés dans la voie restreinte par le MHC-I de présentation des déterminants antigéniques (incluant ceux de la tumeur) aux lymphocytes T CD8+ (voir [342]). Pour l'essentiel, après traitement hyperthermique des cellules de gliome T9, le taux d'expression de HSPA1/8 augmenta puis diminua, avec une expression maximale à 24 h. En parallèle, l'expression de MHC-I augmente pour atteindre son maximum à 48 h. L'expression de MCH-I est aussi augmentée dans les cellules transfectées par HSPA1 pour sur-exprimer cette protéine. Pour les cellules présentant des taux élevés d'expression de HSPA1/8 comme de MCH-I, on observe un délai de formation du nodule tumoral après greffe sous-cutanée chez l'animal immunocompétent. Parallèlement, le mécanisme alternatif par lequel la réponse immunitaire est déclenchée par les complexes HSPA1/8-peptides extracellulaires relargués après mort cellulaire (voir [342], Figure 14, p.75&76), a été étudié dans le travail présenté dans la référence [348]. Un jour après injection des CMLs dans les tumeurs greffées en localisation sous-cutanée, l'hyperthermie était induite dans un AMF pendant 30 min. La température de la tumeur a atteint 42°C rapidement, en 3 min, pour augmenter plus doucement mais constamment jusqu'à atteindre 45°C à 30 min. Comme décrit ci-dessus, la nécrose s'est étendue avec la répétition du traitement. Au sein de la tumeur, la coloration immunohistochimique de HSPA1/8 semble suivre un gradient de chaleur, l'aire de nécrose et son pourtour. Le marquage était positif dans la nécrose, très positif dans la bande de tissus vital entourant cette nécrose, mais négatif pour les zones plus distantes de tissus tumoral vital. Il n'a pas été détecté de phénomène d'apoptose significatif par le test dit TUNEL (« TdT-mediated dUTP nick end-labelling »). La double coloration immunohistochimique, l'une spécifique des macrophages, l'autre de HSPA1/8, a permis de montrer des images de macrophages phagocytant un corpuscule exprimant HSPA1/8. Ceci peut être relié à la remarquable capacité des liposomes pour interagir fortement et préférentiellement avec les macrophages [351,352] et spécifiquement au niveau du processus de trafic intracellulaire associé à la prise en charge des antigènes restreints par le MHC-I [353]. L'évaluation du statut immunitaire après immunisation avec les complexes HSPA1/8-peptides, issus de purification à partir de cellules de gliome T-9 murines traitées par hyperthermie, a montré un taux de croissance tumorale significativement inférieur en comparaison avec des groupes contrôles non-immunisés, ou immunisés par des complexes HSPA1/8-peptides irrelevant purifiés à partir de foie de rats naïfs. Après hyperthermie par CMLs *in vitro*, la nécrose cellulaire (à l'exclusion de l'apoptose, comme démontré par cytométrie de flux) s'accompagna d'un taux élevé de HSPA1/8 dans le surnageant de culture. Une partie des tests *in vivo* a consisté en un chauffage induit par AMF pour obtenir une température de 42°C pendant 30 min juste après que soient injectées les cellules de gliome T-9 avec les CMLs par voie sous-cutanée. La formation du nodule tumoral a alors été fortement réprimée. Une semaine après, selon la ré-épreuve du statut immunitaire par inoculation renouvelée des cellules greffées, la formation et croissance du nodule tumoral était inhibée pour 50% des animaux et pour les autres un délai de croissance fut observé, *vs* groupe contrôle. Ces résultats étaient plus prononcés pour le clone transfecté par *HSPA1*, pour lequel d'ailleurs une expression de HSPA1/8 plus élevée

était bien observée, confirmant que ce phénomène était dose-dépendant (c'est-à-dire dépendant des concentrations de HSPA1/8) comme rapporté dans la référence [354]. Ceci suggère *in fine* que la médiation de l'hyperthermie par CMLs peut bel et bien permettre une immunisation par les complexes HSPA1/8-peptides relargués lors de la nécrose cellulaire [355], réponse immunitaire aussi appelée réponse de danger: « danger response » [342]. En effet, on sait que les protéines de stress extracellulaires ont des activités immunologiques dans le transfert d'antigène, l'induction de réponse par les cellules T et NK et par les cellules dendritiques, qui sont particulièrement efficaces pour présenter les antigènes environnants et réguler positivement les molécules de co-stimulation et cytokines conditionnant la réponse immunitaire [356]. Ce processus est dépeint assez justement dans la référence [357] comme une délivrance de HSPs intracellulaires depuis l'intérieur des cellules tumorales vers l'espace extracellulaire (Figure 14, p.75&76). Les auteurs ajoutent combien ce phénomène de délivrance est dépendant de la dose et de la distribution de la chaleur générée lors du traitement et de sa capacité à engendrer la nécrose. Dans le prolongement de la discussion, les auteurs suggèrent aussi que des températures nécosantes pour la cellule peuvent être atteintes localement en certains foyers au sein de la tumeur traitée, même dans l'intervalle de température correspondant en moyenne et globalement à l'hyperthermie douce (« mild hyperthermia »). Il est important de considérer les récents résultats d'études de la cytotoxicité intrinsèque des liposomes cationiques non magnétiques et magnétiques en l'absence de traitement hyperthermique [358,359]. Il apparaît que les lipides cationiques peuvent être à l'origine de déstabilisations de la membrane plasmique, résultant en l'augmentation de ROS (les espèces radicalaires de l'oxygène, « reactive oxygen species ») et de la concentration en Ca^{2+} cytoplasmique, à considérer comme effecteurs toxiques centraux. Ceci conduit à l'apoptose. Lorsque l'on considère un traitement hyperthermique concomitant, peut-être l'association des effets de déstabilisation de la membrane plasmique faciliterait la nécrose. Dans la référence [359], il est souligné que l'inhibition de la fusion des vésicules ne prévient pas la cytotoxicité des liposomes cationiques, ce qui révélerait que l'échange de lipides cationiques entre liposomes adhérant à la membrane et cette dernière serait le mécanisme principal de leur cytotoxicité. Ceci dit, les CMLs ont de large capacités de chauffage par injection intratumorale, et, chez la souris, de très grandes tumeurs de carcinome mammaire ont pu complètement régresser par répétition idoine de la séquence: injection de CMLs suivie de l'induction d'hyperthermie, ce qui apparaît peu pratique pour le transposer en clinique [360]. L'hyperthermie par le biais de CMLs a aussi été étudiée dans un modèle murin de mélanome B-16 [361]. Trois schémas de traitement ont été étudiés, deux traitements simples d'hyperthermie générée par une séance d'induction magnétique de 30 min en AMF à 118 kHz, modulant l'amplitude pour atteindre respectivement des températures de 43 °C ou de 46°C pour le premier et deuxième schéma de traitement, ainsi que une répétition du traitement à 46°C dans un troisième et dernier schéma. Pour les groupes: hyperthermie simple et hyperthermie répétée à 46°C (deuxième et troisième schéma), 40 et 90% de régressions complètes ont été observées respectivement. Ceci était accompagné d'une augmentation significative de la survie des animaux traités à 120 jours de suivi, suggérant de fortes potentialités pour ces traitements. Pour les animaux chez lesquels la tumeur avait régressé complètement de manière prolongée, les cellules spléniques présentaient une cytotoxicité au contact de cellules B-16 cultivées *in vitro*. Un mois après traitement hyperthermique, lors de la ré-épreuve du statut immunitaire pour les animaux ayant montré une réponse tumorale complète et prolongée par la greffe de cellule de mélanome B16, aucun nodule tumoral ne s'est développé. Des concentrations tissulaires de HSPA1 (HSP70) de 1.6 et 1.3 ng par mg de tissus tumoral ont été rapportées après traitement par hyperthermie simple à 43 °C et 46 °C respectivement. Pour le traitement à 46°C, les auteurs expliquent le plus faible taux de HSPA1 des suites de la plus grande intensité de nécrose. Dans une autre étude, les CMLs ont été injectés directement par voie intratumorale dans une tumeur d'ostéosarcome chez le hamster [362]. Ici, la tumeur était maintenue à

une température de 42 °C pendant 30 min par exposition à un AMF à 118 kHz en modulant l'amplitude, aux jours 1, 2 et 3 après injection intra-tumorale. Dans un premier temps une augmentation du volume tumoral jusqu'au jours 4 à 10 a été observée, puis une diminution importante jusqu'à régression complète pour tous les animaux du groupe traité (suivi de 3 mois), alors que pour le groupe contrôle, la tumeur progressait rapidement et de manière ininterrompue.

Dans l'ensemble, ces résultats montrent qu'une réponse thérapeutique d'intérêt clinique est envisageable pour le traitement hyperthermique par induction magnétique d'une variété de tumeurs solides au moyen des CMLs. Concernant l'effet de l'hyperthermie locale sur la réponse immunitaire anti-tumorale, dans la référence [363], Ito en rassemble les mécanismes contributifs qu'il a permis de mettre à jour en termes de mort cellulaire et de présentation de déterminants antigéniques (Figure 14, p.75&76). Sur ces bases, il pourrait être très instructif de prendre en compte l'action générale des liposomes magnétiques sur la biologie des membranes [364] et le trafic intracellulaire. Ceci doit se faire en considération d'ensemble, mais aussi en considérant séparément l'action des vésicules avec ou sans encapsulation, compte tenu des effets déjà signalés de déstabilisation des membranes cytoplasmiques à laquelle, selon les cas, s'ajoute une déstabilisation intracytoplasmique [365-367]. Le devenir des seules nanoparticules magnétiques, c'est-à-dire en l'état séparées de leur formulation liposomale, doit aussi être considéré [368,242]. Parmi les nombreuses investigations immunologiques pour des modalités d'hyperthermie variées et étant donné la variabilité des effets du stress thermique [357,369], les résultats convaincants obtenus avec la formulation liposomale suggère que la combinaison de cette formulation avec l'hyperthermie est très favorable à la réponse immunitaire dirigée contre la tumeur. En se rappelant l'avidité élevée des macrophages pour les liposomes, une synergie au niveau de ces cellules, qui ont un grand potentiel pour la présentation de l'antigène, est à attendre. Les capacités exceptionnelles des liposomes à adsorber et échanger une variété de constituants de systèmes biologiques (solubles ou solidaires d'une membrane tels que les lipides et les protéines) ainsi que leur capacité à modifier en conséquence les membranes avec lesquelles ils ont interagi, pourraient augmenter les facultés de l'hyperthermie dans le transfert des antigènes tumoraux aux cellules présentatrices de l'antigène. Ceci peut se réaliser au niveau des cellules dendritiques ou déjà au niveau des macrophages et monocytes, pour aboutir à accroître l'efficacité du système immunitaire dans sa lutte contre la tumeur. Il pourrait être très bénéfique dans les futurs travaux autour des modalités d'hyperthermie faisant intervenir les liposomes d'associer des techniques classiques de marquage de membrane [321,364,370,371]. Un concept formulé par Humphries lors de l'utilisation des liposomes pour l'étude des antigènes membranaires comme immunogènes et cibles d'attaque immunes apparaît très judicieux [372]: le "cadre de référence, véritable langage de la membrane" peut être modulé de bien des façons par les liposomes (ajoutons en marge que ceci serait aussi possible avec des courants de Foucault s'ils parcourraient bien la membrane comme il est parfois avancé).

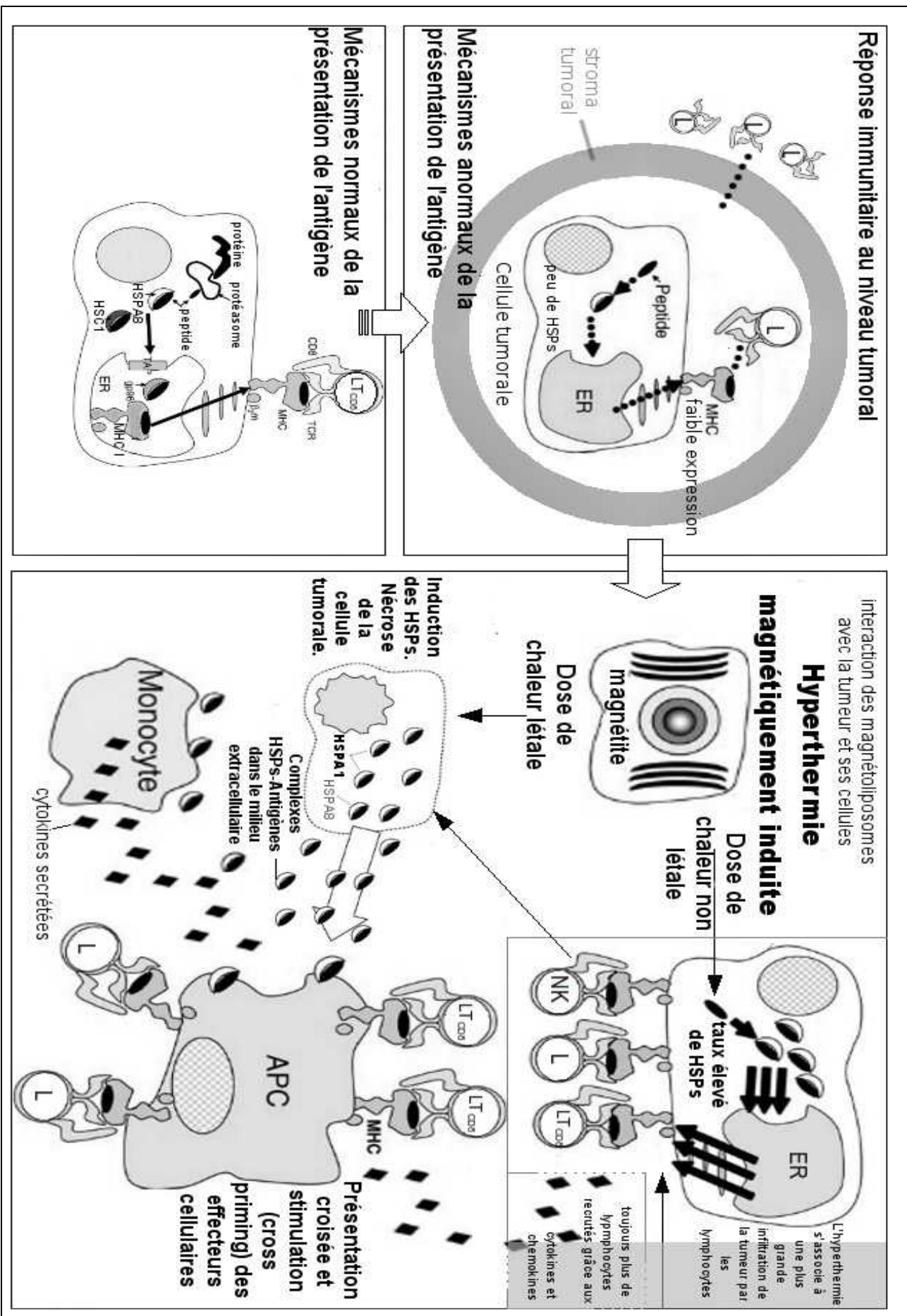


Figure 14, titre et légende ci-contre

Figure 14: Effets de l'hyperthermie induite magnétiquement par l'intermédiaire de liposomes magnétiques sur la réponse immunitaire dirigée contre la tumeur, adaptée de la référence [364].

En bas à gauche: Implications des protéines heat shock (HSPs, représentées sous forme de croissants) dans les mécanismes de présentation de peptides antigéniques (représentés sous forme d'ellipse noires) en association avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité, le MHC-I (« major histocompatibility complex I »), tels qu'impliqués dans la présentation d'antigène du soi par des cellules saines, ou encore dans la présentation d'antigènes anormaux par des cellules animales naturellement sénescents, aux lymphocytes T cytotoxiques (LT_{CD8}). Ceci est se fait par l'intermédiaire de leurs récepteurs TCR (« T cell receptor ») et entraîne naturellement le déclenchement d'une réponse cytotoxique. Dans ce cas, par contraste avec le cas des cellules infectées par un virus, les antigènes sont acheminés par la voie endogène (qui implique le réticulum endoplasmique: ER (« endoplasmic reticulum »), la glycoprotéine 86: gp86, le transporteur associé à la présentation d'antigènes: TAP (« transporter associated with antigen processing »), et la β microglobuline: β m).

En haut à gauche: Mécanismes par lesquels la tumeur solide échappe à la réponse immunitaire. Premièrement, l'infiltration des lymphocytes (L) dans le stroma de la tumeur est diminuée. La faible expression de MHC-I dans les cellules tumorales, ainsi que parfois, dans une certaine mesure, un plus faible degré d'expression de certaines HSPs de la voie de présentation endogène, aboutissent à compromettre finalement la réponse immunitaire.

À droite: Les liposomes magnétiques dans la tumeur permettent un traitement hyperthermique par induction magnétique. Ceci induit les HSPs. En fonction de la dose de chaleur, les cellules peuvent survivre ou mourir, notamment par nécrose. Respectivement, la présentation de l'antigène serait augmentée chez les cellules survivantes ou par l'intermédiaires des complexes antigène-HSP libérés dans l'environnement, notamment par la nécrose, qui sont très immunogéniques. Dans les deux cas, sont augmentées les réponses de l'immunité innée (non spécifique) et de l'immunité spécifique, impliquant respectivement et principalement d'un côté les cellules NK, « natural killer », et de l'autre, les cellules présentatrices de l'antigène: APC (« antigen presenting cell »), les lymphocytes T CD4 et -8: LT_{CD4} et LT_{CD8}, en conjonction avec une sécrétion de cytokines (représentées par de petits losanges). Ces deux mécanismes contribuent à une meilleure réponse

4.2.1 Magnétoliposomes conjugués aux anticorps dirigés contre CA9 (« human MN »)

En alternative quasi non-invasive à l'injection intra-tumorale directe, des liposomes magnétiques ont été conjugués avec le fragment F(ab')₂ d'un anticorps humain dirigé contre CA9: l'anhydrase carbonique IX, aussi connu sous le nom de « human MN antigen » (hMN) [373], en vue d'injection intra-veineuse puis du traitement hyperthermique local par induction magnétique de tumeurs. Des tumeurs modèles orthotopiques constituées de cellules de carcinome rénal de souris transfectées par l'ADNc codant l'antigène humain hMN chez la souris balb/c ont été utilisées [374]. La protéine CA9 est aussi un important marqueur pour les carcinomes cervicaux [375]. Cette protéine transmembranaire du groupe des enzymes anhydrases carbonique est spécialement induite par l'hypoxémie. CA9 est un facteur et une cible en biologie moléculaire tumorale d'importance grandissante. CA9 peut maintenir un pH intracellulaire à une valeur physiologique dans l'environnement très fréquemment acide d'une tumeur solide [131]. Cette particularité et son rôle dans l'adhésion cellulaire, certainement par l'intermédiaire de son domaine extramembranaire protéoglycane, sont associées avec une rapidité de croissance tumorale plus élevée et une occurrence élevée de métastases. Dans le modèle murin de xélogreffe de lignée cellulaire tumorale transfectée par CA9 décrit ci-dessus, après injection systémique, la moitié de la dose d'immunomagnétoliposomes anti-CA9 injectée se retrouva dans le tumeur à 48 h, le reste étant

essentiellement retrouvée dans le foie et les cellules du sang. Cette biodistribution apparaît relativement spécifique en comparaison aux expériences contrôles avec les magnétoliposomes (non conjugués à l'anticorps) ou encore avec un xéno greffon contrôle constitué de la même lignée cellulaire mais non transfectée, dans lequel aucune accumulation n'a été observée. La distribution au sein des tumeurs de la lignée transfectée n'a pas été étudiée très en détail, mais à la suite d'une coloration histologique spécifique de l'oxyde de fer, à faible grossissement, l'aspect en travées des aires colorées suggère une relation avec la vascularisation ou avec une possible architecture glandulaire. L'accumulation au site tumoral est très probable, mais la localisation n'a pas été plus précisément étudiée. Dans une autre étude, à titre comparatif, l'accumulation des immunoliposomes ciblés contre les métastases d'adénocarcinome du colon dans le foie s'est révélée être en fait sélective des macrophages et non de l'épitope contre lequel était dirigé l'anticorps conjugué pour le ciblage [326]. Concernant les capacités de chauffage de la fraction de formulation d'immuno-magnétoliposomes accumulée dans la tumeur pour le modèle *in vivo* recourant au ciblage de CA9, pour un AMF à 118 kHz et une amplitude de 30.6 kA.m^{-1} (384 Oe, élevée), le SLP de cette formulation étant *in vitro* de 94 W.g^{-1} , le chauffage peut être considéré efficace puisque la température de la peau au-dessus de la tumeur atteignit un plateau à 43°C en 10 min, la température intra-tumorale étant certainement plus élevée. Une séquence de trois traitements hyperthermiques a abouti à une nécrose importante entourant les zones où les immuno-magnétoliposomes sont amassés, principalement au niveau des vaisseaux. Finalement, cette modalité d'hyperthermie ciblée dans ce schéma de traitement a permis une augmentation de la survie à 64 jours qui est à comparer avec les 35 jours obtenus pour les groupes contrôles. Pour information, le premier groupe contrôle était constitué de souris injectées avec les magnétoliposomes non immunoconjugués 48 h après greffe avec la lignée de carcinome rénale transfectée pour sur-exprimée CA9, et le second groupe contrôle fut constitué de souris injectées avec les immuno-magnétoliposomes anti-CA9 48 h après greffe avec les cellules de carcinome rénale non transfectées cette fois.

4.2.2 Magnétoliposomes conjugués aux anticorps anti-ERBB2 (trastuzumab)

Magnétoliposomes immunoconjugués anti-ERBB2 et considérations pharmaceutiques associées

Des études préliminaires de faisabilité ont démontré un fort potentiel de traitement anti-tumoral basé sur l'hyperthermie par l'intermédiaire de magnétoliposomes immunoconjugués avec des anticorps anti-ERBB2 [376], tels que le trastuzumab (Herceptin®). Ces anticorps interagissent avec le domaine extracellulaire du récepteur *ERBB2*, plus souvent connu comme HER2, qui est le récepteur tyrosine kinase 2 à l'hEGF (human epidermal growth factor), exprimé dans certains types de cancer de sein, représentant environ 25 % des cas [377]. Les anticorps conjugués avec les magnétoliposomes semblent garder leur spécificité. Ceci laisse à penser que les effets antinéoplasiques de ces anticorps sont au moins partiellement préservés dans la formulation en conjugaison avec les magnétoliposomes. La part des propriétés antinéoplasiques de ces anticorps la mieux connue et décrite repose sur la répression de la signalisation par ce récepteur, ce qui aboutit à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 avec accumulation de $p27^{\text{kip1}}$, un inhibiteur de kinases cycline-dépendante, et l'induction de l'apoptose ainsi que l'inhibition de l'angiogenèse [378]. Les effets immunitaires parallèles également décrits pour l'anticorps anti-ERBB2, impliquent les cellules NK dans une réaction de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps, ADCC (« antibody-dependent

cellular cytotoxicity »). L'ADCC pourrait être entravée si le fragment Fc des anticorps est rendu inaccessible par la conjugaison avec les vésicules lipidiques dans la formulation liposomale. La grande capacité d'endocytose récepteur-dépendante stimulée par liaison au ligand caractéristique du récepteur ERBB2 pourrait également conduire à une internalisation du système conjugué: les immunoliposomes. Il faut noter une limite en pratique qui consiste en la perte par les cellules du domaine extracellulaire de ERBB2 par hydrolyse (phénomène de « shedding »). Ce phénomène n'a cependant pas été associé au mécanisme de résistance des tumeurs et cellules tumorales au trastuzumab, mais les études en cours à ce sujet doivent être prises en compte pour de futures formulations d'immunoliposomes. L'altération de l'interaction anticorps-récepteur, décrite dans certains cas d'échec du traitement par trastuzumab avec cependant un niveau élevé d'expression de ERBB2 confirmé, dont on explique alors la perte d'affinité par la mutation du domaine extracellulaire de ERBB2, affecterait de même les liposomes immunoconjugués. Il semble que la partie extra-membranaire soluble de ERBB2 relarguée après « shedding » n'entraîne pas d'inhibition compétitive du trastuzumab. Deux autres explications impliqueraient: i) le statut de dimérisation du récepteur et, ii) la régulation positive de la cascade de signalisation en aval. Premièrement, les études du statut de dimérisation de ERBB2 ont révélé comment il fut possible en alternative au trastuzumab pour un autre anticorps anti-ERBB2 qui inhibe la dimérisation de ERBB2, pertuzumab, de vaincre les résistances et d'agir en synergie avec le trastuzumab chez les patientes totalement ou partiellement réfractaires au trastuzumab. Des résistances liées à l'hétérodimérisation avec d'autres récepteurs tyrosine kinase, notamment aux facteurs de croissance épithéliaux tels que l'EGFR (« epithelium growth factor receptor ») ou HER1, ont aussi été rapportées. Deuxièmement, à propos de la régulation positive de la cascade de signalisation impliquée dans la transduction du signal par ERBB2, une diminution de l'activité de p27^{kip1} ou une augmentation de la signalisation par l'IGF-IR, « insulin-like growth factor-I receptor », qui partage une partie de la voie de signalisation avec ERBB2, ont été décrites. Tous ces éléments suggèrent théoriquement un potentiel thérapeutique supérieur pour les anticorps avec une réactivité croisée entre au moins deux récepteurs cibles d'importance.

Magnétoliposomes immunoconjugués anti-ERBB2 et considérations micropharmacologiques pour les immunoliposomes anti-ERBB2 non magnétiques

Les perspectives de l'hyperthermie induite magnétiquement associée aux magnétoliposomes immunoconjugués anti-ERBB2 doivent être discutées à la lumière des études de distribution et microdistribution réalisées pour des immunoliposomes très proches, à durée de vie longue, conjugués avec les fragments F(ab) d'anticorps anti-ERBB2, qui ont montré un bénéfice thérapeutique tangible comme véhicule pour la doxorubicine [379]. Ces études ont aussi bouleversé certains paradigmes, trop rapidement acceptés pour tout anticorps utilisé pour le ciblage de vecteurs particuliers [380]. Dans un modèle comparatif de deux tumeurs d'adénocarcinomes mammaires xénogreffées, la première exprimant un taux basal ERBB2 (similaire au taux d'expression de tissus normaux), la deuxième sur-exprimant ERBB2, les études de distribution n'ont révélé pour chacune aucune différence dans l'accumulation tumorale entre liposomes conjugués et liposomes non-conjugués. La fraction de la dose injectée retrouvée dans la tumeur étant dans tous les cas faible. Pour les liposomes conjugués ou non, seulement 7 à 8 % de la dose injectée par voie systémique se sont retrouvés dans les tumeurs. Néanmoins, les études de microdistribution de la fraction accumulée dans la tumeur ont révélé par simple microscopie à faible grossissement une capacité d'extrasation vers les tissus tumoraux [381], et donc la possibilité de passer la barrière micropharmacologique de diffusion dans les tumeurs notoirement décrite pour les anticorps seuls.

Cette barrière dite du site de liaison, « binding site barrier » repose sur les interactions anticorps-antigènes au niveau tissulaire [382,383]. À grossissement intermédiaire, les liposomes non-conjugués montrent une distribution inégale ou éparse, évoquant la distribution observée précédemment avec les CMLs non immuno-conjugués, par le groupe de Kobayashi [337,338], notamment par Ito *et al* [347,348]. Par contraste, les liposomes immuno-conjugués s'accumulent de même en quantité limitée mais avec une distribution très homogène au sein du nodule tumoral. Les liposomes immuno-conjugués peuvent atteindre chacun des différents niveaux d'organisation du nodule tumoral, c'est-à-dire le stroma périphérique, les zones vitales intermédiaires où la néovascularisation est importante et le cœur nécrotique de la tumeur. À grossissement élevé, les liposomes immuno-conjugués se sont avérés être internalisés, avec une localisation périnucléaire spécifiquement dans le cas des cellules tumorales greffées par opposition aux cellules de l'hôte qui se retrouvent dans la population cellulaire de l'ensemble du nodule. Ceci a été confirmé par des études en cytométrie de flux. Les liposomes non conjugués s'accumulent principalement dans le stroma tumoral, soit dans les interstices extracellulaires soit dans les macrophages résidents de la tumeur, comme montré par ailleurs [384,381]. Les auteurs soulignent alors que le paradigme classique du ciblage actif comme explication de gain thérapeutique doit être reconsidéré, en regard du mode d'action de l'agent thérapeutique dans l'indication recherchée. Ici, la doxorubicine, le principe actif, agit au niveau de la chromatine, plus précisément en inhibant la synthèse d'ARN ribosomique. En alternative à la définition généralement acceptée du ciblage par anticorps en termes pharmacocinétiques au travers de la disponibilité tumorale, ici, le gain thérapeutique trouve une explication en termes pharmacodynamiques. De la faible fraction accumulée passivement dans la tumeur, le gain thérapeutique peut en fait être entièrement expliqué par la seule activité spécifique du vecteur augmentant d'un facteur 6 la proportion internalisée de doxorubicine, ce qui semble impliquer fortement l'endocytose récepteur-dépendante.

Pour en venir à l'hyperthermie par induction magnétique, la situation se complexifie au plan pharmaceutique. Elle nécessite fondamentalement de distinguer le principe actif, qui est la chaleur, et l'agent thérapeutique, qui est l'élément source à l'origine de la production de chaleur, la particule interagissant avec le champ magnétique, c'est-à-dire les SPIONs. Un degré de complexité supplémentaire tient au principe actif de l'hyperthermie, la chaleur, qui a par essence des caractéristiques de diffusion. Du point de vue thermodynamique, le plus important pour le traitement local par hyperthermie induite magnétiquement de tumeurs solides est que l'intensité du chauffage dépend directement de la concentration volumique des particules magnétiques sources, qui doit être assez élevée pour un chauffage approprié du volume ciblé (revoir l'étude du chauffage de particules céramiques magnétiques diversement concentrée au sein de gels d'agar, p53-54). Les capacités de chauffage avec des SPIONs, qui sont dilués, dans le tissu, ne peuvent effectivement accroître la température tissulaire à un niveau suffisamment élevé pour l'hyperthermie, à moins d'une augmentation de l'amplitude du champ AMF difficilement applicable en clinique. Néanmoins, si le nombre de SPIONs impliqués dans une faible dilution se retrouve focalisé au sein de volume tumoral, le chauffage doit pouvoir atteindre à ce niveau une température significative ayant des effets biologiques (voir aussi p53-54). En reconsidérant les magnétoliposomes d'administration systémique, leur destination, leur accumulation et leur distribution dans la tumeur restent la problématique centrale pour atteindre de grandes concentrations intra-tumorales et assurer les capacités de chauffage nécessaires pour obtenir au niveau de la tumeur les effets de l'hyperthermie démontrés précédemment par injection intratumorale directe. Par interpolation sur la base des études micropharmacologiques discutant des immunoliposomes non magnétiques, les magnétoliposomes immunoconjugués anti-ERBB2 développés par Ito *et al* [376], la dose systémique à injecter pour atteindre des concentrations tumorales du même ordre que les

concentrations obtenues par injection intratumorale directe ayant démontrées une efficacité en hyperthermie, apparaît irréalisable et occasionnerait des effets indésirables. Un avantage important spécifique des magnétoliposomes repose sur leur possibilité de concentration au site tumoral par attraction grâce à un gradient de champ magnétique [370]. Comme l'injection systémique occasionne une accumulation majeure des magnétoliposomes (immuno-conjugués ou non) dans d'autres localisations telles que le foie, rate et le système macrophagique, l'induction magnétique doit être confinée au site tumoral.

En tenant compte de ces précautions, le traitement hyperthermique par magnétoliposomes immuno-conjugués anti-CA9 de l'étude *in vivo* de Ito *et al* dans un modèle tumoral avec transfection pour sur-expression de CA9 [374] a finalement permis d'observer une réponse tumorale en partie comparable à celle observée après injection intratumorale. Il faut cependant noter que l'amplitude de l'AMF a apparemment été quelque peu augmentée. De plus, l'anhydrase carbonique n'est pas un récepteur membranaire pour la cellule, et ce modèle ne comporte donc pas, comme dans le cas de ERBB2, de capacité d'endocytose récepteur-dépendante induite par ligand. Cependant d'autres capacités d'endocytose peuvent encore se concevoir: pinocytose (« fluid-phase endocytosis » ou endocytose par adsorption. Contrairement au cas des anticorps anti-ERBB2, étant exclue une homogénéisation de la distribution intra-tumorale liée à l'endocytose récepteur-dépendante induite par ligand dans le cas d'immunoconjugués avec des anticorps anti-CA9, des effets partiels de l'hyperthermie peuvent s'expliquer comme des focalisations du chauffage reposant sur des phénomènes de concentration focalisées des immuno-magnétoliposomes anti-CA9. D'après les microphotographies histologiques, en regard des considérations micropharmacologiques [381-384], les immuno-magnétoliposomes anti-CA9 se sont concentrés en foci, qui pourraient correspondre aux espaces vasculaires et périvasculaires de la néovascularisation tumorale. Localement, le chauffage pourrait ainsi endommager les néovaisseaux, ce qui diminuerait l'évacuation de la chaleur et permettrait d'atteindre des températures plus élevées dans la tumeur. À cette fin particulière, la diffusion des liposomes au travers de tout le volume tumoral apparaîtrait désavantageuse. D'un point de vue physique le bilan thermique de l'hyperthermie intracellulaire est équivalente à l'hyperthermie extracellulaire [385], *in vitro* (voire moindre selon certains [386]). Ces considérations physiques ne doivent être appliquées sans précautions du point de vue biologique. Précisément, là où Rabin considère comme négligeable à l'échelle nanoscopique la dissipation de chaleur par des SPIONs isolés ou très dilués pour le bilan thermique du chauffage (sous-entendu en terme de température au cours de la thermométrie) [385], Fortin *et al* apportent d'autres données relatives à l'environnement intracellulaire et proposent que des chauffages à l'échelle nanométrique seraient à considérer lorsque un groupe de SPIONs, bien que peu concentré dans un tissu, est rassemblé et compacté dans un endosome, comme très souvent après endocytose [386]. Rappelons que c'est précisément ce qui se passe avec les magnétoliposomes.

4.3 Magnétoliposomes cationiques et induction magnétique de l'hyperthermie dans un modèle de métastases osseuse de cancer de prostate

Proposer les magnétoliposomes cationiques, les CMLs, intéresse toute modalité d'hyperthermie pour lesquelles une accumulation ciblée dans une sous-population cellulaire charnière d'un processus physiopathologique, c'est-à-dire très souvent les macrophages [387], mais est aussi particulièrement indiquée pour cibler les ostéoclastes au sein d'une tumeur solide osseuse, comme proposée par Fraysinnet *et al* [290].

Récemment, une étude des CMLs dans modèle animal de conception très intéressante, consistant en une greffe hétérotopique de cellules de tumeur de prostate syngénique dans le tissu sous-cutané à proximité de l'os crânien, comme modèle de métastase osseuse de cancer de prostate, par comparaison à une greffe sous-cutanée dans un site abdominal constituant un groupe contrôle qui reflète l'absence de participation de l'os aux processus pathologiques [388]. Une augmentation de mortalité a été rapportée pour le groupe injecté et traité pour le site de greffe crânien mais pas pour le groupe à greffe abdominale, probablement par endommagement du système nerveux central, même après avoir tenté d'adapter au mieux la séquence de répétition de traitement hyperthermique par induction en AMF, par exemple en diminuant le temps d'exposition (de 30 à 15 min) ou l'amplitude de l'AMF. Grâce aux CMLs, pour toutes les séances d'exposition à AMF, la température a pu être équilibrée à 44 °C. Il n'a pas été observé de régression complète. L'aire de nécrose était en relation avec la concentration intra-tumorale en CMLs, leur distribution intra-tumorale n'étant pas homogène et les auteurs notent l'importance de recourir à l'injection du nodule tumoral par deux abords latéraux opposés. Les ostéoclastes ont été identifiés par une réaction histochimique spécifique de la phosphatase acide résistante au tartrate: TRAP (« tartrate-resistant acid phosphatase ») et l'antigène nucléaire des cellules en prolifération, PCNA (« proliferating cell nuclear antigen ») a été étudié comme marqueur de prolifération cellulaire [389]. Il est intéressant de noter que le nombre d'ostéoclastes positifs pour TRAP à l'interface avec l'os était diminué lorsque le traitement hyperthermique fut réalisé. Sans hyperthermie (avec ou sans CMLs), les cellules tumorales étaient très positives pour PCNA, donc en prolifération, à l'interface entre tumeur et os, plus que dans le cas du site de greffe abdominal non en relation avec l'os. Avec l'injection de CMLs et l'hyperthermie, le nombre de cellules positives pour PCNA était diminué à l'interface entre os et tumeur, alors que ce ne fut pas observé dans le cas de la tumeur localisée au niveau de l'abdomen sans relation avec l'os. Cette diminution du nombre de cellules PCNA-positives a été associée avec un ralentissement du taux de destruction osseuse, expliqué par l'inactivation des ostéoclastes par le chauffage. Ceci suggère que l'hyperthermie, en particulier dans cette modalité par l'intermédiaire des CMLs, pourrait avoir le potentiel intéressant de moduler les processus ostéolytiques, en particulier dans le contexte physiopathologique de métastase osseuse de cancer de la prostate [291], et, plus en avant, lorsque ces mécanismes ostéolytiques s'associent plus précisément à des désordres paracrines impliquant RANK: le récepteur activateur de NF- κ B [390-395], se rappelant alors la possibilité pour HSF-1 (« heat shock transcription factor 1 ») d'inhiber NF- κ B par une voie indépendante des gènes *HSPs*. Entre autres considérations, notons que la forte létalité après injection de CMLs et l'induction d'hyperthermie observée spécifiquement pour les tumeurs greffées au site crânien est probablement due à un endommagement du système nerveux central nécessiterait des études supplémentaires et peut-être une adaptation de la formulation en vue d'une application chez l'homme, où le site des métastases est préférentiellement vertébral.

4.4 Magnétoliposomes neutres comme intermédiaire pour l'hyperthermie induite magnétiquement

Suivant une approche expérimentale complètement différente, des magnétoliposomes neutres, NMLs (à base de phosphatidylcholine: phosphatidyl-ethanolamine 2:1, avec un diamètre de 94.1 nm) ont été étudiés *in vivo* chez le lapin par injection sous-muqueuse ou intramusculaire dans la langue afin de démontrer la capacité des liposomes neutres à cibler les ganglions lymphatiques drainant le territoire d'injection, ici les ganglions cervicaux, pour réaliser leur traitement par hyperthermie locale [396]. Ceci est utile en cas de présence de cellules tumorales qui s'y seraient

disséminées. Dans ce modèle expérimental, la greffe de cellules tumorales dans le ganglion cervical en est représentative. Un jour après injection, les NMLs furent effectivement retrouvés en plus grande concentration dans les ganglions lymphatiques cervicaux que dans la langue, le sang, la rate ou le foie. Dans un AMF de $30,6 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ (384 Oe) à 118 kHz, le ganglion pu ainsi atteindre la température maximale de 44°C . Avec une durée de traitement de 40 min après avoir atteint $42,5^\circ\text{C}$ dans le ganglion lymphatique, une augmentation significative de l'étendue de nécrose et de l'index d'apoptose a été observée. Il faut aussi mentionner que l'hyperthermie peut accroître la domiciliation, « homing », des lymphocytes dans les organes lymphoïdes [397], qui sont connus comme site clé pour promouvoir l'organisation de la réponse immunitaire anti-tumorale [398]. Une formulation alternative pour ce genre de ciblage passif recourt aux microparticules, et il serait intéressant d'étudier le potentiel des particules de verres-céramiques magnétiques les plus récentes, présentées en partie 2, pour cette approche du ciblage et du traitement par hyperthermie magnétiquement induite de ganglions colonisés par des cellules tumorales disséminées.

5 Conclusion

Un nombre grandissant de modalités magnétiques proposées pour l'hyperthermie locale a atteint un niveau de technicité répondant à des besoins variés en médecine. Des matériaux magnétiques en constant développement peuvent constituer des biomatériaux intéressants et le pourront de façon toujours plus raffinée. Ceci est particulièrement vrai des verres-céramiques magnétiques qui ont atteint une efficacité de chauffage élevée tout en présentant la bioactivité souhaitable pour application clinique, notamment dans les pathologies cancéreuses des tissus osseux. Pour les céramiques-verres incluant des oxydes de fer magnétiques, la problématique du relargage d'ions de fer a été compensée par l'adaptation de la composition par le phosphate. Des phases magnétiques originales de développement récent sont prometteuses pour l'accroissement de l'efficacité de chauffage. Les alternatives par confinement de SPIONs au sein de matrices verre-céramiques offrent l'avantage de présenter des propriétés superparamagnétiques, permettant efficacement la conversion en chaleur de l'énergie d'un champ magnétique alternatif externe tout en ne présentant pas de magnétisation rémanente possiblement problématique pour la voie parentérale. Les systèmes de microparticules à base de matériaux verre-céramiques peuvent être combinés avec et dans des biomatériaux implantables et injectables très variés. La combinaison par le travail de formulation galénique d'approches thérapeutiques parentérales avec l'hyperthermie induite magnétiquement a montré un fort potentiel dans le cas de l'embolisation de tumeurs hépatique. Grâce à une amélioration constante des techniques interventionnelles d'invasivité minimale, plus de tumeurs pourront être atteintes et donc être indiquées, dans un ensemble de situations cliniques toujours plus grand. En association avec des modalités d'hyperthermie par induction magnétique robustes, ces approches peu invasives pourront éviter certaines interventions chirurgicales plus lourdes. La formulation galénique joue ici un rôle crucial, comme illustré avec le Lipiodol® et les microsphères. Les formulations de microparticules superparamagnétiques avec des implants injectables se formant *in situ* présentent expérimentalement une efficacité intéressante dans le traitement local de tumeurs solides par hyperthermie magnétiquement induite. La polyvalence en usage pharmaceutique des organogels et hydrogels injectables formant un implant *in situ* réserve encore de larges possibilités pour l'amélioration de la formulation galénique afin d'assurer une injection intra-tumorale idéale dans la majorité des cas où elle apparaît indiquée. Les formulations de magnétoliposomes ont un très large potentiel expérimentalement bien démontré et plus avancé, malgré une injectabilité apparemment moindre. De plus, les connaissances accumulées au sujet des liposomes sont très

nombreuses à tout niveau, surtout comme véhicule de principes actifs. Les résultats avec les modalités systémiques de leur injection pour traitement local de tumeurs solides par induction magnétique d'hyperthermie sont très attractifs, mais nécessitent des considérations micropharmacologiques attentives. L'action notoire des liposomes comme immunoadjuvant, rend les magnétoliposomes encore plus prometteurs pour le traitement local de tumeurs solides par induction magnétique d'hyperthermie avec l'intention de promouvoir la réponse immunitaire.

6 Références

1. van der Zee J. Heating the patient: a promising approach? *Ann. Oncol.* 2002 Aug;13(8):1173-1184.
2. Arancia G, Crateri Trovalusci P, Mariutti G, Mondovì B. Ultrastructural changes induced by hyperthermia in Chinese hamster V79 fibroblasts. *Int J Hyperthermia.* 1989 Jun;5(3):341-350.
3. Pietrangeli P, Mondovi B. On the Biochemical Basis of Tumour Damage by Hyperthermia. In: *Hyperthermia in cancer treatment.* Springer; 2006. p. 110-118.
4. Christian Streffer. Molecular and Cellular Mechanism of Hyperthermia. In: *Thermoradiotherapy and thermochemotherapy - Volume 1: Biology, Physiology, and Physics.* Springer; 1995. p. 47-74.
5. Wills EJ, Findlay JM, McManus JP. Effects of hyperthermia therapy on the liver. II. Morphological observations. *J. Clin. Pathol.* 1976 Jan;29(1):1-10.
6. Hall EJ, Giaccia AJ. Hyperthermia. In: *Radiobiology for the radiologist.* Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 469-490.
7. Coss RA, Linnemans WAM. The effects of hyperthermia on the cytoskeleton: a review. *Int J Hyperthermia.* 1996 1;12(2):173-196.
8. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Chapter 16. The cytoskeleton. In: *Molecular Biology of the Cell.* New York: Garland Science, Taylor & Francis Group; 2002. p. 907-982.
9. Welch WJ, Suhan JP. Morphological study of the mammalian stress response: characterization of changes in cytoplasmic organelles, cytoskeleton, and nucleoli, and appearance of intranuclear actin filaments in rat fibroblasts after heat-shock treatment. *J. Cell Biol.* 1985 Oct;101(4):1198-1211.
10. Hildebrandt B, Wust P. The biologic rationale of hyperthermia. *Cancer Treat. Res.* 2007;134:171-184.
11. Borrelli MJ, Wong RS, Dewey WC. A direct correlation between hyperthermia-induced membrane blebbing and survival in synchronous G1 CHO cells. *J. Cell. Physiol.* 1986 Feb;126(2):181-190.
12. Wachsberger PR, Coss RA. Effects of hyperthermia on the cytoskeleton and cell survival in G1 and S phase Chinese hamster ovary cells. *Int J Hyperthermia.* 1990 1;6(1):67-85.
13. Kregel KC. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J. Appl. Physiol.* 2002 May;92(5):2177-2186.

14. Csermely P, Söti C, Blatch G. Chaperones as Parts of Cellular Networks. In: *Molecular Aspects of the Stress Response: Chaperones, Membranes and Networks*. 2007. p. 55-63.
15. Bukau B. *Molecular chaperones and folding catalysts*. CRC Press; 1999.
16. HUGO Gene Nomenclature Committee Home Page [Internet]. [cited 2010 Jun 11]; Available from: <http://www.genenames.org/>
17. Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ, Kubota H, Tanguay RM, Bruford EA, et al. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones*. 2009 Jan;14(1):105-111.
18. Lepock JR, Frey HE, Heynen ML, Senisterra GA, Warters RL. The nuclear matrix is a thermolabile cellular structure. *Cell Stress Chaperones*. 2001 Apr;6(2):136-147.
19. Fukui Y, Katsumaru H. Dynamics of nuclear actin bundle induction by dimethyl sulfoxide and factors affecting its development. *J. Cell Biol.* 1980 Jan;84(1):131-140.
20. Fukui Y. Intranuclear actin bundles induced by dimethyl sulfoxide in interphase nucleus of *Dictyostelium*. *J. Cell Biol.* 1978 Jan;76(1):146-157.
21. Fukui Y, Katsumaru H. Nuclear actin bundles in *Amoeba*, *Dictyostelium* and human HeLa cells induced by dimethyl sulfoxide. *Exp. Cell Res.* 1979 May;120(2):451-455.
22. Jelke E, Oertel B. DMSO induces the formation of microfilament bundles in nuclei of zoospores of *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary (Oomycetes, Pythiaceae). *Acta Histochem. Suppl.* 1990;39:435-442.
23. Sanger JW, Sanger JM, Kreis TE, Jockusch BM. Reversible translocation of cytoplasmic actin into the nucleus caused by dimethyl sulfoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1980 Sep;77(9):5268-5272.
24. Sanger JW, Gwinn J, Sanger JM. Dissolution of cytoplasmic actin bundles and the induction of nuclear actin bundles by dimethyl sulfoxide. *J. Exp. Zool.* 1980 Aug;213(2):227-230.
25. Roti Roti JL, Kampinga HH, Malyapa RS, Wright WD, vanderWaal RP, Xu M. Nuclear matrix as a target for hyperthermic killing of cancer cells. *Cell Stress Chaperones*. 1998 Dec;3(4):245-255.
26. Strom R, Santoro AS, Crifo' C, Bozzi A, Mondovi' B, Fanelli AR. The biochemical mechanism of selective heat sensitivity of cancer cells - IV. Inhibition of RNA synthesis. *Eur J Cancer*. 1973 Feb;9(2):103-112.
27. Mondovi' B, Agro' AF, Rotilio G, Strom R, Moricca G, Fanelli AR. The biochemical mechanism of selective heat sensitivity of cancer cells - II. Studies on nucleic acids and protein synthesis. *Eur J Cancer*. 1969 May;5(2):137-146.
28. Gieni RS, Hendzel MJ. Actin dynamics and functions in the interphase nucleus: moving

toward an understanding of nuclear polymeric actin. *Biochem. Cell Biol.* 2009 Feb;87(1):283-306.

29. Reiter T, Penman S. "Prompt" heat shock proteins: translationally regulated synthesis of new proteins associated with the nuclear matrix-intermediate filaments as an early response to heat shock. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1983;80:4737-4741.
30. Zhu W, Roberts ZV, Dynlacht JR. Heat-induced modulation of lamin B content in two different cell lines. *J. Cell. Biochem.* 1999;75(4):620-628.
31. Arrigo AP, Suhan JP, Welch WJ. Dynamic changes in the structure and intracellular locale of the mammalian low-molecular-weight heat shock protein. *Mol. Cell. Biol.* 1988 Dec;8(12):5059-5071.
32. Mizzen LA, Welch WJ. Characterization of the thermotolerant cell. I. Effects on protein synthesis activity and the regulation of heat-shock protein 70 expression. *J. Cell Biol.* 1988 Apr;106(4):1105-1116.
33. Welch WJ, Mizzen LA. Characterization of the thermotolerant cell. II. Effects on the intracellular distribution of heat-shock protein 70, intermediate filaments, and small nuclear ribonucleoprotein complexes. *J. Cell Biol.* 1988 Apr;106(4):1117-1130.
34. Welch WJ, Suhan JP. Cellular and biochemical events in mammalian cells during and after recovery from physiological stress. *J. Cell Biol.* 1986 Nov;103(5):2035-2052.
35. Welch WJ, Feramisco JR. Nuclear and nucleolar localization of the 72,000-dalton heat shock protein in heat-shocked mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 1984 Apr 10;259(7):4501-4513.
36. Buffa P, Guarriera-Bobyleva V, Muscatello U, Pasquali-Ronchetti I. Conformational changes of mitochondria associated with uncoupling of oxidative phosphorylation in vivo and in vitro. *Nature.* 1970 Apr 18;226(5242):272-274.
37. Turano C, Ferraro A, Strom R, Cavaliere R, Fanelli A. The biochemical mechanism of selective heat sensitivity of cancer cells: III. Studies on lysosomes. *Eur J Cancer.* 1970 Apr;6(2):67-72.
38. Hildebrandt B, Wust P, Ahlers O, Dieing A, Sreenivasa G, Kerner T, et al. The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2002 Jul;43(1):33-56.
39. Burdon RH, Kerr SM, Cutmore CM, Munro J, Gill V. Hyperthermia, Na+K+ATPase and lactic acid production in some human tumour cells. *Br. J. Cancer.* 1984 Apr;49(4):437-445.
40. Thews G, Mutschler E, Vaupel P. *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen.* 6th ed. Wissenschaftliche Verlagsges.; 2007.
41. Storey KB. *Functional metabolism: regulation and adaptation.* Wiley-IEEE; 2004.
42. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry.* 4th ed. W. H. Freeman; 2004.

43. Baronzio GF, Gramaglia A, Baronzio A, Freitas I. Influence of tumor microenvironment on thermoresponse: Biological and clinical implications. In: *Hyperthermia in cancer treatment*. Springer; 2006. p. 68-91.
44. Vaupel PW, Kelleher DK. Metabolic status and reaction to heat of normal and tumor tissue. In: *Thermoradiotherapy and thermochemotherapy - Volume 1: Biology, Physiology, and Physics*. Springer; 1995. p. 159-176.
45. Mondovì B, Rotilio G, Strom R, Finazzi-Agrò A, Cavaliere R, Moricca G, et al. Biochemical mechanism of selective heat sensitivity of tumour cells: preliminary results. *Ital. J. Biochem.* 1968 Apr;17(2):101-106.
46. Lee SY, Ryu KH, Kang MS, Song CW. Effect of hyperthermia on the lactic acid and beta-hydroxybutyric acid content in tumour. *Int J Hyperthermia.* 1986 Jun;2(2):213-222.
47. Streffer C. Aspects of metabolic change after hyperthermia. *Recent Results Cancer Res.* 1988;107:7-16.
48. Streffer C. Biological basis of thermotherapy (with special reference to oncology). In: *Biological basis of oncologic thermotherapy*. Springer-Verlag; 1990.
49. Streffer C, van Beuningen D. The biological basis for tumour therapy by hyperthermia and radiation. *Recent Results Cancer Res.* 1987;104:24-70.
50. Streffer C. Biological basis for the use of hyperthermia in tumour therapy. *Strahlenther Onkol.* 1987 Jul;163(7):416-419.
51. Song CW, Clement JJ, Levitt SH. Cytotoxic and radiosensitizing effects of 5-thio-D-glucose on hypoxic cells. *Radiology.* 1977 Apr;123(1):201-205.
52. Kim SH, Kim JH, Hahn EW. Selective potentiation of hyperthermic killing of hypoxic cells by 5-thio-D-glucose. *Cancer Res.* 1978 Sep;38(9):2935-2938.
53. Kim JH, Kim SH, Alfieri AA, Young CW. Quercetin, an inhibitor of lactate transport and a hyperthermic sensitizer of HeLa cells. *Cancer Res.* 1984 Jan;44(1):102-106.
54. Kim SH, Kim JH, Alfieri AA, He SQ, Young CW. Gossypol, a hyperthermic sensitizer of HeLa cells. *Cancer Res.* 1985 Dec;45(12 Pt 1):6338-6340.
55. Coss RA, Storck CW, Daskalakis C, Berd D, Wahl ML. Intracellular acidification abrogates the heat shock response and compromises survival of human melanoma cells. *Mol. Cancer Ther.* 2003 Apr;2(4):383-388.
56. Will O, Mahler HC, Arrigo AP, Epe B. Influence of glutathione levels and heat-shock on the steady-state levels of oxidative DNA base modifications in mammalian cells. *Carcinogenesis.* 1999 Feb;20(2):333-337.

57. Biesalski HK, Franklin J. Antioxidants in cancer therapy: is there a rationale to recommend antioxidants during cancer therapy? In: Pompella A, Bánhégyi G, Wellman-Rousseau M, editors. Thiol metabolism and redox regulation of cellular functions. IOS Press; 2002. p. 252-264.
58. Yoshikawa T, Kokura S, Tainaka K, Itani K, Oyamada H, Kaneko T, et al. The role of active oxygen species and lipid peroxidation in the antitumor effect of hyperthermia. *Cancer Res.* 1993 May 15;53(10 Suppl):2326-2329.
59. Loven DP, Leeper DB, Oberley LW. Superoxide dismutase levels in Chinese hamster ovary cells and ovarian carcinoma cells after hyperthermia or exposure to cycloheximide. *Cancer Res.* 1985 Jul;45(7):3029-3033.
60. Omar RA, Yano S, Kikkawa Y. Antioxidant enzymes and survival of normal and simian virus 40-transformed mouse embryo cells after hyperthermia. *Cancer Res.* 1987 Jul 1;47(13):3473-3476.
61. Skibba JL, Quebbeman EJ, Kalbfleisch JH. Nitrogen metabolism and lipid peroxidation during hyperthermic perfusion of human livers with cancer. *Cancer Res.* 1986 Nov;46(11):6000-6003.
62. Lin PS, Quamo S, Ho KC, Gladding J. Hyperthermia enhances the cytotoxic effects of reactive oxygen species to Chinese hamster cells and bovine endothelial cells in vitro. *Radiat. Res.* 1991 Apr;126(1):43-51.
63. Powers RH, Stadnicka A, Kalbfleisch JH, Skibba JL. Involvement of xanthine oxidase in oxidative stress and iron release during hyperthermic rat liver perfusion. *Cancer Res.* 1992 Apr 1;52(7):1699-1703.
64. Permyakov E. Metalloproteomics. Wiley-Interscience; 2009.
65. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N. Engl. J. Med.* 1985 Jan 17;312(3):159-163.
66. Skibba JL, Gwartney EA. Liver hyperthermia and oxidative stress: role of iron and aldehyde production. *Int J Hyperthermia.* 1997 Apr;13(2):215-226.
67. Strom R, Santoro AS, Crifo' C, Bozzi A, Mondovi' B, Fanelli AR. The biochemical mechanism of selective heat sensitivity of cancer cells. IV. Inhibition of RNA synthesis. *Eur J Cancer.* 1973 Feb;9(2):103-112.
68. Hall EJ, Giaccia AJ. Cell survival curves. In: *Radiobiology for the radiologist.* Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 30-46.
69. Dewhirst MW. Thermal dosimetry. In: *Thermoradiotherapy and thermochemotherapy - Volume 1: Biology, Physiology, and Physics.* Springer; 1995. p. 123-138.
70. Sneed PK, Stea B. Thermoradiotherapy for brain tumors. In: *Thermoradiotherapy And Thermochemotherapy - Volume 2: Clinical Applications.* Springer Verlag; 1996.

71. Jung H. A generalized concept for cell killing by heat. *Radiat. Res.* 1986 Apr;106(1):56-72.
72. Jung H. A generalized concept for cell killing by heat. Effect of acutely induced thermotolerance and decay of thermosensitization. *Radiat. Res.* 1994 Sep;139(3):280-289.
73. Jung H. A generalized concept for cell killing by heat. Effect of chronically induced thermotolerance. *Radiat. Res.* 1991 Sep;127(3):235-242.
74. G Pincus, A Fischer. The growth and death of tissues cultures exposed to supranormal temperatures. *J. Exp. Med.* 1931;54:323-332.
75. Dewhirst MW, Viglianti BL, Lora-Michiels M, Hanson M, Hoopes PJ. Basic principles of thermal dosimetry and thermal thresholds for tissue damage from hyperthermia. *Int J Hyperthermia.* 2003;19(3):267.
76. F.H. Jonhson, H. Eyring, M.J. Polisar. *The kinetic basis of molecular biology.* John Wiley, New York; 1954.
77. Bischof JC, He X. Thermal stability of proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006;1066:12-33.
78. Privalov PL, Tiktopulo EI, Tischenko VM. Stability and mobility of the collagen structure. *J. Mol. Biol.* 1979 Jan 15;127(2):203-216.
79. Jorritsma JB, Konings AW. The occurrence of DNA strand breaks after hyperthermic treatments of mammalian cells with and without radiation. *Radiat. Res.* 1984 Apr;98(1):198-208.
80. Rofstad EK, Brustad T. Arrhenius analysis of the heat response in vivo and in vitro of human melanoma xenografts. *Int J Hyperthermia.* 1986 Dec;2(4):359-368.
81. Dewey WC. Arrhenius relationships from the molecule and cell to the clinic. *Int J Hyperthermia.* 1994 Aug;10(4):457-483.
82. Nielsen OS, Overgaard J. Importance of preheating temperature and time for the induction of thermotolerance in a solid tumour in vivo. *Br. J. Cancer.* 1982 Dec;46(6):894-903.
83. Dewey WC. Arrhenius relationships from the molecule and cell to the clinic. *Int J Hyperthermia.* 2009;25(1):3 - 20.
84. Sapareto SA. A workshop on thermal dose in cancer therapy: introduction. *Int J Hyperthermia.* 1987 Aug;3(4):289-290.
85. Sapareto SA. Thermal isoeffect dose: addressing the problem of thermotolerance. *Int J Hyperthermia.* 1987 Aug;3(4):297-305.
86. Legendijk JJW. Hyperthermia treatment planning. *Phys Med Biol.* 2000;45(5):R61-R76.

87. Field SB, Morris CC. The relationship between heating time and temperature: its relevance to clinical hyperthermia. *Radiother Oncol.* 1983 Nov;1(2):179-186.
88. Baiotto B, Marini P. Thermometry: Clinical Aspects and Perspectives. In: *Hyperthermia in cancer treatment.* Springer; 2006. p. 19-26.
89. Vidair CA, Dewey WC. Two distinct modes of hyperthermic cell death. *Radiat. Res.* 1988 Oct;116(1):157-171.
90. Rofstad EK, Brustad T. Effect of hyperthermia on human melanoma cells heated either as solid tumors in athymic nude mice or in vitro. *Cancer.* 1982 Oct 1;50(7):1304-1308.
91. Song CW, Kang MS, Rhee JG, Levitt SH. The effect of hyperthermia on vascular function, pH, and cell survival. *Radiology.* 1980 Dec;137(3):795-803.
92. Kang MS, Song CW. The effect of hyperthermia on cell survival in a mouse tumour without blood flow. *Br J Radiol.* 1980 Jun;53(630):606-607.
93. Crile G. The effects of heat and radiation on cancers implanted on the feet of mice. *Cancer Res.* 1963 Mar;23:372-380.
94. Kallinowski F, Schlenger KH, Runkel S, Kloes M, Stohrer M, Okunieff P, et al. Blood Flow, Metabolism, Cellular Microenvironment, and Growth Rate of Human Tumor Xenografts. *Cancer Res.* 1989 Jul 15;49(14):3759-3764.
95. Song CW. Effect of Local Hyperthermia on Blood Flow and Microenvironment: A Review. *Cancer Res.* 1984 Oct 1;44(10_Supplement):4721s-4730.
96. Li JH, Liu FF. Intracellular pH and heat sensitivity in two human cancer cell lines. *Radiother Oncol.* 1997 Jan;42(1):69-76.
97. Latchman DS, editor. *Stress Proteins.* Berlin: Springer; 1999.
98. Henderson B. Integrating the cell stress response: a new view of molecular chaperones as immunological and physiological homeostatic regulators. *Cell Biochem. Funct.* 2010;28(1):1-14.
99. Soti C, Pál C, Papp B, Csermely P. Molecular chaperones as regulatory elements of cellular networks. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2005 Apr;17(2):210-215.
100. Novartis Foundation. *The biology of extracellular molecular chaperones.* John Wiley and Sons; 2008.
101. Sharp FR, Massa SM, Swanson RA. Heat-shock protein protection. *Trends Neurosci.* 1999 Mar 1;22(3):97-99.
102. Eden WV, Young DB. *Stress proteins in medicine.* Informa Health Care; 1996.

103. Arrigo A, Müller WEG. Small stress proteins. Springer; 2002.
104. Csermely P, Korcsmáros T, Sulyok K. Stress responses in biology and medicine. Blackwell Pub.; 2007.
105. Csermely P, Víg L. Molecular aspects of the stress response. Springer; 2007.
106. Multhoff G. Heat shock proteins in immunity. *Handb Exp Pharmacol.* 2006;(172):279-304.
107. Morimoto RI, Santoro MG. Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. *Nat. Biotechnol.* 1998 Sep;16(9):833-838.
108. Feige DU. Stress-inducible cellular responses. Birkhäuser; 1996.
109. Shi Y, Morimoto R. Autoregulation of the heat shock response. In: Latchman D, editor. *Stress Proteins.* Berlin Heidelberg New York: Springer- Verlag; 1999. p. 225-241.
110. Anckar J, Sistonen L. Heat Shock Factor 1 as a Coordinator of Stress and Developmental Pathways. In: *Molecular Aspects of the Stress Response: Chaperones, Membranes and Networks.* 2007. p. 78-88.
111. Trinklein ND, Murray JI, Hartman SJ, Botstein D, Myers RM. The role of heat shock transcription factor 1 in the genome-wide regulation of the mammalian heat shock response. *Mol. Biol. Cell.* 2004 Mar;15(3):1254-1261.
112. Yoo HY, Chang MS, Rho HM. The activation of the rat copper/zinc superoxide dismutase gene by hydrogen peroxide through the hydrogen peroxide-responsive element and by paraquat and heat shock through the same heat shock element. *J. Biol. Chem.* 1999 Aug 20;274(34):23887-23892.
113. Vilaboa NE, Galán A, Troyano A, de Blas E, Aller P. Regulation of multidrug resistance 1 (MDR1)/P-glycoprotein gene expression and activity by heat-shock transcription factor 1 (HSF1). *J. Biol. Chem.* 2000 Aug 11;275(32):24970-24976.
114. Callahan MK, Wohlfert EA, Ménoret A, Srivastava PK. Heat shock up-regulates Imp2 and Imp7 and enhances presentation of immunoproteasome-dependent epitopes. *J. Immunol.* 2006 Dec 15;177(12):8393-8399.
115. Rossi A, Ciafrè S, Balsamo M, Pierimarchi P, Santoro MG. Targeting the heat shock factor 1 by RNA interference: a potent tool to enhance hyperthermochemotherapy efficacy in cervical cancer. *Cancer Res.* 2006 Aug 1;66(15):7678-7685.
116. Li T, Spearow J, Rubin CM, Schmid CW. Physiological stresses increase mouse short interspersed element (SINE) RNA expression in vivo. *Gene.* 1999 Nov 1;239(2):367-372.
117. Liu XD, Liu PC, Santoro N, Thiele DJ. Conservation of a stress response: human heat shock transcription factors functionally substitute for yeast HSF. *EMBO J.* 1997 Nov 3;16(21):6466-6477.

118. Khaleque MA, Bharti A, Sawyer D, Gong J, Benjamin IJ, Stevenson MA, et al. Induction of heat shock proteins by heregulin [beta]1 leads to protection from apoptosis and anchorage-independent growth. *Oncogene*. 2005 Jun 13;24(43):6564-6573.
119. Stove C, Bracke M. Roles for neuregulins in human cancer. *Clin. Exp. Metastasis*. 2004;21(8):665-684.
120. Escribá PV, González-Ros JM, Goñi FM, Kinnunen PKJ, Vigh L, Sánchez-Magraner L, et al. Membranes: a meeting point for lipids, proteins and therapies. *J. Cell. Mol. Med*. 2008 Jun;12(3):829-875.
121. Nishizawa J, Nagata K. Regulation of heat shock transcription factors by hypoxia or ischemia/reperfusion in heart and brain. In: Latchman D, editor. *Stress Proteins*. Berlin: Springer; 1999. p. 201.
122. Michiels C, Minet E, Mottet D, Raes M. Regulation of gene expression by oxygen: NF-kappaB and HIF-1, two extremes. *Free Radic. Biol. Med*. 2002 Nov 1;33(9):1231-1242.
123. Hockel M, Vaupel P. Tumor Hypoxia: Definitions and Current Clinical, Biologic, and Molecular Aspects. *J. Natl. Cancer Inst*. 2001 Feb 21;93(4):266-276.
124. Quintero M, Mackenzie N, Brennan PA. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) in cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2004 Jun;30(5):465-468.
125. Mabjeesh NJ, Amir S. Hypoxia-inducible factor (HIF) in human tumorigenesis. *Histol. Histopathol*. 2007 May;22(5):559-572.
126. Semenza GL. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol Med*. 2002;8(4 Suppl):S62-67.
127. Hockel M, Vaupel P. The prognostic significance of hypoxia in cervical cancer: a radiobiological or tumor biological phenomenon? In: Molls M, Vaupel P, editors. *Blood perfusion and microenvironment of human tumors*. Springer; 2000. p. 73-79.
128. Hypoxia-inducible factor. In: *Cancer Biology*. Oxford University Press, USA; 2007. p. 204.
129. Bachelet M, Multhoff G, Vignola M, Himeno K, Polla B. Heat shock proteins in inflammation and immunity. In: *Stress Proteins*. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag; 1999. p. 281-303.
130. Freitas I, Boncompagni E, Vaccarone R, Fenoglio C, Barni S, Baronzio GF. Iron accumulation in mammary tumor suggests a tug of war between tumor and host for the microelement. *Anticancer Res*. 2007 Oct;27(5A):3059-3065.
131. Chiche J, Ilc K, Laferriere J, Trottier E, Dayan F, Mazure NM, et al. Hypoxia-Inducible Carbonic Anhydrase IX and XII Promote Tumor Cell Growth by Counteracting Acidosis through the Regulation of the Intracellular pH. *Cancer Res*. 2009 Jan 1;69(1):358-368.

132. Baird NA, Turnbull DW, Johnson EA. Induction of the heat shock pathway during hypoxia requires regulation of heat shock factor by hypoxia-inducible factor-1. *J. Biol. Chem.* 2006 Dec 15;281(50):38675-38681.
133. Li G, Mivechi N. Heat shock protein 70. In: Latchman D, editor. *Stress Proteins*. Berlin: Springer; 1999. p. 43.
134. Kirkegaard T, Roth AG, Petersen NHT, Mahalka AK, Olsen OD, Moilanen I, et al. Hsp70 stabilizes lysosomes and reverts Niemann-Pick disease-associated lysosomal pathology. *Nature*. 2010 Jan 28;463(7280):549-553.
135. Habash RWY, Bansal R, Krewski D, Alhafid HT. Thermal therapy, part 1: an introduction to thermal therapy. *Crit Rev Biomed Eng.* 2006;34(6):459-489.
136. Glossary of terms for thermal physiology. *J. Therm. Biol.* 2003 Jan;28(1):75-106.
137. Luk K, Hulse R. Hyperthermia in Cancer Therapy. *West J Med.* 1980 Mar;132:179.
138. Engin K. Biological rationale and clinical experience with hyperthermia. *Control Clin Trials.* 1996 Aug;17(4):316-342.
139. Falk MH, Issels RD. Hyperthermia in oncology. *Int J Hyperthermia.* 2001 Feb;17(1):1-18.
140. Baronzio GF, Hager ED. *Hyperthermia in cancer treatment*. Springer; 2006.
141. Dewhirst MW, Jones E, Samulski T, Vujaskovic Z, Li C, Prosnitz L. *Clinical Hyperthermia*. In: *Cancer Medicine*. B.C. Decker; 2003.
142. Habash RWY, Bansal R, Krewski D, Alhafid HT. Thermal therapy, Part III: ablation techniques. *Crit Rev Biomed Eng.* 2007;35(1-2):37-121.
143. Urano M, Douple EB. *Thermal effects on cells and tissues*. VSP; 1988.
144. LeVeen HH, Wapnick S, Piccone V, Falk G, Ahmed Nafis. Tumor eradication by radiofrequency therapy. Responses in 21 patients. *JAMA.* 1976 May 17;235(20):2198-2200.
145. Hiraoka M, Jo S, Akuta K, Nishimura Y, Takahashi M, Abe M. Radiofrequency capacitive hyperthermia for deep-seated tumors. I. Studies on thermometry. *Cancer.* 1987 Jul 1;60(1):121-127.
146. Kelleher DK, Vaupel PW. Vascular effects of localized hyperthermia. In: *Hyperthermia in cancer treatment*. Springer; 2006. p. 99-109.
147. Hildebrandt B, Wust P. Interactions between hyperthermia and cytotoxic drugs. *Cancer Treat. Res.* 2007;134:185-193.
148. Dieing A, Ahlers O, Hildebrandt B, Kerner T, Tamm I, Possinger K, et al. The effect of

- induced hyperthermia on the immune system. *Prog. Brain Res.* 2007;162:137-152.
149. Molls M, Vaupel P, editors. *Blood perfusion and microenvironment of human tumors.* Springer; 2000.
 150. Urano M, Douple EB. *Chemopotential by Hyperthermia.* VSP; 1994.
 151. Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res.* 1989 Dec 1;49(23):6449-6465.
 152. Gautherie M, Streffer C, Vaupel P, Hahn GM. *Biological basis of oncologic thermotherapy.* Springer-Verlag; 1990.
 153. Vaupel P, Schlenger K, Hoekel M. Blood flow and tissue oxygenation of human tumors: an update. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1992;317:139-151.
 154. Vaupel PW, Kelleher DK. Pathophysiological and vascular characteristics of tumours and their importance for hyperthermia: Heterogeneity is the key issue. *Int J Hyperthermia.* 2010 Mar 26;
 155. Vaupel P. Physiological properties of malignant tumours. *NMR Biomed.* 1992 Oct;5(5):220-225.
 156. Baronzio G, Fiorentini G, Cogle CR. *Cancer Microenvironment and Therapeutic Implications: Tumor Pathophysiology Mechanisms and Therapeutic Strategies.* Springer; 2009.
 157. Ruddle RWR. *Cancer Biology.* 4th ed. Oxford University Press, USA; 2007.
 158. Ward KA, Jain RK. Response of tumours to hyperglycaemia: characterization, significance and role in hyperthermia. *Int J Hyperthermia.* 1988 Jun;4(3):223-250.
 159. Feldmann HJ, Molls M, Vaupel P. Clinical investigations on blood perfusions in human tumors. In: Molls M, Vaupel P, editors. *Blood perfusion and microenvironment of human tumors.* Springer; 2000. p. 47-62.
 160. Waterman FM, Nerlinger RE, Moylan DJ, Leeper DB. Response of human tumor blood flow to local hyperthermia. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1987 Jan;13(1):75-82.
 161. Waterman FM, Tupchong L, Liu CR. Modified thermal clearance technique for determination of blood flow during local hyperthermia. *Int J Hyperthermia.* 1991 Oct;7(5):719-733.
 162. Samulski TV, Fessenden P, Valdagni R, Kapp DS. Correlations of thermal washout rate, steady state temperatures, and tissue type in deep seated recurrent or metastatic tumors. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1987 Jun;13(6):907-916.
 163. Lagendijk JJ, Hofman P, Schipper J. Perfusion analyses in advanced breast carcinoma during hyperthermia. *Int J Hyperthermia.* 1988 Oct;4(5):479-495.
 164. Feldmann HJ, Molls M, Hoederath A, Krümpelmann S, Sack H. Blood flow and steady state

- temperatures in deep-seated tumors and normal tissues. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1992;23(5):1003-1008.
165. Vaupel P. Tumor blood flow. In: Molls M, Vaupel P, editors. *Blood perfusion and microenvironment of human tumors*. Springer; 2000. p. 41-45.
166. Schwab M. *Encyclopedia of Cancer*. 2nd ed. Springer; 2008.
167. Döme B, Hendrix MJC, Paku S, Tóvári J, Tímár J. Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am. J. Pathol.* 2007 Jan;170(1):1-15.
168. Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 2002 May;282(5):C947-970.
169. Kioi M, Vogel H, Schultz G, Hoffman RM, Harsh GR, Brown JM. Inhibition of vasculogenesis, but not angiogenesis, prevents the recurrence of glioblastoma after irradiation in mice. *J Clin Invest.* 2010 Mar 1;120(3):694-705.
170. Konerding MA, van Ackern C, Fait E, Steinberg F, Streffer C. Morphological aspects of tumor angiogenesis and microcirculation. In: Molls M, Vaupel P, editors. *Blood perfusion and microenvironment of human tumors*. Springer; 2000. p. 5-17.
171. Freitas I, Baronzio GF, Bono B, Griffini P, Bertone V, Sonzini N, et al. Tumor interstitial fluid: misconsidered component of the internal milieu of a solid tumor. *Anticancer Res.* 1997 Feb;17(1A):165-172.
172. Baxter LT, Jain RK. Transport of fluid and macromolecules in tumors. I. Role of interstitial pressure and convection. *Microvasc. Res.* 1989 Jan;37(1):77-104.
173. Baxter LT, Jain RK. Transport of fluid and macromolecules in tumors. II. Role of heterogeneous perfusion and lymphatics. *Microvasc. Res.* 1990 Sep;40(2):246-263.
174. Baxter L, Zhu H, Mackensen D, Jain R. Physiologically based pharmacokinetic model for specific and nonspecific monoclonal antibodies and fragments in normal tissues and human tumor xenografts in nude mice. *Cancer Res.* 1994 Mar;54(6):1517-1528.
175. Funaki B, Lorenz J, Ha TV, editors. *Teaching Atlas of Vascular and Non-Vascular Interventional Radiology*. Thieme; 2007.
176. Shakil A, Osborn JL, Song CW. Changes in oxygenation status and blood flow in a rat tumor model by mild temperature hyperthermia. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1999 Mar 1;43(4):859-865.
177. Song CW, Lin JC, Chelstrom LM, Levitt SH. The kinetics of vascular thermotolerance in SCK tumors of A/J mice. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1989 Oct;17(4):799-802.
178. Song CW, Chelstrom LM, Sung JH. Effects of a second heating on blood flow in tumors. *Radiat. Res.* 1990 Apr;122(1):66-71.

179. Evans SS, Frey M, Schleider DM, Bruce RA, Wang W, Repasky EA, et al. Regulation of leukocyte-endothelial cell interactions in tumor immunity. In: *The biology of tumors*. Springer; 1998. p. 273-286.
180. Stubbs M. Tumor pH. In: Molls M, Vaupel P, editors. *Blood perfusion and microenvironment of human tumors*. Springer; 2000. p. 113-120.
181. Gerweck LE, Seetharaman K. Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: potential exploitation for the treatment of cancer. *Cancer Res*. 1996 Mar 15;56(6):1194-1198.
182. Roca C, Primo L, Valdembri D, Cividalli A, Declerck P, Carmeliet P, et al. Hyperthermia inhibits angiogenesis by a plasminogen activator inhibitor 1-dependent mechanism. *Cancer Res*. 2003 Apr 1;63(7):1500-1507.
183. Spoerke N, Underwood S, Differding J, Van P, Sambasivan C, Shapiro D, et al. Effects of ethanol intoxication and gender on blood coagulation. *J Trauma*. 2010 May;68(5):1106-1111.
184. Seth D, Hogg P, Gorrell M, Mccaughan G, Haber P. Direct effects of alcohol on hepatic fibrinolytic balance: Implications for alcoholic liver disease. *Journal of Hepatology*. 2008 4;48(4):614-627.
185. Kampinga HH, Dikomey E. Hyperthermic radiosensitization: mode of action and clinical relevance. *Int. J. Radiat. Biol*. 2001;77(4):399.
186. Seegenschmiedt MN, Fessenden P, Vernon CC. *Thermoradiotherapy And Thermochemotherapy - Volume 2: Clinical Applications*. Springer Verlag; 1996.
187. Douple EB. *Biology of thermal potentiation of radiotherapy*. VSP; 1989.
188. Iliakis G, Wu W, Wang M. DNA double strand break repair inhibition as a cause of heat radiosensitization: re-evaluation considering backup pathways of NHEJ. *Int J Hyperthermia*. 2008 Feb;24(1):17-29.
189. Song CW, Park HJ, Lee CK, Griffin R. Implications of increased tumor blood flow and oxygenation caused by mild temperature hyperthermia in tumor treatment. *Int J Hyperthermia*. 2005;21(8):761.
190. Song CW, Park H, Griffin RJ. Improvement of tumor oxygenation by mild hyperthermia. *Radiat. Res*. 2001 Apr;155(4):515-528.
191. Vujaskovic Z, Song CW. Physiological mechanisms underlying heat-induced radiosensitization. *Int J Hyperthermia*. 2004 Mar;20(2):163-174.
192. Urano M, Douple EB. *Interstitial hyperthermia*. VSP; 1992.
193. Hall EJ, Giaccia AJ. *Radiobiology for the radiologist*. Lippincott Williams & Wilkins; 2006.

194. Song CW, Griffin R, Park HJ. Influence of Tumor pH on Therapeutic Response. In: Cancer drug resistance. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2006. p. 21-42.
195. Chen B, Roskams T, de Witte PAM. Enhancing the antitumoral effect of hypericin-mediated photodynamic therapy by hyperthermia. *Lasers Surg Med.* 2002;31(3):158-163.
196. Freitas I. Role of hypoxia in photodynamic therapy of tumors. *Tumori.* 1985 Jun 30;71(3):251-259.
197. Siemann DW, Horsman MR, Chaplin DJ. Modification of oxygen supply. In: Molls M, Vaupel P, editors. Blood perfusion and microenvironment of human tumors. Springer; 2000. p. 209-218.
198. Grau C, Overgaard J. Significance of hemoglobin concentration for treatment outcome. In: Molls M, Vaupel P, editors. Blood perfusion and microenvironment of human tumors. Springer; 2000. p. 101-112.
199. Brown JM. The potential benefit of hypoxic cytotoxins in radio-oncology. In: Molls M, Vaupel P, editors. Blood perfusion and microenvironment of human tumors. Springer; 2000. p. 219-229.
200. Bache M, Kappler M, Said HM, Staab A, Vordermark D. Detection and specific targeting of hypoxic regions within solid tumors: current preclinical and clinical strategies. *Curr. Med. Chem.* 2008;15(4):322-338.
201. Song CW. Modification of blood flow. In: Molls M, Vaupel P, editors. Blood perfusion and microenvironment of human tumors. Springer; 2000. p. 193-208.
202. Field SB. In vivo aspects of hyperthermic oncology. In: Field SB, Hand JW, editors. An Introduction to the practical aspects of clinical hyperthermia. New York, London, Philadelphia: Taylor & Francis; 1990. p. 55-68.
203. Regulation of heat shock genes by cytokines. In: Stress Proteins. Berlin: Springer; 1999. p. 201.
204. Rossi A, Elia G, Santoro MG. Inhibition of nuclear factor kappa B by prostaglandin A1: an effect associated with heat shock transcription factor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997 Jan 21;94(2):746-750.
205. Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. *Cell.* 1996 Oct 4;87(1):13-20.
206. Baldwin AS. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* 1996;14:649-683.
207. Schmitt E, Gehrman M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J. Leukoc. Biol.* 2007 Jan;81(1):15-27.

208. Wells AD, Malkovsky M. Heat shock proteins, tumor immunogenicity and antigen presentation: an integrated view. *Immunol. Today*. 2000 Mar;21(3):129-132.
209. Sherman MY, Goldberg AL. Cellular Defenses against Unfolded Proteins: A Cell Biologist Thinks about Neurodegenerative Diseases. *Neuron*. 2001 Jan;29(1):15-32.
210. Pockley AG, Muthana M. Heat shock proteins and allograft rejection. *Contrib Nephrol*. 2005;148:122-134.
211. Segal BH, Wang X, Dennis CG, Youn R, Repasky EA, Manjili MH, et al. Heat shock proteins as vaccine adjuvants in infections and cancer. *Drug Discov. Today*. 2006 Jun;11(11-12):534-540.
212. Muthukrishnan L, Warder E, McNeil PL. Basic fibroblast growth factor is efficiently released from a cytosolic storage site through plasma membrane disruptions of endothelial cells. *J. Cell. Physiol*. 1991 Jul;148(1):1-16.
213. Srivastava M. Heat shock protein-peptide interaction: Basis for a new generation of vaccines against cancers and intracellular infections. In: Latchman D, editor. *Stress Proteins*. Berlin Heidelberg New York: Springer- Verlag; 1999. p. 403-414.
214. Habash R. *Bioeffects and Therapeutic Applications of Electromagnetic Energy*. Boca Raton: CRC Press; 2008.
215. Kaneko Y, Maruyama T, Takegami K, Watanabe T, Mitsui H, Hanajiri K, et al. Use of a microbubble agent to increase the effects of high intensity focused ultrasound on liver tissue. *Eur Radiol*. 2005 Jul;15(7):1415-1420.
216. Day ES, Morton JG, West JL. Nanoparticles for thermal cancer therapy. *J Biomech Eng*. 2009 Jul;131(7):074001.
217. Cullity BD, Graham CD. *Introduction to Magnetic Materials*. Wiley-IEEE; 2008.
218. Johannsen M, Gneveckow U, Thiesen B, Taymoorian K, Cho CH, Waldöfner N, et al. Thermotherapy of prostate cancer using magnetic nanoparticles: feasibility, imaging, and three-dimensional temperature distribution. *Eur. Urol*. 2007 Dec;52(6):1653-1661.
219. Johannsen M, Gneveckow U, Taymoorian K, Thiesen B, Waldöfner N, Scholz R, et al. Morbidity and quality of life during thermotherapy using magnetic nanoparticles in locally recurrent prostate cancer: results of a prospective phase I trial. *Int J Hyperthermia*. 2007 May;23(3):315-323.
220. Thiesen B, Jordan A. Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia. *Int J Hyperthermia*. 2008 Sep;24(6):467-474.
221. Wust P, Gneveckow U, Johannsen M, Böhmer D, Henkel T, Kahmann F, et al. Magnetic nanoparticles for interstitial thermotherapy--feasibility, tolerance and achieved temperatures. *Int J Hyperthermia*. 2006 Dec;22(8):673-685.

222. Maier-Hauff K, Rothe R, Scholz R, Gneveckow U, Wust P, Thiesen B, et al. Intracranial thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external beam radiotherapy: results of a feasibility study on patients with glioblastoma multiforme. *J. Neurooncol.* 2007 Jan;81(1):53-60.
223. Hilger I, Andrä W, Hergt R, Hiergeist R, Schubert H, Kaiser WA. Electromagnetic heating of breast tumors in interventional radiology: in vitro and in vivo studies in human cadavers and mice. *Radiology.* 2001 Feb;218(2):570-575.
224. Hilger I, Hiergeist R, Hergt R, Winnefeld K, Schubert H, Kaiser WA. Thermal ablation of tumors using magnetic nanoparticles: an in vivo feasibility study. *Invest Radiol.* 2002 Oct;37(10):580-586.
225. Ivkov R, DeNardo SJ, Daum W, Foreman AR, Goldstein RC, Nemkov VS, et al. Application of high amplitude alternating magnetic fields for heat induction of nanoparticles localized in cancer. *Clin. Cancer Res.* 2005 Oct 1;11(19 Pt 2):7093s-7103s.
226. Brezovich IA, Meredith RF. Practical aspects of ferromagnetic thermoseed hyperthermia. *Radiol. Clin. North Am.* 1989 May;27(3):589-602.
227. Jiles D. Introduction to magnetism and magnetic materials. CRC Press; 1998.
228. Cornell RM. The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrence and Uses. Weinheim [etc.]: VCH; 1996.
229. Tucker RD. Use of interstitial temperature self-regulating thermal rods in the treatment of prostate cancer. *J. Endourol.* 2003 Oct;17(8):601-607.
230. Deger S, Taymoorian K, Boehmer D, Schink T, Roigas J, Wille AH, et al. Thermoradiotherapy using interstitial self-regulating thermoseeds: an intermediate analysis of a phase II trial. *Eur. Urol.* 2004 May;45(5):574-579; discussion 580.
231. Hubert AE, Schäfer R. Magnetic Domains. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 1998.
232. Hergt R, Andrä W. Magnetic Hyperthermia and Thermoablation. In: *Magnetism in Medicine: A Handbook.* Weinheim: Wiley-VCH; 2007. p. 550.
233. Jordan A, Wust P, Fähling H, John W, Hinz A, Felix R. Inductive heating of ferrimagnetic particles and magnetic fluids: physical evaluation of their potential for hyperthermia. *Int J Hyperthermia.* 1993 Feb;9(1):51-68.
234. Hergt R, Hiergeist R, Hilger I, Kaiser WA, Lapatnikov Y, Margel S, et al. Maghemite nanoparticles with very high AC-losses for application in RF-magnetic hyperthermia. *J Magn Magn Mater.* 2004 Apr;270(3):345-357.
235. Feyen M, Heim E, Ludwig F, Schmidt AM. Magnetic Nanorotors with Tailored Field-Induced Dynamics. *Chem Mater.* 2008 May 1;20(9):2942-2948.

236. Levy M, Wilhelm C, Siaugue J, Horner O, Bacri J, Gazeau F. Magnetically induced hyperthermia: size-dependent heating power of γ -Fe₂O₃ nanoparticles. *J Phys Condens Matter*. 2008;20(20):204133.
237. Schwertmann U. *Iron Oxides in the Laboratory: Preparation and Characterization*. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2000.
238. Ma M, Wu Y, Zhou J, Sun Y, Zhang Y, Gu N. Size dependence of specific power absorption of Fe₃O₄ particles in AC magnetic field. *J Magn Magn Mater*. 2004 Jan;268(1-2):33-39.
239. Hergt R, Dutz S, Roder M. Effects of size distribution on hysteresis losses of magnetic nanoparticles for hyperthermia. *J Phys Condens Matter*. 2008;20(38):385214.
240. Giri J, Guha Thakurta S, Bellare J, Kumar Nigam A, Bahadur D. Preparation and characterization of phospholipid stabilized uniform sized magnetite nanoparticles. *J Magn Magn Mater*. 2005 May;293(1):62-68.
241. Bakandritsos A, Bouropoulos N, Koutoulogenis A, Boukos N, Fatouros D. Synthesis and Characterization of Iron Oxide Nanoparticles Encapsulated in Lipid Membranes. *J Biomed Nanotechnol*. 2008 Sep;4:313-318.
242. Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small*. 2008 Jan;4(1):26-49.
243. Gupta A, Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*. 2005 6;26(18):3995-4021.
244. Hafeli U. Magnetically modulated therapeutic systems. *Int J Pharm*. 2004 6;277(1-2):19-24.
245. Jordan A, Maier-Hauff K, Wust P, Johannsen M. Nanoparticles for Thermotherapy. In: Kumar CSSR, editor. *Nanomaterials for Cancer Therapy*. Weinheim: Wiley-VCH; 2006.
246. Pankhurst QA, Thanh NKT, Jones SK, Dobson J. Progress in applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J Phys D Appl Phys*. 2009;42(22):224001.
247. Bickels J, Dadia S, Lidar Z. Surgical Management of Metastatic Bone Disease. *J Bone Joint Surg Am*. 2009 Jun 1;91(6):1503-1516.
248. Ratner BD. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. 2nd ed. Amsterdam [etc.]: Elsevier Academic Press; 2004.
249. Jones D. Synthesis and evaluation of ceramic, polymer, and composite biomaterials. In: *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering*. Part A: Materials. New York: Marcel Dekker, Inc.; 1995. p. 141.
250. Hench LL, Wilson J. *An Introduction to bioceramics*. World Scientific; 1993.
251. Ohura K, Nakamura T, Yamamuro T, Ebisawa Y, Kokubo T, Kotoura Y, et al. Bioactivity of

- CaO-SiO₂ glasses added with various ions. *J Mater Sci Mater Med*. 1992 Mar;3(2):95–100.
252. Ebisawa Y, Kokubo T, Ohura K, Yamamuro T. Bioactivity of CaO-SiO₂-based glasses: in vitro evaluation. *J Mater Sci Mater Med*. 1990 Nov;1(4):239–244.
253. Auric P, Van Dang N, Bandyopadhyay A, Zarzycki J. Superparamagnetism and ferrimagnetism of the small particles of magnetite in a silicate matrix. *J Non Cryst Solids*. 1982 Jun;50(1):97–106.
254. Luderer AA, Borrelli NF, Panzarino JN, Mansfield GR, Hess DM, Brown JL, et al. Glass-ceramic-mediated, magnetic-field-induced localized hyperthermia: response of a murine mammary carcinoma. *Radiat Res*. 1983;94(1):190–8.
255. Kawashita M. Ceramic Microspheres for Biomedical Applications. *Int J Appl Ceram Technol*. 2005;2(3):173–183.
256. Habraken W, Wolke J, Jansen J. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2007 May;59(4-5):234–248.
257. Ohura K, Ikenaga M, Nakamura T, Yamamuro T, Ebisawa Y, Kokubo T, et al. A heat-generating bioactive glass-ceramic for hyperthermia. *J Appl Biomater*. 1991;2(3):153–159.
258. Ikenaga M, Ohura K, Yamamuro T, Kotoura Y, Oka M, Kokubo T. Localized hyperthermic treatment of experimental bone tumors with ferromagnetic ceramics. *J. Orthop. Res*. 1993;11(6):849–855.
259. Ebisawa Y, Kokubo T, Ohura K, Yamamuro T. Bioactivity of Fe₂O₃-containing CaO-SiO₂ glasses: in vitro evaluation. *J Mater Sci Mater Med*. 1993 May;4(3):225–232.
260. Ebisawa Y, Miyaji F, Kokubo T, Ohura K, Nakamura T. Bioactivity of ferrimagnetic glass-ceramics in the system FeO-Fe₂O₃-CaO-SiO₂. *Biomaterials*. 1997 Oct;18(19):1277–1284.
261. Real RPD, Arcos D, Vallet-Regí M. Implantable magnetic glass-ceramic based on (Fe,Ca)SiO₃ solid solutions. *Chem Mater*. 2002;14(1):64–70.
262. Arcos D, Real RPD, Vallet-Regí M. Biphasic materials for bone grafting and hyperthermia treatment of cancer. *J Biomed Mater Res A*. 2003;65A(1):71–78.
263. Arcos D, Real RPD, Vallet-Regí M. A novel bioactive and magnetic biphasic material. *Biomaterials*. 2002;23(10):2151 – 2158.
264. Bretcanu O, Spriano S, Verné E, Cöisson M, Tiberto P, Allia P. The influence of crystallised Fe₃O₄ on the magnetic properties of coprecipitation-derived ferrimagnetic glass-ceramics. *Acta Biomater*. 2005 Jul;1(4):421–429.
265. Bretcanu O, Verné E, Cöisson M, Tiberto P, Allia P. Temperature effect on the magnetic properties of the coprecipitation derived ferrimagnetic glass-ceramics. *J Magn Magn Mater*. 2006 May;300(2):412–417.

266. Bretcanu O, Verné E, Cöisson M, Tiberto P, Allia P. Magnetic properties of the ferrimagnetic glass-ceramics for hyperthermia. *J Magn Magn Mater*. 2006 Oct;305(2):529–533.
267. Bretcanu O, Spriano S, Vitale C, Verné E. Synthesis and characterization of coprecipitation-derived ferrimagnetic glass-ceramic. *J Mater Sci*. 2006 Feb 1;41(4):1029–1037.
268. Leventouri T, Kis AC, Thompson JR, Anderson IM. Structure, microstructure, and magnetism in ferrimagnetic bioceramics. *Biomaterials*. 2005 Aug;26(24):4924–4931.
269. Singh RK, Kothiyal G, Srinivasan A. Magnetic and structural properties of CaO-SiO₂-P₂O₅-Na₂O-Fe₂O₃ glass ceramics. *J Magn Magn Mater*. 2008 Apr;320(7):1352–1356.
270. Tiberto P, Coisson M, Vinai F, Allia P, Bretcanu O, Vern E. Magnetic Relaxation in Ferrimagnetic Glass-Ceramics Obtained by Co-Precipitation at Different Temperatures. *IEEE Trans. Magn*. 2007 6;43(6):2471–2473.
271. Abdel-Hameed S, Hessien M, Azooz M. Preparation and characterization of some ferromagnetic glass-ceramics contains high quantity of magnetite. *Ceram Int*. 2009 May;35(4):1539–1544.
272. Eniu D, Căcaina D, Coldea M, Valeanu M, Simon S. Structural and magnetic properties of CaO-P₂O₅-SiO₂-Fe₂O₃ glass-ceramics for hyperthermia. *J Magn Magn Mater*. 2005 Jul;293(1):310–313.
273. Apostolova I, Wesselinowa J. Possible low-TC nanoparticles for use in magnetic hyperthermia treatments. *Solid State Commun*. 2009 Jul;149(25-26):986–990.
274. Shimizu T, Matsui M. New magnetic implant material for interstitial hyperthermia. *Sci. Technol. Adv. Mater*. 2003 Sep;4(5):469–473.
275. Kawashita M. Ceramic Microspheres for Biomedical Applications. *Int J Appl Ceram Technol*. 2005;2(3):173–183.
276. Kawashita M, Tanaka M, Kokubo T, Inoue Y, Yao T, Hamada S, et al. Preparation of ferrimagnetic magnetite microspheres for in situ hyperthermic treatment of cancer. *Biomaterials*. 2005 May;26(15):2231–2238.
277. Kawashita M, Domi S, Saito Y, Aoki M, Ebisawa Y, Kokubo T, et al. In vitro heat generation by ferrimagnetic maghemite microspheres for hyperthermic treatment of cancer under an alternating magnetic field. *J Mater Sci Mater Med*. 2008 May;19(5):1897–1903.
278. Kawashita M, Sadaoka K, Kokubo T, Saito T, Takano M, Araki N, et al. Enzymatic preparation of hollow magnetite microspheres for hyperthermic treatment of cancer. *J Mater Sci Mater Med*. 2006 Jul;17(7):605–610.
279. Wu P, Zhu J, Xu Z. Template-assisted synthesis of mesoporous magnetic nanocomposite particles. *Adv Funct Mater*. 2004;14(4):345–351.

280. Lu A, Li W, Kiefer A, Schmidt W, Bill E, Fink G, et al. Fabrication of magnetically separable mesostructured silica with an open pore system. *J. Am. Chem. Soc.* 2004 Jul 1;126(28):8616-8617.
281. Zhao W, Gu J, Zhang L, Chen H, Shi J. Fabrication of uniform magnetic nanocomposite spheres with a magnetic core/mesoporous silica shell structure. *J. Am. Chem. Soc.* 2005 Jun 1;127(25):8916-8917.
282. Chastellain M, Petri A, Gupta A, Rao KV, Hofmann H. Superparamagnetic silica-iron oxide nanocomposites for application in hyperthermia. *ADVANCED ENGINEERING MATERIALS.* 2004 Apr;6(4):235–241.
283. Ruiz-Hernandez E, Lopez-Noriega A, Arcos D, Izquierdo-Barba I, Terasaki O, Vallet-Regi M. Aerosol-assisted synthesis of magnetic mesoporous silica spheres for drug targeting. *Chem Mater.* 2007 Jul;19(14):3455–3463.
284. Leonor IB, Balas F, Kawashita M, Reis RL, Kokubo T, Nakamura T. Biomimetic apatite deposition on polymeric microspheres treated with a calcium silicate solution. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 2009 Oct;91(1):239-247.
285. Lieberman IH, Togawa D, Kayanja MM. Vertebroplasty and kyphoplasty: filler materials. *Spine J.* 2005;5(6, Supplement 1):S305–S316.
286. Takegami K, Sano T, Wakabayashi H, Sonoda J, Yamazaki T, Morita S, et al. New ferromagnetic bone cement for local hyperthermia. *J Biomed Mater Res.* 1998;43(2):210–4.
287. Kusaka M, Takegami K, Sudo A, Yamazaki T, Kawamura J, Uchida A. Effect of hyperthermia by magnetite cement on tumor-induced bone destruction. *J Orthop Sci.* 2002;7(3):354–7.
288. Matsumine A, Kusuzaki K, Matsubara T, Okamura A, Okuyama N, Miyazaki S, et al. Calcium phosphate cement in musculoskeletal tumor surgery. *J Surg Oncol.* 2006;93(3):212–220.
289. Matsumine A, Kusuzaki K, Matsubara T, Shintani K, Satonaka H, Wakabayashi T, et al. Novel hyperthermia for metastatic bone tumors with magnetic materials by generating an alternating electromagnetic field. *Clin. Exp. Metastasis.* 2007 May;24(3):191–200.
290. Frayssinet P, Combacau M, Gougeon M, Rouquet N. Histological evaluation of a new biomaterial releasing magnetite nanoparticles inside bone metastases for thermotherapy. *Key Eng. Mater.* 2008;:1211–14.
291. Shimamura T, Amizuka N, Li M, Freitas PHL, White JH, Henderson JE, et al. Histological observations on the microenvironment of osteolytic bone metastasis by breast carcinoma cell line. *Biomed Res.* 2005 Aug;26(4):159–172.
292. Gupta AK, Naregalkar RR, Vaidya VD, Gupta M. Recent advances on surface engineering of magnetic iron oxide nanoparticles and their biomedical applications. *Nanomedicine.* 2007 2;2(1):23-39.

293. Gazeau F, Lévy M, Wilhelm C. Optimizing magnetic nanoparticle design for nanothermotherapy. *Nanomedicine*. 2008 12;3(6):831-844.
294. Gunvén P. Liver embolizations in oncology: A review. Part I. Arterial (chemo)embolizations. *Med. Oncol*. 2008 Mar;25(1):1–11.
295. Gunvén P. Liver embolizations in oncology: A review. Part II. Arterial radioembolizations, portal venous embolizations, experimental arterial embolization procedures. *Med. Oncol*. 2007;24(3):287–296.
296. Garrean S, Hering J, Helton WS, Espat NJ. A primer on transarterial, chemical, and thermal ablative therapies for hepatic tumors. *Am. J. Surg*. 2007 Jul;194(1):79–88.
297. Lindemayr S, Lehnert T, Korkusuz H, Hammerstingl R, Vogl TJ. Transpulmonary chemoembolization: A novel approach for the treatment of unresectable lung tumors. *Tech Vasc Interv Radiol*. 2007 Jun;10(2):114–119.
298. Laurent A. Microspheres and nonspherical particles for embolization. *Tech Vasc Interv Radiol*. 2007 Dec;10(4):248–256.
299. Kettenbach J, Stadler A, Katzler I, Schernthaner R, Blum M, Lammer J, et al. Drug-loaded microspheres for the treatment of liver cancer: Review of current results. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2008 May;31(3):468–476.
300. Sako M, Hirota S. [Embolotherapy of hepatomas using ferromagnetic microspheres, its clinical evaluation and the prospect of its use as a vehicle in chemoembolo-hyperthermic therapy]. *Gan To Kagaku Ryoho*. 1986 Apr;13(4 Pt 2):1618–1624.
301. Jones SK, Winter JG. Experimental examination of a targeted hyperthermia system using inductively heated ferromagnetic microspheres in rabbit kidney. *Phys Med Biol*. 2001;46(2):385–98.
302. Jones SK, Winter JG, Gray BN. Treatment of experimental rabbit liver tumours by selectively targeted hyperthermia. *Int J Hyperthermia*. 2002;18(2):117–28.
303. Sweetman SC. *Martindale: The Complete Drug Reference*. 34th ed. Pharmaceutical Press; 2005.
304. Chou FI, Fang KC, Chung C, Lui WY, Chi CW, Liu RS, et al. Lipiodol uptake and retention by human hepatoma cells. *Nucl Med Biol*. 1995 Apr;22(3):379–386.
305. Moroz P, Jones SK, Winter J, Gray BN. Targeting liver tumors with hyperthermia: Ferromagnetic embolization in a rabbit liver tumor model. *J Surg Oncol*. 2001;78(1):22–29.
306. Moroz P, Pardoe H, Jones SK, Pierre TGS, Song S, Gray BN. Arterial embolization hyperthermia: hepatic iron particle distribution and its potential determination by magnetic resonance imaging. *Phys Med Biol*. 2002 May;47(9):1591–1602.

307. Moroz P, Metcalf C, Gray BN. Histologic analysis of liver tissue following hepatic arterial infusion of ferromagnetic particles in a rabbit tumour model. *BioMetals*. 2003;16(3):455–464.
308. Takamatsu S, Matsui O, Gabata T, Kobayashi S, Okuda M, Ougi T, et al. Selective induction hyperthermia following transcatheter arterial embolization with a mixture of nano-sized magnetic particles (ferucarbotran) and embolic materials: feasibility study in rabbits. *Radiat Med*. 2008 May;26(4):179–187.
309. Mitsumori M, Hiraoka M, Shibata T, Okuno Y, Masunaga S, Koishi M, et al. Development of intra-arterial hyperthermia using a dextran-magnetite complex. *Int J Hyperthermia*. 1994;10(6):785–93.
310. Muraoka A, Takeda S, Matsui M, Shimizu T, Tohnai I, Akiyama S, et al. Experimental study of a novel thermotherapy for hepatocellular carcinoma using a magnesium ferrite complex powder that produces heat under a magnetic field. *Hepato-Gastroenterology*. 2004 Dec;51(60):1662–1666.
311. Moroz P, Jones SK, Gray BN. Tumor response to arterial embolization hyperthermia and direct injection hyperthermia in a rabbit liver tumor model. *J Surg Oncol*. 2002;80(3):149–56.
312. Jordan O, Doelker E, Rufenacht D. Biomaterials used in injectable implants (liquid embolics) for percutaneous filling of vascular spaces. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2005;28(5):561–569.
313. Jordan O, Doelker E, Defabiani N, Caviezel A, Iselin C. Novel injectable urethral bulking agents for the treatment of urinary incontinence. *J Mater Sci Mater Med*. 2004;15(4):519–522.
314. Le Renard P, Jordan O, Faes A, Petri-Fink A, Hofmann H, Rüfenacht D, et al. The in vivo performance of magnetic particle-loaded injectable, in situ gelling, carriers for the delivery of local hyperthermia. *Biomaterials*. 2010 Feb;31(4):691-705.
315. Le Renard P, Buchegger F, Petri-Fink A, Bosman F, Rüfenacht D, Hofmann H, et al. Local moderate magnetically induced hyperthermia using an implant formed in situ in a mouse tumor model. *Int J Hyperthermia*. 2009 May;25(3):229-239.
316. Hahn GM, Shiu EC, West B, Goldstein L, Li GC. Mechanistic implications of the induction of thermotolerance in Chinese hamster cells by organic solvents. *Cancer Res*. 1985 Sep;45(9):4138-4143.
317. Li GC, Hahn GM. A proposed operational model of thermotolerance based on effects of nutrients and the initial treatment temperature. *Cancer Res*. 1980 Dec 1;40(12):4501-4508.
318. Bussink J, Kaanders JHAM, van der Kogel AJ. Tumor hypoxia at the micro-regional level: clinical relevance and predictive value of exogenous and endogenous hypoxic cell markers. *Radiother Oncol*. 2003 Apr;67(1):3-15.
319. Tsafnat N, Tsafnat G, Lambert TD, Jones SK. Modelling heating of liver tumours with heterogeneous magnetic microsphere deposition. *Phys Med Biol*. 2005 Jun;50(12):2937–2953.

320. Granov AM, Muratov OV, Frolov VF. Problems in the local hyperthermia of inductively heated embolized tissues. *Theor. Found. Chem. Eng.* 2002;36(1):63–66.
321. Knight CG. *Liposomes, From Physical Structure to Therapeutic Applications.* Elsevier; 1981.
322. Dass CR. Drug Delivery in Cancer Using Liposomes. In: Jain KK, editor. *Drug Delivery Systems.* Humana Press; 2008. p. 177-182.
323. Campbell RB, Ying B, Kuesters GM, Hemphill R. Fighting cancer: from the bench to bedside using second generation cationic liposomal therapeutics. *J Pharm Sci.* 2009 Feb;98(2):411–429.
324. Scherphof G, Damen J, Hoeckstra D. Interaction of Liposomes With Plasma Proteins and Components of the Immune System. In: Knight CG, editor. *Liposomes, From Physical Structure to Therapeutic Applications.* Elsevier Biomedical Press; 1981. p. 299-322.
325. Juliano R. Pharmacokinetics of Liposome-Encapsulated Drugs. In: Knight CG, editor. *Liposomes, From Physical Structure to Therapeutic Applications.* Elsevier Biomedical Press; 1981. p. 391-407.
326. Kamps J, Scherphof G. Biodistribution and Uptake of Liposomes In Vivo. In: Düzgüneş N, editor. *Liposomes Part D.* Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2003. p. 257.
327. Kong G, Dewhirst MW. Hyperthermia and liposomes. *Int J Hyperthermia.* 1999;15(5):345–70.
328. Poste G. The interaction of lipid vesicles (liposomes) with cultured cells and their use as carriers for drugs and macromolecule. In: *Liposomes in Biological Systems.* Chichester: J. Wiley; 1980. p. 101-151.
329. Yamada Y, Harashima H. Mitochondrial drug delivery systems for macromolecule and their therapeutic application to mitochondrial diseases. *Adv. Drug Deliv. Rev.* Oct;60(13-14):1439-1462.
330. Laudonio N, Marcocci L, Arancia G, Calcabrini A, Del Bufalo D, Greco C, et al. Enhancement of hyperthermic damage on M14 melanoma cells by liposome pretreatment. *Cancer Res.* 1990 Aug 15;50(16):5119-5126.
331. Szoka F, Papahadjopoulos D. Liposomes: Preparation and characterization. In: Knight CG, editor. *Liposomes, From Physical Structure to Therapeutic Applications.* Elsevier Biomedical Press; 1981. p. 323-348.
332. Düzgüneş N. Preparation and quantitation of small unilamellar liposomes and large unilamellar reverse-phase evaporation liposomes. In: Düzgüneş N, editor. *Liposomes Part A.* Amsterdam [etc.]: Elsevier Academic Press; 2003.
333. Gregoriadis G. *Liposome Technology: Liposome Preparation and Related Techniques.* CRC Press; 2006.

334. Shinkai M, Yanase M, Honda H, Wakabayashi T, Yoshida J, Kobayashi T. Intracellular hyperthermia for cancer using magnetite cationic liposomes: in vitro study. *Jpn. J. Cancer Res.* 1996 Nov;87(11):1179-1183.
335. Yanase M, Shinkai M, Honda H, Wakabayashi T, Yoshida J, Kobayashi T. Intracellular hyperthermia for cancer using magnetite cationic liposomes: ex vivo study. *Jpn. J. Cancer Res.* 1997 Jul;88(7):630-632.
336. Yanase M, Shinkai M, Honda H, Wakabayashi T, Yoshida J, Kobayashi T. Intracellular hyperthermia for cancer using magnetite cationic liposomes: an in vivo study. *Jpn. J. Cancer Res.* 1998 Apr;89(4):463-469.
337. Shinkai M, Yanase M, Suzuki M, Hiroyuki Honda, Wakabayashi T, Yoshida J, et al. Intracellular hyperthermia for cancer using magnetite cationic liposomes. *J Magn Magn Mater.* 1999 Apr;194(1-3):176-184.
338. Yanase M, Shinkai M, Honda H, Wakabayashi T, Yoshida J, Kobayashi T. Antitumor immunity induction by intracellular hyperthermia using magnetite cationic liposomes. *Cancer Sci.* 1998;89(7):775-782.
339. Jordan A, Scholz R, Wust P, Fähling H, Krause J, Wlodarczyk W, et al. Effects of magnetic fluid hyperthermia (MFH) on C3H mammary carcinoma in vivo. *Int J Hyperthermia.* 1997 Dec;13(6):587-605.
340. Johannsen M, Thiesen B, Jordan A, Taymoorian K, Gneveckow U, Waldöfner N, et al. Magnetic fluid hyperthermia (MFH) reduces prostate cancer growth in the orthotopic Dunning R3327 rat model. *Prostate.* 2005 Aug 1;64(3):283-292.
341. Purschke M, Laubach H, Anderson RR, Manstein D. Thermal injury causes DNA damage and lethality in unheated surrounding cells: active thermal bystander effect. *J Invest Dermatol.* 2009 Jul 9;130(1):86-92.
342. Ruddon RW. Tumor immunology. In: *Cancer Biology.* Oxford University Press, USA; 2007. p. 400.
343. Straten PT, Becker JC, Guldberg P, Zeuthen J. In situ T cells in melanoma. *Cancer Immunol. Immunother.* 1999;48(7):386-395.
344. Hiraoka K, Miyamoto M, Cho Y, Suzuoki M, Oshikiri T, Nakakubo Y, et al. Concurrent infiltration by CD8+ T cells and CD4+ T cells is a favourable prognostic factor in non-small-cell lung carcinoma. *Br J Cancer.* 2006 Jan 17;94(2):275-280.
345. Couzin J. T cells a boon for colon cancer prognosis. *Science.* 2006 Sep 29;313(5795):1868-1869.
346. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, et al. Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical

Outcome. *Science*. 2006 Sep 29;313(5795):1960-1964.

347. Ito A, Shinkai M, Honda H, Wakabayashi T, Yoshida J, Kobayashi T. Augmentation of MHC class I antigen presentation via heat shock protein expression by hyperthermia. *Cancer Immunol. Immunother.* 2001 Dec;50(10):515-522.
348. Ito A, Shinkai M, Honda H, Yoshikawa K, Saga S, Wakabayashi T, et al. Heat shock protein 70 expression induces antitumor immunity during intracellular hyperthermia using magnetite nanoparticles. *Cancer Immunol. Immunother.* 2003 Feb 1;52(2):80-88.
349. Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, Ferrone S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv. Immunol.* 2000;74:181-273.
350. Schmitt E, Gehrmann M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J. Leukoc. Biol.* 2007 Jan;81(1):15-27.
351. Fidler IJ. Macrophages and metastasis--a biological approach to cancer therapy. *Cancer Res.* 1985 Oct;45(10):4714-4726.
352. Killion JJ, Fidler IJ. Therapy of cancer metastasis by tumoricidal activation of tissue macrophages using liposome-encapsulated immunomodulators. *Pharmacol. Ther.* 1998 Jun;78(3):141-154.
353. Rao M, Rothwell S, Alving C. Trafficking of Liposomal Antigens to the Trans-Golgi Complex in Macrophages. In: Düzgüneş N, editor. *Liposomes Part C*. Amsterdam [etc.]: Elsevier Academic Press; 2003.
354. Udono H, Srivastava PK. Comparison of tumor-specific immunogenicities of stress-induced proteins gp96, hsp90, and hsp70. *J. Immunol.* 1994 Jun 1;152(11):5398-5403.
355. Melcher A, Todryk S, Hardwick N, Ford M, Jacobson M, Vile RG. Tumor immunogenicity is determined by the mechanism of cell death via induction of heat shock protein expression. *Nat Med.* 1998 May;4(5):581-587.
356. Zeng Y, Graner M, Katsanis E. Chaperone-rich cell lysates, immune activation and tumor vaccination. *Cancer Immunol. Immunother.* 2006 Mar 1;55(3):329-338.
357. Milani V, Noessner E. Effects of thermal stress on tumor antigenicity and recognition by immune effector cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 2006 Mar;55(3):312-319.
358. Filion MC, Phillips NC. Toxicity and immunomodulatory activity of liposomal vectors formulated with cationic lipids toward immune effector cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1997 Oct 23;1329(2):345-356.
359. Soenen SJ, Brisson AR, De Cuyper M. Addressing the problem of cationic lipid-mediated toxicity: The magnetoliposome model. *Biomaterials.* 2009 Aug;30(22):3691-3701.

360. Ito A, Tanaka K, Honda H, Abe S, Yamaguchi H, Kobayashi T. Complete regression of mouse mammary carcinoma with a size greater than 15 mm by frequent repeated hyperthermia using magnetite nanoparticles. *J. Biosci. Bioeng.* 2003;96(4):364-369.
361. Suzuki M, Shinkai M, Honda H, Kobayashi T. Anticancer effect and immune induction by hyperthermia of malignant melanoma using magnetite cationic liposomes. *Melanoma Res.* 2003 Apr;13(2):129-135.
362. Matsuoka F, Shinkai M, Honda H, Kubo T, Sugita T, Kobayashi T. Hyperthermia using magnetite cationic liposomes for hamster osteosarcoma. *Biomagn Res Technol.* 2004 Mar 25;2(1):3.
363. Ito A, Honda H, Kobayashi T. Cancer immunotherapy based on intracellular hyperthermia using magnetite nanoparticles: a novel concept of “heat-controlled necrosis” with heat shock protein expression. *Cancer Immunol Immunother.* 2005 8;55(3):320-328.
364. Findlay JBC, editor. *Biological Membranes: A Practical Approach.* Oxford: IRL Press; 1987.
365. Nir S, Nieva J. Uptake of liposomes by cells: experimental procedures and modeling. In: Düzgüneş N, editor. *Liposomes Part B.* Amsterdam [etc.]: Elsevier Academic Press; 2003. p. 235.
366. Smolen J. Liposomes in study of membrane fusion in neutrophils. In: Düzgüneş N, editor. *Liposomes Part B.* Amsterdam [etc.]: Elsevier Academic Press; 2003. p. 300.
367. Scott B, Van Komen J, Liu S, Weber T, Melia T, McNew J. Liposome fusion assay to monitor intracellular membrane fusion machines. In: Düzgüneş N, editor. *Liposomes Part B.* Amsterdam [etc.]: Elsevier Academic Press; 2003. p. 274.
368. Kuhn SJ, Hallahan DE, Giorgio TD. Characterization of superparamagnetic nanoparticle interactions with extracellular matrix in an in vitro system. *Ann Biomed Eng.* 2006 Jan;34(1):51-58.
369. Noessner E. Thermal stress-related modulation of tumor cell physiology and immune responses. *Cancer Immunol. Immunother.* 2006 Mar 1;55(3):289-291.
370. Martina M, Wilhelm C, Lesieur S. The effect of magnetic targeting on the uptake of magnetic-fluid-loaded liposomes by human prostatic adenocarcinoma cells. *Biomaterials.* 2008 Oct;29(30):4137-4145.
371. Düzgüneş N. Fluorescence assays for liposome fusion. In: Düzgüneş N, editor. *Liposomes Part B.* Amsterdam [etc.]: Elsevier Academic Press; 2003. p. 260.
372. Humphries GM. The use of liposomes for studying membranes antigens as immunogens and as targets for immune attack. In: Gregoriadis G, Allison AC, editors. *Liposomes in Biological Systems.* Chichester: J. Wiley; 1980. p. 345-376.

373. Le B, Shinkai M, Kitade T, Honda H, Yoshida J, Wakabayashi T, et al. Preparation of tumor-specific magnetoliposomes and their application for hyperthermia. *J Chem Eng Jpn*. 2001;34(1):66-72.
374. Shinkai M, Le B, Honda H, Yoshikawa K, Shimizu K, Saga S, et al. Targeting hyperthermia for renal cell carcinoma using human MN antigen-specific magnetoliposomes. *Jpn. J. Cancer Res*. 2001 Oct;92(10):1138-1145.
375. Liao SY, Aurelio ON, Jan K, Zavada J, Stanbridge EJ. Identification of the MN/CA9 protein as a reliable diagnostic biomarker of clear cell carcinoma of the kidney. *Cancer Res*. 1997 Jul 15;57(14):2827-2831.
376. Ito A, Kuga Y, Honda H, Kikkawa H, Horiuchi A, Watanabe Y, et al. Magnetite nanoparticle-loaded anti-HER2 immunoliposomes for combination of antibody therapy with hyperthermia. *Cancer Lett*. 2004 Aug 30;212(2):167-175.
377. Dinh P, de Azambuja E, Cardoso F, Piccart-Gebhart MJ. Facts and controversies in the use of trastuzumab in the adjuvant setting. *Nat Clin Pract Oncol*. 2008 Nov;5(11):645-654.
378. Nahta R, Esteva FJ. Herceptin: mechanisms of action and resistance. *Cancer Lett*. 2006 Feb 8;232(2):123-138.
379. Park JW, Hong K, Kirpotin DB, Colbern G, Shalaby R, Baselga J, et al. Anti-HER2 Immunoliposomes. *Clin. Cancer Res*. 2002 Apr;8(4):1172-1181.
380. Kirpotin DB, Drummond DC, Shao Y, Shalaby MR, Hong K, Nielsen UB, et al. Antibody targeting of long-circulating lipidic nanoparticles does not increase tumor localization but does increase internalization in animal models. *Cancer Res*. 2006 Jul 1;66(13):6732-6740.
381. Yuan F, Leunig M, Huang SK, Berk DA, Papahadjopoulos D, Jain RK. Microvascular permeability and interstitial penetration of sterically stabilized (stealth) liposomes in a human tumor xenograft. *Cancer Res*. 1994 Jul 1;54(13):3352-3356.
382. Juweid M, Neumann R, Paik C, Perez-Bacete MJ, Sato J, van Osdol W, et al. Micropharmacology of monoclonal antibodies in solid tumors: Direct experimental evidence for a binding site barrier. *Cancer Res*. 1992 Oct 1;52(19):5144-5153.
383. Graff CP, Wittrup KD. Theoretical analysis of antibody targeting of tumor spheroids: Importance of dosage for penetration, and affinity for retention. *Cancer Res*. 2003 Mar 15;63(6):1288-1296.
384. Huang SK, Lee K, Hong K, Friend DS, Papahadjopoulos D. Microscopic localization of sterically stabilized liposomes in colon carcinoma-bearing mice. *Cancer Res*. 1992 Oct 1;52(19):5135-5143.
385. Rabin Y. Is intracellular hyperthermia superior to extracellular hyperthermia in the thermal sense? *Int J Hyperthermia*. 2002 Jun;18(3):194-202.

386. Fortin J, Gazeau F, Wilhelm C. Intracellular heating of living cells through Néel relaxation of magnetic nanoparticles. *Eur. Biophys. J.* 2008 Feb 1;37(2):223-228.
387. Gordon S, editor. *The macrophage as therapeutic target.* Springer; 2003.
388. Kawai N, Futakuchi M, Yoshida T, Ito A, Sato S, Naiki T, et al. Effect of heat therapy using magnetic nanoparticles conjugated with cationic liposomes on prostate tumor in bone. *Prostate.* 2008 May 15;68(7):784-792.
389. Yamashita S. Heat-induced antigen retrieval: mechanisms and application to histochemistry. *Prog Histochem Cytochem.* 2007;41(3):141-200.
390. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch. Biochem. Biophys.* 2008 May 15;473(2):139-146.
391. Lynch CC, Hikosaka A, Acuff HB, Martin MD, Kawai N, Singh RK, et al. MMP-7 promotes prostate cancer-induced osteolysis via the solubilization of RANKL. *Cancer Cell.* 2005 May;7(5):485-496.
392. Thiolloy S, Halpern J, Holt GE, Schwartz HS, Mundy GR, Matrisian LM, et al. Osteoclast-derived matrix metalloproteinase-7, but not matrix metalloproteinase-9, contributes to tumor-induced osteolysis. *Cancer Res.* 2009 Aug 15;69(16):6747-6755.
393. Keller ET, Brown J. Prostate cancer bone metastases promote both osteolytic and osteoblastic activity. *J. Cell. Biochem.* 2004 Mar 1;91(4):718-729.
394. Armstrong AP, Miller RE, Jones JC, Zhang J, Keller ET, Dougall WC. RANKL acts directly on RANK-expressing prostate tumor cells and mediates migration and expression of tumor metastasis genes. *Prostate.* 2008 Jan 1;68(1):92-104.
395. Ando K, Mori K, Rédini F, Heymann D. RANKL/RANK/OPG: key therapeutic target in bone oncology. *Curr Drug Discov Technol.* 2008 Sep;5(3):263-268.
396. Hamaguchi S, Tohnai I, Ito A, Mitsudo K, Shigetomi T, Ito M, et al. Selective hyperthermia using magnetoliposomes to target cervical lymph node metastasis in a rabbit tongue tumor model. *Cancer Sci.* 2003;94(9):834-9.
397. Skitzki JJ, Chen Q, Wang WC, Evans SS. Primary immune surveillance: some like it hot. *J. Mol. Med.* 2007 Dec;85(12):1361-1367.
398. van Mierlo GJ, Boonman ZF, Dumortier HM, den Boer AT, Fransen MF, Nouta J, et al. Activation of dendritic cells that cross-present tumor-derived antigen licenses CD8+ CTL to cause tumor eradication. *J. Immunol.* 2004 Dec 1;173(11):6753-6759.

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 14 Janvier 2011

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIE

présenté par Pol-Edern LE RENARD

Sujet :Formulations pour le traitement local de tumeurs solides par
hyperthermie à médiation magnétiqueJury :

Président : Philippe MAINCENT

Directeur : Philippe MAINCENT

Professeur – Laboratoire de Pharmacie Galénique et
Biopharmacie, Faculté de Pharmacie de Nancy-
Université de Nancy.Juges :

M. Olivier JORDAN,

Adjoint scientifique - Section des Sciences
Pharmaceutiques – Biopharmacie, école de Pharmacie
Genève Lausanne, Université de Genève

Mme. Marie-Christine BENE

Professeur PU-PH en Immunologie – CHU et Faculté de
Médecine de Nancy – Nancy

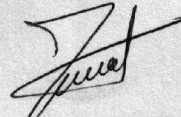
Mme Roudayna DIAB

Maître de Conférences – Laboratoire de Pharmacie
Galénique et Biopharmacie, Faculté de Pharmacie de
Nancy- Université de Nancy.

Vu,

Nancy, le 25 Novembre 2010


Le Président du Jury et Directeur de Thèse



M. MAINCENT Philippe

Vu et approuvé,

Nancy, le 30 novembre 2010

Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,


Francine PAULUS

Vu,

Nancy, le 6.12.2010

Le Président de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,

Pour le Président
et par Délégation,
La Vice-Présidente du Conseil
des Etudes et de la Vie Universitaire,

Jean-Pierre FINANCE
C. CAPEVILLE-ATKINSON

N° d'enregistrement : 3505-

